



Universitat Autònoma
de Barcelona

**TESI DOCTORAL:
NOUS DISSENYNS BIOMOLECULARS EN
GENOSENSORS I IMMUNOSENSORS PER A
LA SEGURETAT ALIMENTÀRIA**

Memòria presentada per

ANA ISABEL LERMO SORIA

per a optar al grau de doctor en Ciències Químiques

Directors: Salvador Alegret i Sanromà i María Isabel Pividori Gurgo

PROGRAMA DE DOCTORAT DE QUÍMICA
Departament de Química
Facultat de Ciències
Bellaterra, juny de 2009

La present tesi doctoral, que porta per títol: "Nous dissenys biomoleculars en genosensors i immunosensors per a la seguretat alimentària", ha estat realitzada als laboratoris del Grup de Sensors i Biosensors del Departament de Química de la Universitat Autònoma de Barcelona, sota la direcció del professor Salvador Alegret i Sanromà i de la doctora María Isabel Pividori Gurgo.

Bellaterra, juny de 2009

Dr. Salvador Alegret i Sanromà
Catedràtic de Química Analítica

Dra. María Isabel Pividori Gurgo
Professora lectora

Aquesta tesi doctoral s'ha realitzat gràcies a les següents ajudes institucionals:

Ministerio de Educación y Ciencia, Madrid.

Projectes: "Biorreconocimiento mejorado en biosensores de afinidad para biotecnología. Aplicaciones medioambientales y agroalimentarias" (BIO2007-63300), i "Nuevas estrategias para el diseño de biosistemas analíticos integrados. Plataformas universales de afinidad y sistemas de automarcación para biosensores" (BIO2004-02776).

Agencia Española de Cooperación Internacional, Madrid.

Projectes: "Desarrollo de Biosensores para el análisis rápido de compuestos de interés en la industria agroalimentaria, farmacéutica y en el control medioambiental" (A/7927/07 i A/6488/06).

Grup de Sensors i Biosensors

Unitat de Química Analítica
Departament de Química
Universitat Autònoma de Barcelona
Edifici Cn, 08193 Bellaterra



Ara ja fa més de cinc anys, però el recordo com si fos ara el primer contacte amb el món de la investigació. El professor Manel del Valle em va comentar la possibilitat d'optar a una plaça de professor associat i ampliar els meus estudis amb un Màster, sota la direcció del catedràtic Salvador Alegret i la professora María Isabel Pividori. Així vaig començar una nova etapa al grup de Sensors i Biosensors, afrontant nous reptes i compromisos, en la que he viscut moments de "penes i alegries", que m'han fet madurar tant a nivell personal com professional.

En primer lloc voldria agrair als meus directors de tesi, Salvador Alegret i María Isabel Pividori, l'oportunitat que m'han ofert, per la confiança que han dipositat en mi i la possibilitat de realitzar tasques docents a la universitat al llarg del doctorat.

Voldria agrair al catedràtic Jordi Barbé i a la doctora Susana Campoy del departament de Genètica i Microbiologia la seva col·laboració en molts dels treballs que s'han realitzat en aquesta tesi. També a la doctora María Pilar Marco i el doctor Francisco Sánchez del grup AMRg del CSIC, l'oportunitat que em van oferir per fer una estada al seu grup d'investigació, i a les doctores Silvia Fabiano i Silvia Hernández del "Laboratorio de Sensores y Biosensores" de la Universidad Nacional del Litoral de l'Argentina, gràcies per la vostra acollida.

Durant aquest anys he passat molts bons moments amb companys del GSB: Manu, si no fos per tu no crec que hagués fet el doctorat, valoro molt la teva honestedat i la capacitat que tens d'escoltar; Sergio, sé que et tindrè a prop sempre que ho necessiti; Ale, espero que et vagi molt bé al Japó, molta sort a tu i a l'Adriano; Rosa, molta sort a l'etapa final; Mercè, ets una persona realment organitzada. Susana, amb el teu somriure omplés el laboratori de bon ambient; Tamara, sort amb el màster; Silvia, ja sé que no t'agrada com canto...; Sandra, segur que tot et va molt bé. I als que ja no hi sou al GSB, sempre us recordaré amb molt afecte: Xavi, gràcies per ajudar-me en tot el que vas poder; Núria, ets una persona molt vàlida; Anna, les teves històries m'han fet riure molt; Emmanuela, segur que tot et va molt bé; Montse, sempre disposada a donar un cop de mà; Dani, també et trobem a faltar. I que dir dels companys de la llicenciatura: Raquel, ets una gran amiga, plena d'energia i decidida, molts ànims per la tesi; Marta, ets una gran persona, et desitjo lo millor; Toni, recordes els viatges en Renfe?; Javi, molta sort a la nova etapa que comences. Una abraçada als companys del CSIC: Pablo, Eva, Dani, Javi, Àlex, Xavi, Fàtima, Núria, Silvia, Fernando. Roger, em va agradar molt treballar amb tu, t'estic molt agraïda per tot el que em vas ensenyar.

I moltes gràcies a tots els que m'han ajudat en aquesta etapa.

Als meus pares,
i a tu, Arnau.

ÍNDEX

ÍNDEX

RESUM	1
1 INTRODUCCIÓ	3
1.1 EL GENOMA	3
1.1.1 <i>La molècula del DNA</i>	4
1.1.2 <i>Funcions biològiques del DNA</i>	7
1.1.3 <i>Mutacions i polimorfismes</i>	10
1.1.4 <i>Seqüenciació del DNA</i>	11
1.2 EL SISTEMA IMMUNITARI	13
1.2.1 <i>Els anticossos</i>	13
1.2.2 <i>El reconeixement antigènic</i>	14
1.2.3 <i>Funcions dels anticossos</i>	15
1.3 TÈCNiques GENÈTIQUES I IMMUNOLÒGIQUES CLÀSSIQUES	16
1.3.1 <i>Tècniques d'anàlisi del DNA</i>	16
1.3.1.1 <i>Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	17
1.3.1.2 <i>PCR a temps real</i>	20
1.3.1.3 <i>Anàlisi de la corba d'amplificació de la PCR</i>	24
1.3.2 <i>Tècniques d'anàlisi immunològica</i>	26
1.3.2.1 <i>Immunoassaigs enzimàtics</i>	29
1.3.2.2 <i>Assaig immunoabsorbent lligat a enzims (ELISA)</i>	29
1.3.2.3 <i>Anàlisi de la corba d'ELISA competitiu</i>	32
1.4 ESTRATÈGIES D'IMMOBILITZACIÓ I SEPARACIÓ DE MATERIAL BIOLÒGIC BASEDES EN PARTÍCULES MAGNÈTIQUES.....	33
1.5 NOVES ESTRATÈGIES BIOANALÍTiques: GENOSENSORS I IMMUNOSENSORS.....	35
1.5.1 <i>Sensors químics i biosensors</i>	35
1.5.2 <i>Biosensors electroquímics</i>	37
1.5.2.1 <i>Tècnica amperomètrica</i>	37
1.5.2.2 <i>Biosensors amperomètrics enzimàtics</i>	39
1.5.2.3 <i>Transductors amperomètrics basats en compòsits i biocompòsits</i>	40
1.5.3 <i>Genosensors</i>	41
1.5.4 <i>Immunosensors</i>	43
1.6 LA SEGURETAT ALIMENTÀRIA	44
1.6.1 <i>Additius alimentaris</i>	46
1.6.2 <i>Bacteris patògens</i>	48
1.7 BIBLIOGRAFIA.....	55

2	OBJECTIUS	65
3	EXPERIMENTAL	67
3.1	CONSTRUCCIÓ I CARACTERITZACIÓ DE NOUS MATERIALS PER A LA IMPLEMENTACIÓ EN BIOSENSORS ELECTROQUÍMICS	67
3.1.1	<i>Introducció</i>	67
3.1.2	<i>Instrumentació</i>	68
3.1.3	<i>Reactius i solucions</i>	69
3.1.4	<i>Construcció d'elèctrodes de configuració cilíndrica</i>	69
3.1.4.1	Elèctrodes basats en compòsits de grafit-epoxi (GEC)	70
3.1.4.2	Elèctrodes basats en biocompòsits de grafit-epoxi modificats amb avidina (Av-GEB)	70
3.1.4.3	Magneto elèctrodes basats en compòsits de grafit-epoxi (m-GEC)	71
3.1.5	<i>Renovació de la superfície</i>	72
3.1.6	<i>Caracterització electroquímica dels elèctrodes per voltamperometria cíclica</i>	72
3.2	GENOSSENSORS ELECTROQUÍMICS PER A LA DETECCIÓ DE SALMONELLA	73
3.2.1	<i>Introducció</i>	73
3.2.2	<i>Instrumentació</i>	74
3.2.3	<i>Reactius i solucions</i>	74
3.2.4	<i>Caracterització microscòpica de partícules magnètiques capturades sobre magneto elèctrodes</i>	76
3.2.5	<i>Caracterització electroquímica dels magneto elèctrodes m-GEC modificats amb partícules magnètiques</i>	76
3.2.6	<i>Detecció de seqüències sintètiques de Salmonella mitjançant l'activitat intrínseca del DNA</i>	77
3.2.6.1	Estratègia basada en la immobilització de DNA sobre partícules magnètiques amb tractament alcalí emprant elèctrodes basats en compòsits de grafit-epoxi (GEC)	78
3.2.6.2	Estratègia basada en la immobilització de DNA sobre partícules magnètiques emprant magneto elèctrodes basats en compòsits de grafit-epoxi (m-GEC)	79
3.2.6.3	Detecció electroquímica per voltamperometria diferencial d'impulsos	80
3.2.6.4	Avaluació de la selectivitat de l'assaig	80
3.2.7	<i>Detecció de seqüències sintètiques de Salmonella mitjançant marcadors enzimàtics</i>	80
3.2.7.1	Estratègia basada en la immobilització de DNA per adsorció sobre elèctrodes GEC	81
3.2.7.2	Estratègia basada en la immobilització de DNA sobre partícules magnètiques emprant m-GEC	83
3.2.7.3	Detecció electroquímica per amperometria	84
3.2.7.4	Avaluació de la selectivitat de l'assaig. Discriminació de polimorfismes d'un sol nucleòtid (SNPs)	85
3.2.8	<i>Estratègies electroquímiques basades en l'amplificació del genoma</i>	85
3.2.8.1	Extracció del DNA cromosòmic	86
3.2.8.2	Amplificació del DNA per PCR	86

3.2.8.3	Detecció electroquímica del producte amplificat de <i>Salmonella</i>	88
3.2.8.4	Detecció electroquímica i confirmació per hibridació del producte amplificat de <i>Salmonella</i>	89
3.2.8.5	Detecció electroquímica de l'amplicó de <i>Salmonella</i> mitjançant l'amplificació del genoma amb encebadors magnètics.....	89
3.3	GENOSENSORS AMPEROMÈTRICS PER A LA DETECCIÓ D'ESCHERICHIA COLI.....	90
3.3.1	Introducció.....	90
3.3.2	Instrumentació.....	91
3.3.3	Reactius i solucions.....	91
3.3.4	Optimització del potencial aplicat a magneto elèctrodes (m-GEC) i elèctrodes modificats amb avidina (Av-GEB).....	92
3.3.5	Caracterització dels elèctrodes per microscòpia de fluorescència.....	92
3.3.6	Selecció de la seqüència del gen <i>eaeA</i> i disseny dels encebadors.....	93
3.3.7	Avaluació de la selectivitat dels encebadors amb PCR a temps real amb el sistema Taqman.....	93
3.3.8	Sistema electroquímic de PCR quantitativa.....	93
3.3.8.1	Extracció del DNA cromosòmic.....	93
3.3.8.2	Amplificació del DNA.....	93
3.3.8.3	Detecció electroquímica del producte amplificat d' <i>Escherichia coli</i> mitjançant m-GEC.....	94
3.3.8.4	Detecció electroquímica del producte amplificat d' <i>Escherichia coli</i> mitjançant Av-GEB.....	95
3.4	MAGNETO IMMUNOSENSOR AMPEROMÈTRIC PER A LA DETERMINACIÓ D'ÀCID FÒLIC EN LLET.....	96
3.4.1	Introducció.....	96
3.4.2	Instrumentació.....	97
3.4.3	Reactius i solucions.....	97
3.4.4	Conjugació de l'àcid fòlic amb seroalbúmina bovina i peroxidasa (BSA-AF, AF-HRP).....	98
3.4.5	Modificació de les partícules magnètiques.....	99
3.4.6	Optimització de l'immunoassaig.....	100
3.4.7	Efecte matriu de la llet.....	101
3.4.8	Magneto-ELISA.....	102
3.4.9	Magneto immunoassaig electroquímic.....	102
3.4.10	Determinació d'àcid fòlic en mostres cegues i llet enriquida.....	103
3.5	BIBLIOGRAFIA.....	104
4	DISCUSSIÓ GLOBAL DELS RESULTATS.....	107
4.1	INTRODUCCIÓ.....	107
4.2	CONSTRUCCIÓ I CARACTERITZACIÓ DE NOUS MATERIALS PER A LA IMPLEMENTACIÓ EN BIOSENSORS ELECTROQUÍMICS.....	111

4.2.1	<i>Caracterització electroquímica dels elèctrodes per voltamperometria cíclica ..</i>	111
4.3	GENOSENSORS ELECTROQUÍMICS PER A LA DETECCIÓ DE SALMONELLA..	113
4.3.1	<i>Caracterització microscòpica de partícules magnètiques capturades sobre magneto elèctrodes.....</i>	113
4.3.2	<i>Caracterització electroquímica dels magneto elèctrodes m-GEC modificats amb partícules magnètiques</i>	115
4.3.3	<i>Detecció de seqüències sintètiques de Salmonella mitjançant l'activitat intrínseca del DNA.....</i>	116
4.3.4	<i>Detecció de seqüències sintètiques de Salmonella mitjançant marcadors enzimàtics.....</i>	118
4.3.4.1	<i>Estratègia basada en la immobilització de DNA per adsorció sobre elèctrodes GEC.....</i>	118
4.3.4.2	<i>Estratègia basada en la immobilització de DNA sobre partícules magnètiques emprant magneto elèctrodes m-GEC</i>	119
4.3.4.3	<i>Avaluació de la selectivitat de l'assaig. Discriminació de polimorfismes d'un sol nucleòtid (SNPs).....</i>	122
4.3.5	<i>Estratègies electroquímiques basades en l'amplificació del genoma.....</i>	123
4.3.5.1	<i>Amplificació del DNA per PCR</i>	123
4.3.5.2	<i>Detecció electroquímica del producte amplificat de Salmonella.....</i>	124
4.3.5.3	<i>Detecció electroquímica i confirmació per hibridació del producte amplificat de Salmonella</i>	126
4.3.5.4	<i>Detecció electroquímica de l'amplicó de Salmonella mitjançant l'amplificació del genoma amb encebadors magnètics</i>	127
4.4	GENOSENSORS AMPEROMÈTRICS PER A LA DETECCIÓ D'ESCHERICHIA COLI.....	128
4.4.1	<i>Optimització del potencial aplicat a magneto elèctrodes (m-GEC) i elèctrodes modificats amb avidina (Av-GEB)</i>	128
4.4.2	<i>Caracterització dels elèctrodes per microscòpia de fluorescència</i>	129
4.4.3	<i>Selecció de la seqüència del gen eaeA i disseny dels encebadors.....</i>	130
4.4.4	<i>Avaluació de la selectivitat dels encebadors amb PCR a temps real amb el sistema Taqman.....</i>	130
4.4.5	<i>Sistema electroquímic de PCR quantitativa.....</i>	131
4.4.5.1	<i>Amplificació del DNA.....</i>	131
4.4.5.2	<i>Detecció electroquímica del producte amplificat d'Escherichia coli mitjançant m-GEC i Av-GEB.....</i>	132
4.5	MAGNETO IMMUNOSENSOR AMPEROMÈTRIC PER A LA DETERMINACIÓ D'ÀCID FÒLIC EN LLET.....	135
4.5.1	<i>Optimització de l'immunoassaig.....</i>	135
4.5.2	<i>Efecte matriu de la llet i Magneto-ELISA.....</i>	136
4.5.3	<i>Magneto immunoassaig electroquímic.....</i>	137
4.5.4	<i>Determinació d'àcid fòlic en mostres cegues i llet enriquida.....</i>	138
4.6	BIBLIOGRAFIA.....	141

6 PUBLICACIONES

- I. Genomagnetic assay based on label-free electrochemical detection using magneto-composite electrodes
Sensors and Actuators B, 114 (2006) 591-598
Arzum Erdem, M. Isabel Pividori, Anabel Lermo, Alessandra Bonanni, Manel del Valle, Salvador Alegret

- II. Rapid Electrochemical DNA Biosensing Strategy for the Detection of Food Pathogens Based on Enzyme-DNA-Magnetic Bead Conjugate
Afinidad, 63 (2006) 13-18
M. Isabel Pividori, Anabel Lermo, Santiago Hernández, Jordi Barbé, Salvador Alegret, Susana Campoy

- III. In situ DNA amplification with magnetic primers for the electrochemical detection of food pathogens
Biosensors and Bioelectronics, 22 (2007) 2010-2017
A. Lermo, S. Campoy, J. Barbé, S. Hernández, S. Alegret, M.I. Pividori

- IV. Procedure 31. Rapid electrochemical verification of PCR amplification of *Salmonella* spp. based on m-GEC electrodes
Comprehensive Analytical Chemistry, 49 (2007) e221-e226
María Isabel Pividori, Anabel Lermo, Susana Campoy, Jordi Barbé, Salvador Alegret

- V. Procedure 32. In situ DNA amplification of *Salmonella* spp. with magnetic primers for the real-time electrochemical detection based on m-GEC electrodes
Comprehensive Analytical Chemistry, 49 (2007) e227-e231
María Isabel Pividori, Anabel Lermo, Susana Campoy, Jordi Barbé, Salvador Alegret

- VI. Bioaffinity platforms based on carbon-polymer biocomposites for electrochemical biosensing
Thin Solid Films, 516 (2007) 284-292
M.I. Pividori, A. Lermo, E. Zacco, S. Hernández, S. Fabiano, S. Alegret

VII. Towards Q-PCR of pathogenic bacteria with improved electrochemical double-tagged genosensing detection

Biosensors and Bioelectronics, 23 (2008) 1805-1811

A. Lermo, E. Zacco, J. Barak, M. Delwiche, S. Campoy, J. Barbé, S. Alegret, M.I. Pividori

VIII. Immunoassay for folic acid detection in vitamin-fortified milk based on electrochemical magneto sensors

Biosensors and Bioelectronics, 24 (2009) 2057-2063

A. Lermo, S. Fabiano, S. Hernández, R. Galvé, M.-P. Marco, S. Alegret and M.I. Pividori

ABREVIATURES I SIMBOLS

ABREVIATURES I SÍMBOLS

§	Secció
λ	Longitud d'ona
μA	Microamper
A	Adenina
antiDig-HRP	Anticòs antidigoxigenina conjugat amb peroxidasa
antiIgG-HRP	Anticòs antiIgG conjugat amb peroxidasa
BSA	Seroalbúmina bovina
C	Citosina
cDNA	DNA complementari
CFU	Unitats formadores de colònies
Da	Dalton, equivalent a g/mol
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
DIG	Digoxigenina
DMSO	Dimetilsulfòxid
DNA	Àcid desoxiribonucleic
DPV	Voltamperometria diferencial d'impulsos
E	Potencial electroquímic
EDTA	Àcid etilendiaminotetraacètic
ELISA	Assaig immunoabsorbent lligat a enzims
G	Guanina
HRP	Peroxidasa de rave picant
I	Inosina
IC50	Concentració d'anàlit que correspon al 50% del senyal màxim
IgG	Immunoglobulina G
kDa	Kilodalton
mRNA	RNA missatger
n	Nombre de repliques
NHS	N-hidroxisuccinimida
pb	Parells de bases
PBSE	Solució de 0.1 M fosfat, 0.1 M KCl i pH 7.0
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
p/v	Relació pes/volum
Q-PCR	PCR quantitativa
RNA	Àcid ribonucleic

rpm	Revolucions per minut
rRNA	RNA ribosòmic
SDS	Dodecilsulfat de sodi
SNP	Polimorfisme d'un sol nucleòtid
SSC	Solució de 75 mM citrat, 0.75 M NaCl i pH 7.0 (5xSSC)
T	Timina
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
tRNA	RNA de transferència
U	Uracil
v/v	Relació volum/volum

RESUM

RESUM

Al camp alimentari hi ha una creixent demanda de metodologies analítiques que siguin ràpides, selectives i econòmiques, que permetin la detecció de diferents contaminants alimentaris per a garantir la seguretat del producte al llarg de la cadena alimentària de producció. En aquest context, els biosensors electroquímics s'alcen com a candidats ideals com alternativa a la instrumentació analítica convencional per a l'anàlisi fora de l'àmbit del laboratori.

En aquesta tesi es van desenvolupar nous dissenys biomoleculars basats en biosensors electroquímics per a la seguretat alimentària abordant tres aspectes crítics dels dispositius biosensors, que convergeixen cap a la simplificació metodològica: la immobilització orientada del biomaterial, la marcatge i la transducció del senyal electroquímic.

Donada l'experiència del nostre grup d'investigació en la fabricació de compòsits de grafit-epoxi (GEC) i els avantatges electroquímics demostrats d'aquest material, es van construir nous transductors electroquímics basats en compòsits rígids per a la immobilització orientada de biomolècules per aconseguir la simplificació metodològica en la detecció de DNA i immunoespècies. Els nous transductors construïts es van basar en: i) biocompòsits de grafit-epoxi modificats en volum amb la proteïna avidina (Av-GEB), i ii) compòsits amb un element magnètic integrat (m-GEC). Els biocompòsits d'avidina constitueixen una plataforma universal per a la immobilització directa orientada de material biològic biotinilat, mitjançant la forta unió avidina-biotina. El propi transductor actua com a reservori de material biològic i es pot renovar amb un simple procediment de polit, obtenint una nova superfície per cada assaig. Els magneto elèctrodes permeten la integració de partícules magnètiques als procediments biosensors per tal de realitzar les reaccions biològiques de biorreconeixement en solució, reduint la complexitat de la matriu de les mostres i preconcentrant l'anàlit, obtenint així, una detecció més sensible.

Es va dissenyar una nova estratègia de detecció de DNA provinent de mostres reals dels bacteris patògens *Salmonella* i *Escherichia coli*, mitjançant la incorporació d'encebadors marcats a la mescla de reacció de la PCR. A part d'amplificar la quantitat

de DNA, es va aconseguir marcar doblement el producte amplificat amb biotina i digoxigenina, per aconseguir la immobilització posterior a partícules magnètiques recobertes d'estreptavidina o Av-GEB i la unió d'un conjugat enzimàtic (antiDIG-HRP) per a detectar el producte amplificat. Així es van obtenir uns protocols simples, ràpids i molt sensibles. Aquests protocols van proporcionar límits de detecció més baixos en comparació amb la tècnica clàssica de gel d'electroforesi i la PCR quantitativa amb sistema TaqMan.

També es van obtenir resultats molt prometedors incorporant a la PCR un encebador magnètic, encebador unit a partícules magnètiques. Així, es va aconseguir l'amplificació directa a la superfície de les partícules magnètiques, simplificant la metodologia. Aquesta estratègia presenta potencial aplicabilitat per a la detecció directa electroquímica de productes amplificats al termociclador de la PCR.

A l'últim bloc de la tesi es va desenvolupar una estratègia immunosensora simplificada amb detecció electroquímica, en la que l'haptè es va immobilitzar a partícules magnètiques recobertes de grups químics tosil, formant un enllaç covalent amb la molècula de naturalesa haptènica. Amb aquesta estratègia es va aconseguir quantificar l'àcid fòlic en mostres cegues de llet enriquida, obtenint valors de recuperació propers al 100%; i quantificar l'àcid fòlic en mostres reals de llet enriquida, obtenint valors molt propers als indicats a la composició dels productes.

1. INTRODUCCIÓ

1 INTRODUCCIÓ

1.1 EL GENOMA

La genètica moderna va néixer arrel dels descobriments de Gregor Mendel a mitjans del segle XIX. Els principis de la herència biològica es van descriure a partir de l'estudi de la transmissió de caràcters discrets en plantes de pèsols, com ara si la llavor era llisa o rugosa o les flors resultants eren vermelles o blanques. Mendel va determinar que l'herència era deguda a unitats portadores d'informació, que posteriorment es van anomenar *gens* [1,2].

La paraula gen prové del terme grec *genos* que significa naixement. A finals del segle XIX i principis del XX es va anunciar la teoria cromosòmica de l'herència que estableix que els gens estan situats als cromosomes i que es disposen linealment en posicions determinades dels mateixos. La natura de cada organisme depèn de la suma dels efectes dels seus gens expressats en un determinat ambient. El conjunt de gens d'un organisme s'anomena *genoma*. En organismes simples com bacteris, el genoma el formen de 2000 a 6000 gens, mentre que en organismes complexos com plantes o animals el nombre augmenta fins aproximadament 50000 gens [3]. Els gens estan formats per la molècula de DNA (àcid desoxiribonucleic) que es troba compactada en forma de cromosomes al nucli de les cèl·lules dels organismes, tal i com es mostra a la Figura 1.1. Els gens contenen la informació necessària per a la síntesi de proteïnes les quals doten de funcionalitat a les cèl·lules.

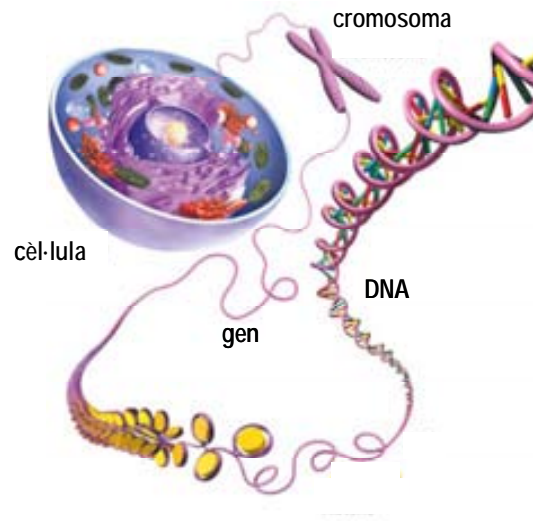


Figura 1.1: Representació del genoma a la cèl·lula a nivell de cromosoma, gen i molècula del DNA.

1.1.1 La molècula del DNA

La molècula del DNA és un polímer llarg lineal format per la successió de quatre unitats monomèriques diferents. Aquestes unitats són els nucleòtids, formats per un grup fosfat, una pentosa (desoxiribosa), i una base nitrogenada, que pot ser del tipus adenina (A), citosina (C), guanina (G) o timina (T).

Els nucleòtids s'uneixen entre si mitjançant un enllaç covalent fosfodiester entre el carboni 3' d'una desoxiribosa i el carboni 5' de la següent unitat monomèrica. Els quatre tipus de bases nitrogenades es troben fixades a la cadena repetitiva de sucres fosfatats, amb un enllaç entre el carboni 1' de cada desoxiribosa i un àtom de nitrogen específic de cada base nitrogenada. Les quatre bases nitrogenades es classifiquen en purines o pirimidines. Les bases purines (adenina i guanina) presenten una estructura d'anell doble, mentre que les bases pirimidines (citosina i timina) tenen una estructura d'anell únic.

La cadena generada per la unió successiva de nucleòtids es llegeix en direcció 5' a 3'. A l'extrem 5' es troba un grup fosfat i a l'extrem 3' un grup hidroxil que pertany a una desoxiribosa. La direcció 5' a 3' de la cadena té importància funcional i biològica, ja que la síntesi enzimàtica del DNA té lloc en aquest sentit, això vol dir que cada nucleòtid que s'uneix al polímer ho fa per l'extrem 3'. A la Figura 1.2 es mostra l'estructura de la molècula del DNA (A) i la forma esquemàtica de representar-la (B).

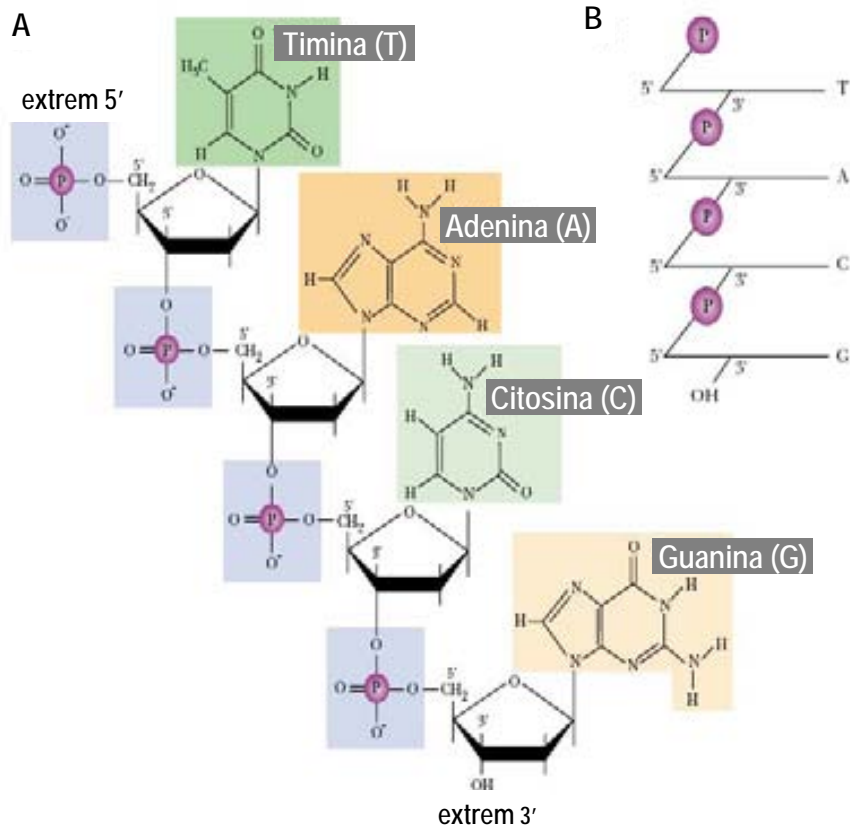


Figura 1.2: **A.** Estructura de la cadena del DNA formada per la unió de nucleòtids que contenen les quatre bases nitrogenades, purines (adenina i guanina) i pirimidines (citosina i timina). **B.** Representació esquemàtica en la que només es mostren els carbonis que intervenen en l'enllaç fosfodiéster i el tipus de base nitrogenada.

A la cadena de DNA es compleix que la relació del nombre de bases adenina i timina, i la relació de citosina i guanina, són propers a la unitat [4]. Per tant el nombre de bases adenina és similar al de bases timina. El mateix fenomen es repeteix amb bases citosina i bases guanina. Aquest fet juntament amb les dades obtingudes per cristal·lografia de raigs X proporcionades per Rosalind Franklin [5], van portar al descobriment del model de doble hèlix del DNA establert per Watson i Crick l'any 1953 [6].

Dit model estableix que el DNA està format per una espiral formada per la unió de dues cadenes polimèriques de nucleòtids en sentit oposat. A la part exterior de l'espiral estan situats els grups de pentoses i fòsfats i a la part interior les bases nitrogenades. Les dues cadenes s'uneixen mitjançant ponts d'hidrogen establerts entre les bases nitrogenades veïnes. Per raons estèriques i per la capacitat de formar ponts d'hidrogen, només és possible l'aparellament entre adenina (A) i timina (T) i entre guanina (G) i citosina (C). A i T s'uneixen amb dos ponts d'hidrogen i G i C amb tres ponts d'hidrogen, tal i com es mostra a la Figura 1.3.

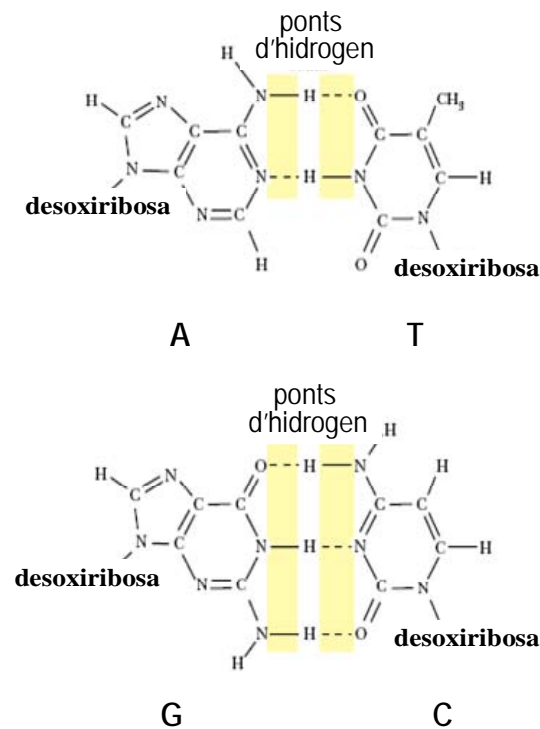


Figura 1.3: Aparellament específic de les bases nitrogenades del DNA mitjançant enllaços de pont d'hidrogen.

Les característiques més importants de la doble hèlix del DNA són les següents:

- Les dues cadenes del DNA s'uneixen específicament per la complementarietat de les bases nitrogenades (A-T i G-C). Aquest fenomen es coneix amb el terme d'hibridació.
- Les dues cadenes del DNA s'estenen en sentits oposats, són cadenes antiparal·leles. Per tant, en un extrem de la doble hèlix es troba l'extrem 5' d'una cadena i el 3' de la cadena complementària.
- La forma més estable de la hèlix del DNA és en espiral helicoidal dextrogira enroscada al voltant del seu eix en sentit contrari a les agulles d'un rellotge. Per cada volta de l'hèlix hi ha aproximadament 10 parells de nucleòtids (1 volta = 36 Å) i apareixen dues cavitats de diferent mida, el solc menor i el solc major (Figura 1.4).
- Els grups fosfats i les pentoses es troben a la part exterior de l'espiral, degut al caràcter hidròfil d'aquesta estructura. A pH fisiològic, la doble hèlix té una càrrega neta negativa deguda als àtoms d'oxigen dels grups fosfats situats a l'exterior de la cadena. En canvi, les bases nitrogenades es situen a l'interior de l'hèlix pel seu caràcter hidrofòbic, tot augmentant així l'estabilitat de la doble cadena.

- El diàmetre de la cadena és manté constant degut a la mida de les bases nitrogenades i la seva unió complementària [7,8].

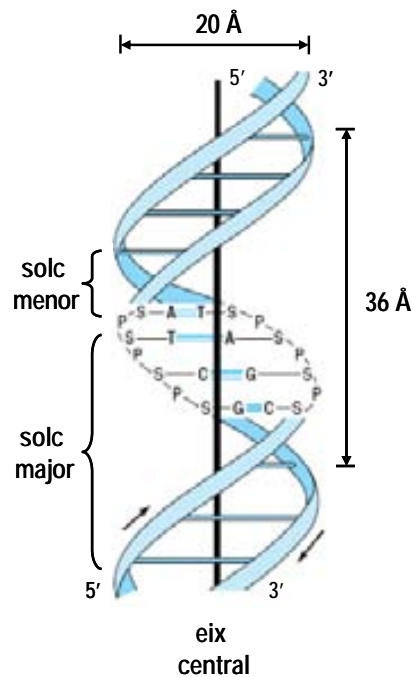


Figura 1.4: Unió de dues cadenes complementàries de nucleòtids per a formar l'estructura de doble hèlix del DNA.

En condicions fisiològiques, excepte en els moments de replicació i transcripció (§ 1.1.2), el DNA es troba en forma de doble hèlix. Cal destacar que el DNA pot adoptar una forma lineal oberta o circular tancada. Gran part del DNA dels bacteris i virus adopten formes circulars, tot i que de forma general a les cèl·lules eucariotes (cèl·lules amb nucli), el DNA s'organitza en unitats llargues de cadena lineal oberta.

1.1.2 Funcions biològiques del DNA

La molècula de DNA d'un organisme esdevé funcional quan es capaç de realitzar tres funcions biològiques fonamentals: la replicació, la transcripció i la traducció. Cadascuna d'aquestes funcions fonamentals es descriuen a continuació.

Replicació

El DNA s'ha de multiplicar abans de la divisió cel·lular per tal de que cada cèl·lula filla obtingui la mateixa informació genètica. La doble hèlix de DNA es separa i es construeixen dues noves cadenes fent servir com a motllo cadascuna de les cadenes del DNA original (Figura 1.5).

La replicació es realitza afegint desoxiribonucleòtids complementaris (A-T i C-G) a l'extrem 3' d'una de les cadenes del DNA original; aquesta reacció està catalitzada per un enzim anomenat DNA polimerasa. Cada nucleòtid afegit és en realitat un desoxiribonucleòtid trifosfat. La separació del pirofosfat d'aquest nucleòtid activat i la seva hidròlisi posterior proporciona la energia necessària per a replicar el DNA, sent una reacció irreversible. La informació genètica es duplica en la seva totalitat, formant-se dues hèlixs completes de DNA, cadascuna de les quals té la mateixa seqüència que el DNA motllo. Donat que la nova cadena de DNA està formada per una cadena original i una altra sintetitzada es diu que la replicació és semiconservativa.

Una de les característiques més importants de la replicació és l'exactitud en l'addició de nucleòtids. Per exemple en la replicació del bacteri *Escherichia coli* es comet un error per 10^9 a 10^{10} nucleòtids afegits. Per a corregir els nucleòtids situats incorrectament es fan servir diferents mecanismes correctors de tipus enzimàtic.

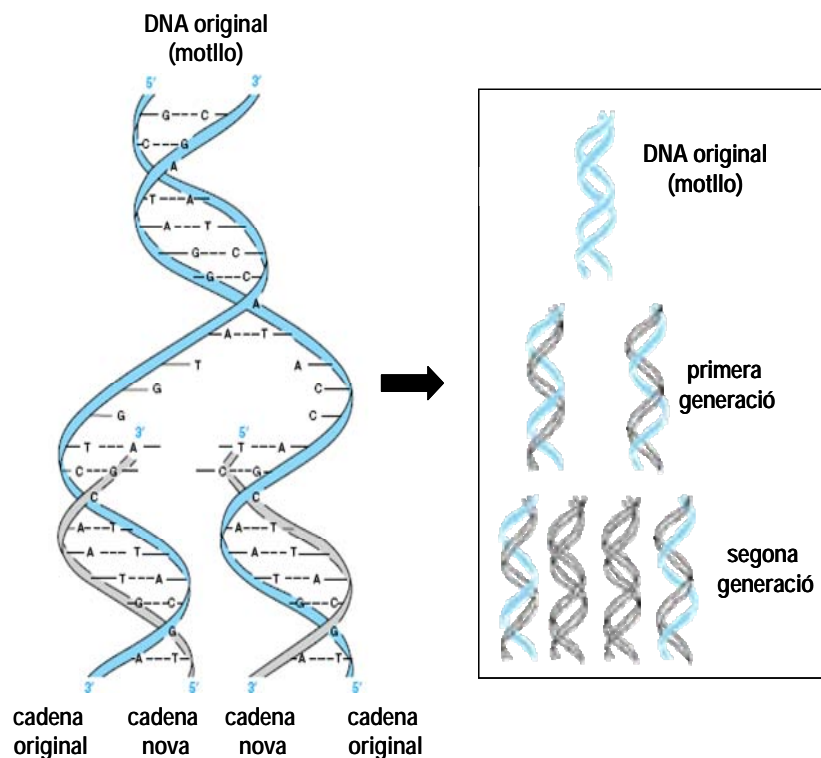


Figura 1.5: Replicació semiconservativa del DNA en la que es mostra la formació de dues còpies idèntiques al DNA original.

Transcripció

La informació genètica està en un medi segur com és el nucli cel·lular, però s'ha de traslladar al citoplasma per a realitzar la síntesi de proteïnes. Per a poder traslladar dita informació, part del DNA que correspon a un o més gens es transforma en una altra molècula anomenada RNA (àcid ribonucleic).

El RNA està format per una seqüència lineal de nucleòtids semblant a la del DNA, amb les següents diferències: els nucleòtids estan formats per una ribosa en comptes d'una desoxiribosa (la ribosa a diferència de la desoxiribosa conté un grup hidroxil al carboni 2' de la pentosa) i la base timina està substituïda per uracil (U), que també és complementària a la base adenina. El RNA conté tota la informació de la seqüència de DNA de la qual s'ha copiat i manté la propietat d'unir-se a bases complementàries.

La molècula de RNA es sintetitza de forma similar a la replicació del DNA ja que una de les cadenes es fa servir com a motllo i la síntesi té lloc amb l'addició consecutiva de nucleòtids. La transcripció del DNA a diferència de la replicació es diferencia en els següents fets:

- El RNA produït no es manté unit al DNA. Després d'incorporar els nucleòtids, l'hèlix original de DNA es torna a formar i la molècula de RNA es separa. Per tant, la molècula de RNA formada té una única cadena.
- Les molècules de RNA són relativament curtes en comparació amb les de DNA, ja que només es copia una regió limitada de DNA. Es transcriuen un o diversos gens que intervenen en la producció de proteïnes.
- Les molècules de RNA no es troben al nucli cel·lular.
- Existeixen diferents tipus de molècules de RNA: RNA missatger (mRNA), RNA de transferència (tRNA) i RNA ribosòmic (rRNA). El mRNA conté la informació dels gens per a la síntesi de proteïnes i dirigeix la síntesi juntament amb el tRNA i rRNA tal i com es descriu a la secció següent.

La quantitat de RNA sintetitzat a partir d'una regió determinada de DNA està controlada per unes proteïnes reguladores, que s'uneixen a llocs específics del DNA, prop de la seqüència codificant del gen. En funció de la situació en la que es troba la cèl·lula es dona la síntesi específica de certs RNA, com per exemple en una infecció bacteriana es sintetitzen grans quantitats de RNA relacionats amb la producció d'anticossos (§ 1.2.1).

Traducció

La informació codificada al RNA s'ha de transferir a molècules operatives com les proteïnes. Les regles a partir de les quals es tradueix la seqüència de nucleòtids a la seqüència d'aminoàcids que forma part d'una proteïna, anomenat codi genètic, es van desxifrar a principis del 1960.

La seqüència de nucleòtids de la molècula de mRNA es llegeix en ordre consecutiu i en grups de tres (*triplet*). Cada triplet de nucleòtids, anomenat codó, determina un aminoàcid. Per exemple el codó UGG (uracil-guanina-guanina) es tradueix a l'aminoàcid triptòfan (Figura 1.6). La traducció del mRNA a una proteïna depèn del RNA de transferència (tRNA) que adapta cada triplet a un aminoàcid. El mRNA es tradueix a una proteïna amb un conjunt de reaccions molt complex que té lloc al ribosoma, que és un complex de més de 50 proteïnes associades a diverses molècules de RNA ribosòmic (rRNA). El ribosoma tradueix codó per codó la seqüència del mRNA a una seqüència d'aminoàcids, fent servir molècules de tRNA per addicionar aminoàcids a la cadena de pèptids fins a l'obtenció de la proteïna final [7,8].

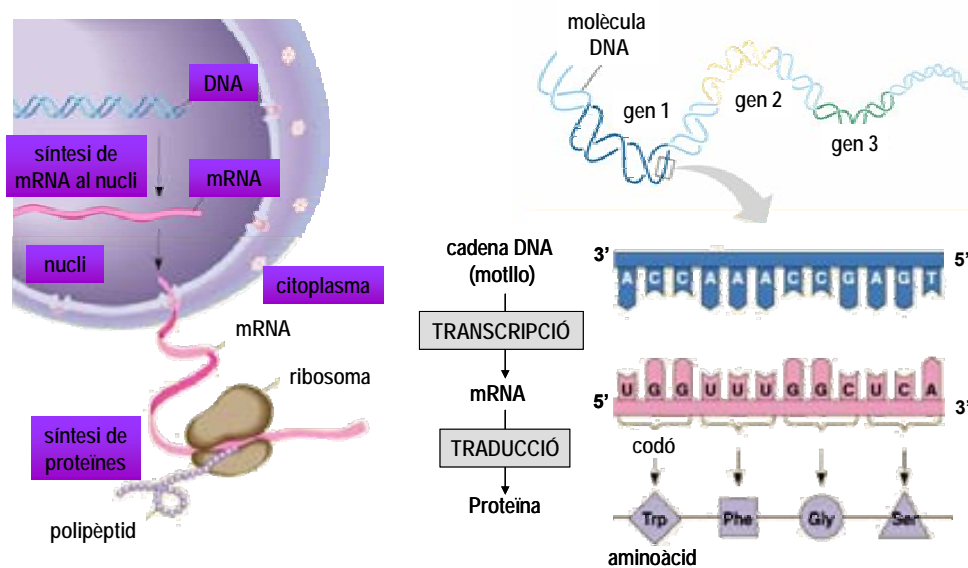


Figura 1.6: Etapes que intervenen en la síntesi de proteïnes mitjançant la traducció del mRNA format a la transcripció. A la dreta es mostra en detall la traducció dels triplets de nucleòtids del mRNA a aminoàcids.

1.1.3 Mutacions i polimorfismes

La replicació del DNA és un procés altament efectiu regulat per un sistema enzimàtic complex que elimina nucleòtids situats incorrectament durant la síntesi de cadenes complementàries. No obstant això, degut a l'elevat nombre de nucleòtids incorporats,

es donen errors que provoquen canvis a la seqüència de DNA, anomenats *mutacions*. Quan la molècula de DNA es replica aquests canvis es transfereixen a la nova generació de cèl·lules. Hi ha molts tipus de mutacions provocades per la duplicació, inversió, intercanvi o eliminació de nucleòtids. Alguns canvis afecten a cromosomes sencers i altres a una sola base. També poden produir-se canvis en el nombre de cromosomes (la majoria de casos de síndrome de Down són deguts a una còpia addicional del cromosoma 21) o redistribucions de grans segments de DNA que poden donar lloc a defectes de naixement.

Cal destacar que moltes de les mutacions no tenen efectes negatius ja que es troben en regions de DNA que no formen part de gens i per tant no produeixen cap canvi durant la síntesi de proteïnes [9]. Aquestes alteracions de DNA que no tenen cap efecte negatiu a l'organisme s'anomenen *mutacions silencioses*. Per altra banda, una mutació també pot proporcionar avantatges, com ara una millor adaptació al medi o una millora fisiològica. Aquest és un dels principals mecanismes de l'evolució, gràcies al qual han aparegut noves espècies i grups taxonòmics al llarg de la història.

Les diferències entre les seqüències de dos organismes de la mateixa espècie s'anomenen *polimorfismes*. Dits polimorfismes són els responsables de les diferències dels organismes d'una mateixa espècie. En l'esser humà per exemple es poden relacionar amb l'aspecte físic o amb la tendència a desenvolupar una malaltia. Els polimorfismes d'un sol nucleòtid (SNPs, "snips", de l'anglès *Single Nucleotide Polymorphisms*) corresponen a un canvi d'una sola base entre fragments del genoma d'individus d'una mateixa espècie. Aproximadament hi ha un polimorfisme d'un sol nucleòtid per cada 1000 o 2000 bases del genoma [3]. L'anàlisi de SNPs resulta important ja que aquests petits canvis en la seqüència estan relacionats amb el risc de patir malalties hereditàries i permeten determinar a priori la reacció d'un individu respecte certs fàrmacs [10].

1.1.4 Seqüenciació del DNA

Cada espècie posseeix un DNA característic, que es diferencia del DNA de les altres espècies en la proporció de les quatre bases nitrogenades, la massa molecular i l'ordre de les bases nitrogenades. La seqüència de nucleòtids que forma el DNA determina el missatge genètic i controla el desenvolupament de l'organisme.

Al llarg de les dècades passades es van dirigir molts esforços cap a la determinació de la seqüència de centenars de milers de gens d'una gran varietat d'organismes. La

comunitat científica va assumir el projecte massiu de determinar la seqüència completa del genoma de determinats organismes que es fan servir assíduament en estudis de bioquímica, biologia molecular i genètica. La gran quantitat d'informació generada en aquest projecte necessitava el desenvolupament de bases de dades biològiques que poguessin emmagatzemar, organitzar i fer accessible la informació a la comunitat investigadora mundial. En aquest context es va crear la primera base de dades de seqüències genètiques anomenada GenBank [11]. Aquesta base de dades és molt completa i recull les seqüències dels gens que es descobreixen abans de ser publicades a les revistes científiques. Cada gen s'identifica amb un nom i es cataloga amb un número específic d'aquesta base de dades.

Sens dubte el projecte més ambiciós es va realitzar amb la seqüenciació del genoma de l'ésser humà per part de científics del consorci internacional públic Projecte Genoma Humà (PGH) i l'empresa privada Celera Genomics, d'Estats Units. L'any 2001 es va aconseguir desxifrar gairebé la totalitat del genoma humà obtenint una seqüència de consens després de 10 anys de treball [12,13]. Posteriorment, el 2003 es va obtenir la seqüenciació completa del genoma humà.

Els resultats més rellevants obtinguts indiquen que:

- El genoma humà conté aproximadament 30000 gens. Tot i que l'ésser humà és molt complex el nombre de gens és similar als obtinguts en genomes més petits (els ratolins tenen només 300 gens menys que l'home).
- Aproximadament només un 2 % del genoma codifica proteïnes.
- Més del 50 % del genoma no té cap funció biològica.
- Els éssers humans són idèntics en un 99.9 %. La majoria de les diferències entre persones es poden explicar per canvis discrets de nucleòtids basats en SNPs (§1.1.3) [14].
- Es coneixen aproximadament 1000 mutacions que indiquen el risc de patir una malaltia i quan succeirà [15].

Gràcies a l'estudi del genoma, s'han obert noves vies d'investigació relacionades amb la curació de malalties, com ara l'Alzheimer o el càncer de pit. Es podran diagnosticar les malalties més ràpidament per a realitzar un tractament més eficient. També es podran prescriure els medicaments més adients per al tractament d'una malaltia en funció de cada pacient. Fins i tot es creu que serà possible la substitució de gens defectuosos per gens sans mitjançant la teràpia gènica [16].

1.2 EL SISTEMA IMMUNITARI

La immunitat és la capacitat que té un organisme per a defensar-se d'un element estrany. La paraula immunitat prové del terme llatí *immunitas*, que es refereix a un privilegi que tenien els senadors romans de l'excepció d'alguns deures cívics i persecució legal. Es creu que va ser Tucídides al segle V a.C qui va fer servir en primer lloc aquest concepte per a referir-se a la resistència de certes persones a malalties infeccioses. El sistema immunitari està format pel conjunt de molècules i cèl·lules que confereixen la immunitat i té com a funció reconèixer un element estrany i desencadenar un conjunt de mecanismes per tal d'eliminar-lo. Qualsevol molècula estranya per l'organisme que sigui capaç d'estimular la resposta immune s'anomena *antigen*. En la majoria de casos els elements estranys són agents infecciosos (bacteris, virus o paràsits), tot i que substàncies de naturalesa no infecciosa també poden provocar resposta immunitària.

La resposta immune consisteix en dos sistemes complementaris: el sistema immune cel·lular i l'humoral. En el sistema immune cel·lular els limfòcits destrueixen cèl·lules infectades per virus o paràsits mitjançant unes proteïnes situades a la membrana dels limfòcits anomenades receptors. En canvi, en el sistema immune humoral, els limfòcits produeixen unes proteïnes anomenades anticossos que s'uneixen a bacteris, virus o grans molècules per tal d'eliminar-los. Els anticossos representen l'eix fonamental de les tècniques clàssiques d'anàlisi immunològica, ja que es fan servir com a reactius per a la detecció i/o quantificació d'antígens (§ 1.3.2). L'estructura dels anticossos es descriu a continuació [17].

1.2.1 Els anticossos

Els anticossos són glicoproteïnes presents de forma soluble a la sang i a la limfa, amb un pes molecular aproximat de 150 KDa. Pertanyen a un grup de proteïnes anomenades immunoglobulines (Ig) que es divideixen en cinc grups (IgG, IgM, IgA, IgD i IgE) en funció de petits canvis en la seva estructura. La immunoglobulina IgG és la més abundant al sèrum sanguini (80 %).

Totes les immunoglobulines estan formades per quatre cadenes de polipèptids, dues cadenes pesants i dues cadenes lleugeres, idèntiques entre si i unides per ponts disulfur, formant una estructura en forma de Y (Figura 1.7). Les cadenes pesades i lleugeres presenten regions variables (V) a l'extrem amino de la proteïna (extrem N-

terminal) i regions constants (C) a l'extrem carboxil (extrem C-terminal). Les regions variables interaccionen amb l'antigen i determinen la especificitat de l'anticòs.

L'acció de l'enzim proteolític papaïna sobre els anticossos permet obtenir tres fragments de la mateixa mida. Dos dels fragments són idèntics, són els fragments Fab (de l'anglès *antigen binding Fragment*), cadascun dels quals permet la unió amb un antigen. L'altre fragment és el Fc (de l'anglès *crystallizable Fragment*), que està relacionat amb moltes de les funcions que duen a terme els anticossos. Per tant, cada anticòs està format de dos fragments Fab que permeten la unió de dos antigens [18].

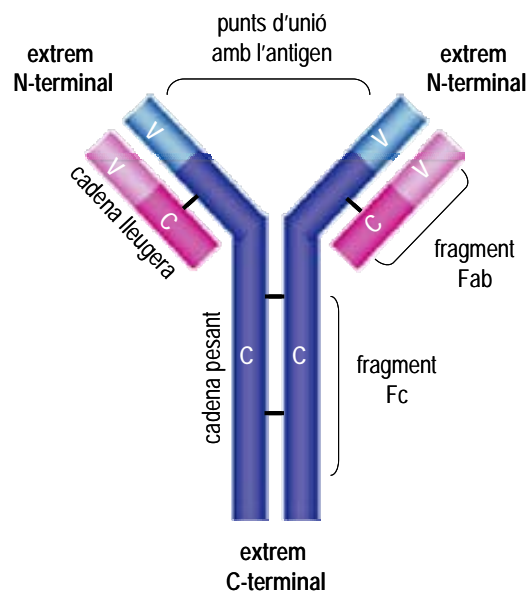


Figura 1.7: Estructura molecular típica d'un anticòs.

1.2.2 El reconeixement antigènic

Generalment els anticossos són altament específics i són capaços de discernir entre petites variacions de l'antigen. La capacitat de reconeixement de l'anticòs per un antigen depèn de la conformació del fragment Fab de l'anticòs, que alhora depèn de la variabilitat de la seqüència d'aminoàcids que formen el fragment. La interacció antigen-anticòs s'estableix entre residus d'aminoàcids de l'anticòs (paratop) i una petita part de l'antigen que és complementària (epítop). Normalment un antigen és capaç d'induir la producció de diferents anticossos, cadascun capaç de reaccionar amb un epítop diferent de l'antigen.

L'elevada afinitat entre antigen i anticòs és deguda a múltiples forces no covalents entre l'antigen i diferents aminoàcids de la regió d'unió de l'anticòs. Aquestes forces són, de la més feble a la més forta: 1) ponts d'hidrogen, 2) interaccions

electrostàtiques, 3) forces de Van der Waals i 4) interaccions hidrofòbiques. Totes són més febles que les interaccions de tipus covalent, però tenen caràcter cooperatiu. La suma de les forces, tant d'atracció com de repulsió, es coneix com a afinitat d'un anticòs per un antigen. L'afinitat és inversament proporcional a la distància dels grups que participen en la interacció. Per a minimitzar la distància i augmentar l'afinitat de l'anticòs i l'antigen, les estructures de l'epítip i el paratop han de ser complementàries. Canvis petits en l'estructura de l'epítip poden provocar una disminució brusca de l'afinitat entre anticòs i antigen. La unió entre anticòs (Ab) i antigen (Ag) és un equilibri termodinàmic representat per la següent equació:



Normalment l'equilibri està altament desplaçat a la dreta, amb valors de K_a compresos en l'interval 10^8 - 10^{10} M^{-1} [17,18].

1.2.3 Funcions dels anticossos

La unió antigen-anticòs activa un conjunt de mecanismes biològics que tenen com a objectiu l'eliminació de possibles efectes adversos d'una molècula estranya a l'organisme. Aquests mecanismes són els següents:

- Neutralització d'agents patogènics que ataquen a les cèl·lules mitjançant la interacció amb receptors específics de la membrana cel·lular.
- Inhibició de l'entrada d'agents estranys mitjançant l'activació d'un sistema complex de defensa de l'organisme.
- Unió de l'anticòs a bacteris per a facilitar el reconeixement per part de les cèl·lules fagocitàries i així realitzar la ingestió i degradació del bacteri.
- Recobriments de cèl·lules estranyes amb anticossos per tal de promoure la lisi cel·lular.

Cal destacar que els limfòcits també participen en la resposta immune mitjançant la interacció de l'antigen amb receptors de la membrana cel·lular [17].

1.3 TÈCNIQUES GENÈTIQUES I IMMUNOLÒGIQUES CLÀSSIQUES

1.3.1 Tècniques d'anàlisi del DNA

El desenvolupament de tècniques d'anàlisi de seqüències específiques de DNA té una importància rellevant en camps tan diversos com l'alimentari, el mediambiental o la investigació forense. Les tècniques d'anàlisi del DNA es poden classificar en estratègies de seqüenciació i d'hibridació. La seqüenciació implica l'ús de tècniques complexes per a determinar l'ordre dels nucleòtids que formen el fragment d'interès, és a dir, la seva seqüència. En canvi, les estratègies d'hibridació són més simples i per aquesta raó són les que es fan servir més assíduament als laboratoris [19].

A les estratègies d'hibridació, el DNA anàlit és reconegut per una seqüència sonda de DNA formant una doble hèlix. Aquest fenomen, conegut com hibridació, és altament específic ja que depèn de la unió inequívoca de les bases nitrogenades adenina-timina i guanina-citosina (§ 1.1.1) que formen cada cadena. Les estratègies basades en la hibridació impliquen que la seqüència anàlit sigui coneguda, per tal de fer servir una seqüència sonda que sigui complementària. Les seqüències sonda solen tenir una longitud de 18 a 30 nucleòtids i s'obtenen habitualment de forma sintètica en grans quantitats amb mètodes ràpids i relativament econòmics. Per tal d'evidenciar el fenomen d'hibridació es sol marcar la seqüència sonda. El marcatge clàssic, basat en la funcionalització amb radioisòtops com ^{32}P , ^{33}P o ^{35}S , ha caigut en desús degut a la dificultat i perillositat de la manipulació d'elements radioactius. Com a mètode alternatiu destaca el marcatge enzimàtic on la sonda és funcionalitzada amb enzims com la fosfatasa alcalina, la glucosa oxidasa i la peroxidasa de rave picant (HRP, de l'anglès *Horseradish Peroxidase*). També es pot realitzar un marcatge indirecte, tot unint molècules covalentment a les seqüències, com ara la digoxigenina, i detectant en aquest cas la hibridació mitjançant un conjugat enzimàtic de l'anticòs antidigoxigenina (antiDIG).

Les estratègies d'hibridació es poden classificar en dos formats:

- Hibridació en fase sòlida: el DNA anàlit està fixat a un suport sòlid com nitrocel·lulosa o membrana de niló. Després de realitzar la hibridació amb una sonda marcada els reactius no units s'eliminen.
- Hibridació en fase líquida: la unió DNA anàlit - sonda marcada té lloc en solució i posteriorment l'híbrid format es sol separar de la solució capturant-lo amb un suport sòlid [20].

Les estratègies d'hibridació són altament específiques però estan limitades per llur sensibilitat atès que en moltes situacions el DNA original no es pot detectar directament. La sensibilitat d'aquestes estratègies es pot millorar amplificant sintèticament el DNA original mitjançant una tècnica anomenada PCR [21]. Aquesta tècnica basada en la hibridació en fase líquida presenta la possibilitat de poder quantificar el producte amplificat sense la necessitat d'immobilitzar el DNA en un suport sòlid.

1.3.1.1 Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)

L'any 1983, el bioquímic Kary Mullis va desenvolupar una tècnica per amplificar el DNA de forma artificial anomenada *reacció en cadena de la polimerasa* (PCR, de l'anglès *Polymerase Chain Reaction*) [22,23]. Gràcies a la PCR, la detecció de quantitats ínfimes de DNA ha deixat de ser una limitació en camps com el diagnòstic clínic o l'anàlisi forense; per la qual cosa el 1993 es va reconèixer la importància del descobriment i Kary Mullis va ser guardonat amb el Premi Nobel de Química.

La PCR és una tècnica de síntesi enzimàtica de seqüències de DNA mitjançant cicles repetitius en els que es va variant la temperatura. A cada cicle es poden identificar tres passos diferenciats (Figura 1.8):

1. Desnaturalització: Separació de la doble cadena de DNA que es vol amplificar incrementant la temperatura a 95 °C, obtenint dues cadenes simples.
2. Hibridació dels encebadors: Unió de dos oligonucleòtids anomenats *encebadors* (en anglès, *primers*) a l'extrem de cada cadena simple formada, mitjançant la complementarietat de les bases nitrogenades. Aquest fet s'aconsegueix per refredament a 50 °C aproximadament ja que varia en funció de la seqüència del parell d'encebadors emprat.
3. Elongació: Extensió de cada cadena simple del DNA en direcció 5' a 3' amb l'acció d'un enzim termostable que catalitza la incorporació de nucleòtids adjacents a cada encebador unit prèviament. L'enzim emprat és la Taq DNA polimerasa provinent del bacteri termòfil *Thermus aquaticus* [24]. Aquest pas es realitza a 72°C ja que es la temperatura òptima a la que treballa l'enzim.

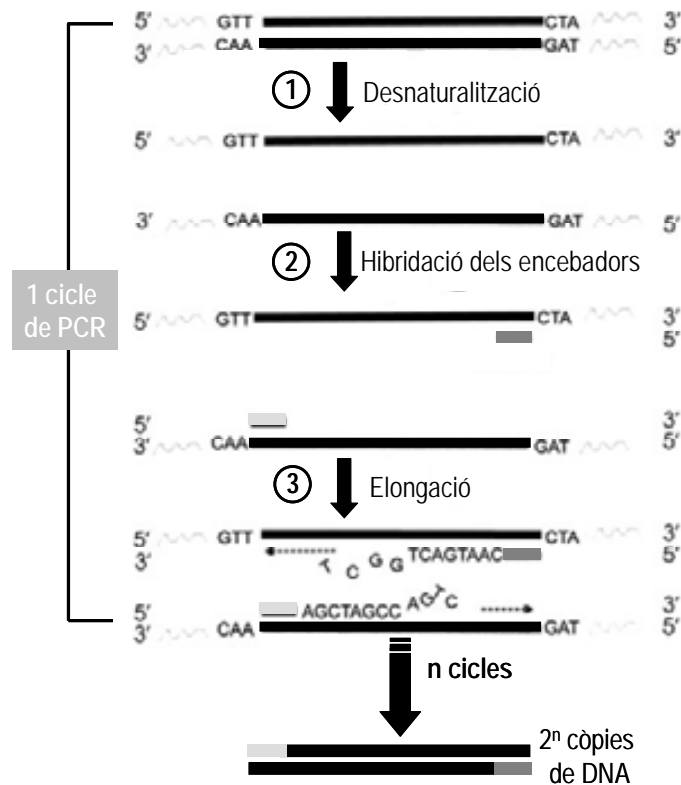


Figura 1.8: Esquema de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR). A la figura es mostren els tres passos de l'amplificació: desnaturalització, hibridació dels encebadors i elongació.

Després de cada cicle el DNA es duplica i cada còpia pot actuar com a motllo del següent cicle. El DNA s'amplifica exponencialment al llarg dels cicles obtenint 2^n còpies, on n correspon al nombre de cicles, que normalment sol estar compres entre 25 i 40. Així amb 30 cicles d'amplificació s'obtenen de l'ordre de 10^9 còpies de DNA partint d'una única còpia de DNA anàlit en la mostra original. El temps total que requereix l'amplificació oscil·la entre 1.5 i 3 hores.

El disseny dels encebadors és un dels factors crítics que determina l'especificitat de la PCR. Cal escollir una seqüència que s'uneixi únicament al fragment de DNA que es vol amplificar. Els encebadors són habitualment sintètics i tenen una longitud de 25 a 30 parells de bases per a conferir suficient especificitat. El disseny dels encebadors s'avalua amb programes informàtics que comparen la seqüència del DNA anàlit amb altres fragments de DNA que es troben seqüenciats en bases de dades gèniques per tal d'evitar reaccions creuades i falsos positius.

La temperatura o el temps de cada pas són paràmetres que cal controlar per a millorar l'especificitat de l'amplificació. La temperatura en el pas d'hibridació dels encebadors és un dels factors crítics. Si la temperatura és massa elevada, els encebadors tenen tendència a no hibridar-se (deshibridació), i si és massa baixa, la hibridació és poc específica. Per tant, s'ha d'escollir una situació de compromís que aporti una bona

especificitat. La hibridació de l'encebador ve determinada pel seu valor de temperatura de fusió (T_m , de l'anglès *melting temperature*) que indica la temperatura a la que un 50% de la seqüència està hibridada. El valor de T_m depèn de la longitud de la seqüència, la proporció de les bases nitrogenades G-C, A-T i està influenciat pel pH i la força iònica de la solució. La temperatura d'hibridació és un factor que cal optimitzar prèviament per a que els encebadors siguin suficientment específics del fragment que cal amplificar.

La PCR és en un procés relativament fàcil en el qual calen els següents elements bàsics: 1) DNA inicial que actuï com a motllo, 2) un parell d'encebadors específics, 3) nucleòtids, 4) DNA polimerasa termostable i 5) solució amortidora que contingui ions Mg^{2+} , cations necessaris per al funcionament de l'enzim.

Els nucleòtids i els encebadors han d'estar en excés per tal de que no limitin l'amplificació. L'amplificació del DNA es realitza en uns tubs de PCR especialment dissenyats per a que es puguin introduir en unes cavitats d'un bloc d'alumini d'un termociclador, que permet variar la temperatura ràpidament i de forma reproducible i precisa. La velocitat d'escalfament/refredament d'aquests equips és de 1 a 2 °C per segon i els volums típics de la reacció oscil·len entre 10 i 100 µl.

El producte amplificat per PCR s'analitza per electroforesi de gel d'agarosa. La migració del producte en el gel depèn de la mida molecular del fragment amplificat; quan més gran és el fragment menor és el seu desplaçament. El fragment es visualitza amb l'addició de bromur d'etidi que s'intercala a la doble cadena de DNA i emet una fluorescència intensa en ser irradiat amb llum ultraviolada. La banda obtinguda en el gel es compara amb les bandes d'un marcador que conté fragments de diferents pesos moleculars, entre els que es troba el pes molecular del fragment que es pretenia amplificar.

La PCR és una tècnica important per amplificar seqüències de DNA d'interès analític, però també es pot fer servir per a marcar el producte amplificat i facilitar així la seva detecció. El marcatge es realitza amb la introducció d'encebadors o nucleòtids marcats amb molècules radioactives, fluorescents, enzims (peroxidasa o fosfatasa alcalina) o molècules com biotina o digoxigenina [25,26].

Actualment existeixen moltes variants de la PCR entre les quals hi destaquen les següents:

- RT-PCR (de l'anglès *Reverse Transcriptase PCR*): permet l'amplificació de mRNA convertint-lo prèviament a DNA amb un enzim anomenat transcriptasa reversa. Posteriorment, el DNA complementari format (cDNA), s'amplifica per PCR. Aquesta tècnica és important per a l'estudi de l'expressió dels gens, ja que el mRNA conté la informació necessària per a la codificació de proteïnes, que només s'expressa en moments determinats de la cèl·lula [27,28] .
- PCR multiplex: fa servir més d'un parell d'encebadors en la mateixa reacció per produir l'amplificació de més d'un gen o fragment de DNA d'un mateix organisme, o diferents organismes [27,29].
- PCR *in situ*: permet l'amplificació directa de DNA o RNA dins de cèl·lules o teixits. La detecció del producte amplificat es realitza amb la hibridació de sondes marcades. La permeabilitat de les cèl·lules o teixits mitjançant reactius com l'etanol, HCl o enzims proteases permet l'entrada dels reactius necessaris per a realitzar l'amplificació [30,31].
- PCR a temps real: combina l'amplificació del DNA amb la detecció del producte amplificat al llarg dels cicles de la PCR, a temps real. Aquesta variant de la PCR ha suposat un gran avanç ja que a part de detectar un fragment de DNA específic també permet quantificar el DNA original present a la mostra. Les característiques d'aquesta tècnica es descriuen al següent apartat.

1.3.1.2 PCR a temps real

La PCR a temps real (en anglès *real-time PCR*), també anomenada PCR quantitativa (*qPCR*, de l'anglès *quantitative-PCR*), és una tècnica d'amplificació i quantificació simultània del producte amplificat. La detecció directa s'aconsegueix amb la introducció de sondes o molècules fluorescents que permeten fer el seguiment de l'amplificació del producte d'interès a cada cicle de la PCR. Aquesta tècnica no requereix manipulacions posteriors després de fer l'amplificació, com la preparació d'electroforesi de gel d'agarosa, evitant així l'ús de reactius cancerígens (bromur d'etidi) i reduint el risc de contaminació al manipular la mostra. Addicionalment, és més ràpida que la PCR convencional, ja que requereix menys cicles per a obtenir suficient producte amplificat que es pugui detectar per fluorescència.

Actualment existeixen moltes estratègies per a la detecció dels productes de PCR. L'estratègia més simple i econòmica és la que fa servir unes molècules que s'intercalen a la doble cadena del DNA; les més emprades són les anomenades SYBR

Green I [32]. Les molècules no unides presenten una fluorescència menyspreable, però en unir-se al DNA de doble cadena la radiació fluorescent augmenta (Figura 1.9). L'estratègia és genèrica, ja que fa servir el mateix reactiu per a la detecció de diferents fragments amplificats. Això implica que l'estratègia sigui poc específica, ja que les molècules fluorescentes també es poden intercalar amb productes de doble cadena no específics de l'amplificació, com per exemple dímers d'encebadors (encebadors units entre ells) [33]. L'especificitat de la reacció únicament ve determinada pels encebadors. Per tant, aquesta estratègia es pot fer servir per a quantificar productes d'amplificació en una PCR optimitzada amb encebadors específics.

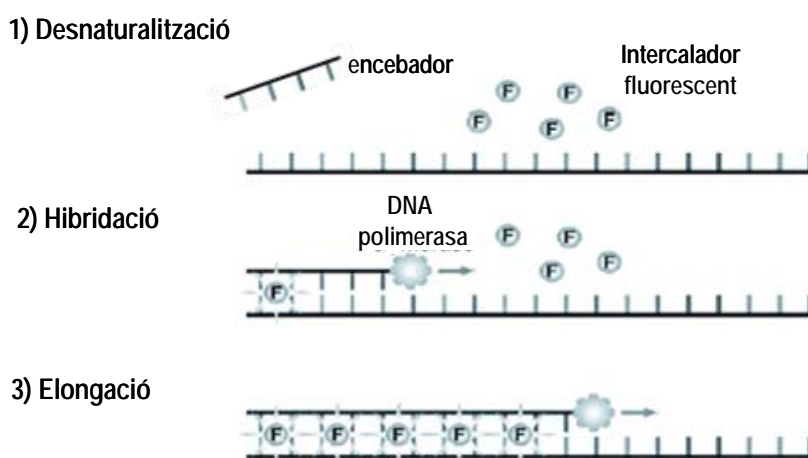


Figura 1.9: Detecció del producte amplificat per PCR amb molècules fluorescentes (SYBR Green I). (1) A l'etapa de desnaturalització les molècules no emeten fluorescència, (2 i 3) les molècules s'intercalen al DNA de doble cadena generant fluorescència.

Per millorar l'especificitat de l'amplificació es fan servir unes estratègies basades en sondes que s'hibriden amb una seqüència interna del fragment que es vol amplificar. Les més conegudes són les sondes Taqman, els *beacons* i les sondes d'hibridació. En tots els casos, aquestes estratègies proporcionen un senyal fluorescent que augmenta en cada cicle de l'amplificació.

L'estratègia de sondes Taqman es basa en l'activitat 5'→3' exonucleasa de l'enzim Taq DNA polimerasa [34] i en l'ús d'una sonda fluorescent doblement marcada. La sonda és un oligonucleòtid amb un grup emissor de fluorescència (en anglès *reporter*) a l'extrem 5' i un grup apagador (en anglès *quencher*) a l'extrem 3', amb una seqüència específica que li permet hibridar-se amb una regió que es troba entre els dos encebadors. Després del pas de desnaturalització la sonda Taqman s'hibrida al DNA anàlit i es manté intacta de forma que el *quencher* absorbeix la fluorescència del *reporter* al trobar-se molt pròxims, donant-se el fenomen FRET (de l'anglès

Fluorescence Resonance Energy Transfer) i no s'emet fluorescència [35]. Al pas d'elongació dels encebadors, la sonda Taqman s'hidrolitza per l'activitat 5'→3' exonucleasa de la Taq polimerasa, el *reporter* es separa del *quencher* i s'emet radiació fluorescent (Figura 1.10). L'increment de fluorescència es registra a cada cicle de l'amplificació i es relaciona directament amb l'amplificació del fragment del DNA d'interès [36]. Les sondes Taqman es fan servir assíduament en la investigació i diagnòstic; algunes aplicacions són la detecció de gens [37] o la quantificació de virus [38,39].

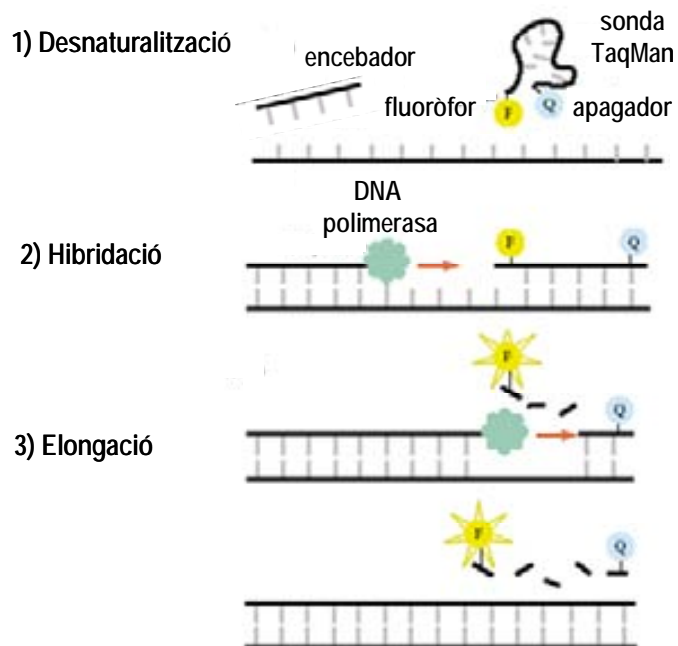


Figura 1:10: Detecció del producte amplificat per PCR amb el sistema TaqMan. (1 i 2) Després de la desnaturalització, els encebadors i la sonda Taqman s'hibriden al DNA, no hi ha fluorescència per la proximitat del fluoròfor (F) i la molècula apagadora (Q). (3) Durant l'elongació la sonda Taqman es digerida per l'activitat de la Taq polimerasa, fent que F i Q es separin, i el fluoròfor emeti fluorescència.

Els *beacons* o alimares moleculars són unes sondes que tenen una estructura de forqueta amb un fluoròfor a l'extrem 5' i un grup apagador a l'extrem 3'. Aquesta estructura té dues parts, una seqüència interna complementària al DNA anàlit (en anglès *loop*) i una part complementària entre sí (en anglès *stem*) als extrems. En el pas de la desnaturalització la sonda adopta forma de forqueta i no hi ha emissió de fluorescència, ja que el fluoròfor i l'apagador estan molt propers. Quan el *loop* de la sonda s'hibrida amb el DNA anàlit, la sonda adopta una estructura lineal, no es dona FRET i per tant s'emet fluorescència. Després de l'elongació, el *beacon* torna a adoptar la forma de forqueta i deixa d'emetre fluorescència (Figura 1.11) [40].

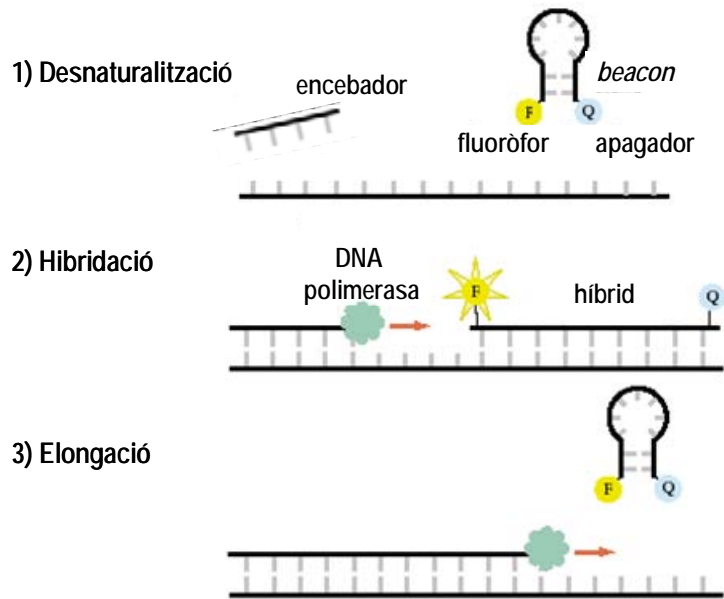


Figura 1.11: Detecció del producte amplificat per PCR amb *beacons*. (1) A la desnaturalització el beacon es troba en forma de forqueta i no emet fluorescència. (2) L'estructura adopta una forma lineal per a hibridar-se amb el DNA anàlit, separant-se el fluoròfor (F) i la molècula apagadora (Q) i el fluoròfor emet fluorescència. (3) En l'elongació el beacon es deshibrida i adquireix novament la forma de forqueta.

Els *beacons* són realment útils per a la identificació de mutacions, ja que poden discernir DNA anàlits que únicament difereixen en una sola base [41,42] i són més específics que les sondes convencionals de mida equivalent [43].

L'estratègia de sondes d'hibridació es basa en dos oligonucleòtids marcats, un amb un fluoròfor donador i l'altre amb un fluoròfor acceptor. Després de la desnaturalització aquestes sondes s'hibriden amb el DNA anàlit i els dos fluoròfors queden en contacte. El fluoròfor donador transfereix la seva energia al fluoròfor acceptor, el qual dissipa la fluorescència a una longitud d'ona diferent (Figura 1.12). L'augment de l'emissió de fluorescència en l'etapa d'hibridació és directament proporcional a la quantitat de producte amplificat generat [44]. Exemples d'aquest tipus de detecció són la detecció de mutacions [45], de patògens [46] i la quantificació vírica [47]. Aquesta estratègia té una elevada especificitat ja que la fluorescència és el resultat directe de la hibridació de dues seqüències independents. En canvi, presenta el desavantatge que el senyal fluorescent disminueix amb un nombre elevat de cicles, en contrast amb les sondes TaqMan.

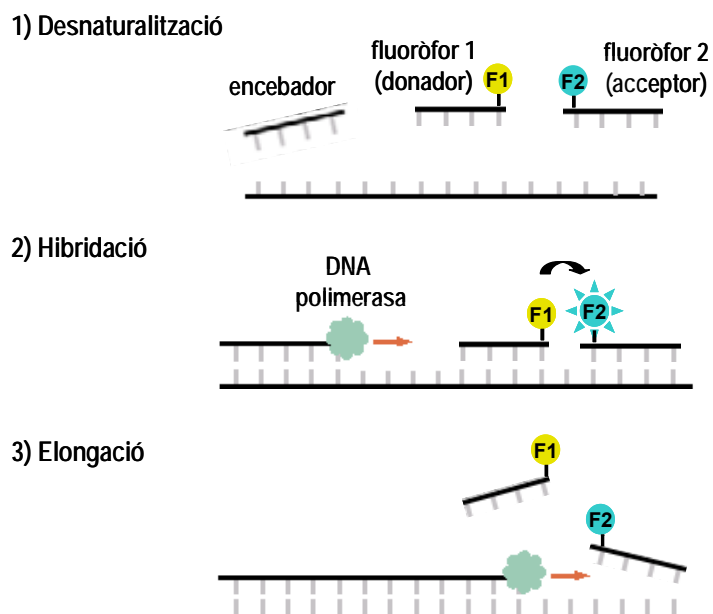


Figura 1.12: Detecció del producte amplificat per PCR amb sondes d'hibridació. (1) En la desnaturalització les sondes no estan hibridades i no emeten fluorescència, (2) les sondes s'hibriden amb el DNA anàlit i el fluoròfor acceptor emet fluorescència, (3) en l'elongació les sondes es separen i s'extingeix la fluorescència.

1.3.1.3 Anàlisi de la corba d'amplificació de la PCR

L'amplificació a temps real es realitza amb uns equips de PCR i un programari que representa l'emissió de fluorescència respecte el nombre de cicles de la PCR. El gràfic obtingut és una corba sigmoïdal amb quatre fases clarament diferenciades (Figura 1.13):

1. Fase de línia base: el senyal proporcionat pels productes amplificats és baix i no es diferencia del senyal de fons. Habitualment comprèn els 10-15 primers cicles de la PCR.
2. Fase exponencial: a l'inici d'aquesta fase el senyal fluorescent és significativament diferent del senyal de fons. Període òptim d'amplificació en el que el producte de PCR es duplica a cada cicle en condicions ideals (suposant eficiència del 100%). En aquesta fase la reacció és molt específica i precisa.
3. Fase lineal: els components de la reacció de PCR passen a ser un factor limitant (encebadors, nucleòtids, Taq polimerasa o marcador). La reacció és més lenta i els productes es comencen a degradar.
4. Fase *plateau*: finalitza l'amplificació [48,49].

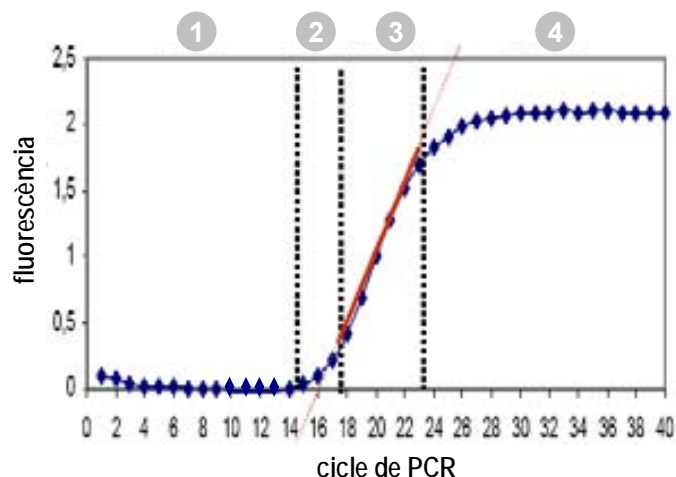


Figura 1.13: Corba d'amplificació característica de PCR a temps real on es mostren les quatre fases diferenciades: (1) línia base, (2) exponencial, (3) lineal i (4) *plateau*.

La fase exponencial és la única que es pot relacionar amb la quantitat original de DNA a la mostra. Durant aquesta fase es determina el senyal fluorescent llindar (en anglès *threshold*), amb el qual totes les mostres es poden comparar. El llindar és el valor de fluorescència que es significativament més gran que el senyal de la línia base, calculat com a 10 cops la desviació estàndard del valor mitjà de la línia base. El nombre de cicles necessaris per a generar el senyal llindar s'anomena *cicle llindar* (Ct, de l'anglès *threshold cycle*) [50]. Al gràfic d'amplificació el llindar és la línia paral·lela a l'eix d'abscisses que talla el gràfic al valor de Ct (Figura 1.14, A). La fluorescència es sol normalitzar amb una referència passiva, que és una molècula fluorescent que normalitza el senyal del fluoròfor respecte canvis de volum sense interferir l'amplificació. La normalització (ΔR_n) s'obté restant al senyal del fluoròfor el senyal de la referència passiva.

La concentració de DNA inicial en una mostra incògnita es pot quantificar amb el mètode de la corba estàndard [51,52]. Aquest mètode es basa en la construcció d'una corba de calibrat amb els valors de Ct obtinguts per a dilucions seriades del DNA d'interès de concentració coneguda; habitualment dilucions seriades 1/10. Quan més gran és la dilució més gran és el valor de Ct. Els valors de Ct obtinguts es representen respecte la quantitat inicial de DNA de cadascuna de les dilucions (N_0). El calibrat segueix la següent equació [53]:

$$Ct = k \cdot \log N_0 + Ct(1)$$

La quantificació del DNA es realitza interpolant el valor Ct de la mostra incògnita a la corba construïda (Figura 1.14, B).

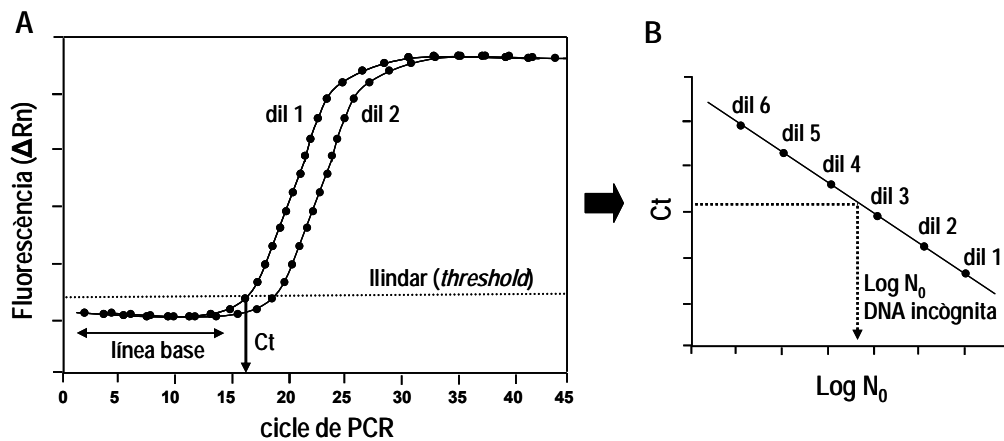


Figura 1.14: (A) Corba d'amplificació de PCR a temps real on es mostren els paràmetres clau: línia base, llindar, Ct i Rn. (B) Quantificació del DNA de mostra incògnita mitjançant els valors de Ct de dilucions de referència (dil 1 és la més concentrada i dil 6 la més diluïda).

El pendent de la recta de calibrat està relacionat amb un paràmetre anomenat eficiència de l'amplificació segons la següent expressió:

$$E = 10^{(-1/k)} - 1$$

L'eficiència indica si el DNA es duplica a cada cicle en la fase exponencial, en condicions ideals d'amplificació el seu valor pren el valor de 1 (100%), que equival a un pendent de la recta de calibrat (k) de -3.32. Per a que el mètode de quantificació de la corba estàndard es pugui aplicar l'eficiència de l'amplificació ha de ser propera al 100% [50].

1.3.2 Tècniques d'anàlisi immunològica

Avui dia els anticossos es fan servir àmpliament als laboratoris d'investigació i diagnòstic ja que permeten la identificació i/o quantificació d'antígens amb un grau d'especificitat i sensibilitat molt elevat. La detecció de cada antigen requereix la producció d'un anticòs específic, el seu aïllament i en moltes ocasions, la seva purificació. Les molècules estranyes que activen la resposta immunitària d'un organisme s'anomenen *immunògens*. Els immunògens habitualment tenen un pes molecular elevat (> 10 KDa) i una gran complexitat estructural. Quan es vol obtenir resposta immunitària en animals per a la producció d'anticossos específics de molècules més petites (< 1 KDa), tals com toxines, antibiòtics o hormones, cal unir-les (conjugar-les) a molècules més grans de naturalesa proteica estranyes a l'organisme, com la seroalbúmina i ovoalbúmina bovina (BSA i OVA) i la proteïna KLH (de l'anglès *Keyhole Limpet Hemocyanin*). En aquest sistema la molècula més petita s'anomena

haptè i la macromolècula conjugada, *portador* (en anglès *carrier*). Els complexos haptè/portador actuen com a immunogen i són la base per a l'obtenció d'anticossos específics d'antígens per a tècniques d'anàlisi immunològica. En la producció d'anticossos amb aquests complexos es diferencien les següents etapes: (1) disseny de l'haptè, (2) síntesi, (3) conjugació proteica, (4) immunització de l'hoste i (5) anàlisi de la concentració d'anticossos al llarg del temps [18].

La resposta natural de l'organisme hoste immunitzat és la de produir anticossos policlonals, és a dir, l'organisme produeix diferents anticossos, cadascun capaç de reaccionar amb un epítop de l'antigen. Els anticossos policlonals poden presentar problemes de reactivitat creuada amb altres proteïnes que no són l'antigen específic i el seu subministrament està limitat per la mort de l'animal. Aquests desavantatges es van solucionar amb la producció d'anticossos monoclonals a partir del descobriment el 1975 de la tecnologia d'hibridoma (Premi Nobel de Medicina, atorgat a César Milstein al 1984). Els anticossos monoclonals són anticossos idèntics que deriven d'una única cèl·lula creada de la fusió de limfòcits amb cèl·lules de mieloma (hibridoma). Les cèl·lules fusionades es fan créixer en un medi (HAT) en el que només creixen les cèl·lules híbrides (Figura 1.15). Tot i que el procés de producció d'anticossos monoclonals és més complex i costós, s'aconsegueixen produir anticossos idèntics, específics i de forma il·limitada.

Els anticossos monoclonals o policlonals s'ha comprovat que són efectius en diferents aplicacions biològiques. Els anticossos policlonals són menys específics que els monoclonals però aporten més sensibilitat a l'assaig, per tant el seu ús dependrà de l'aplicació en concret [54].

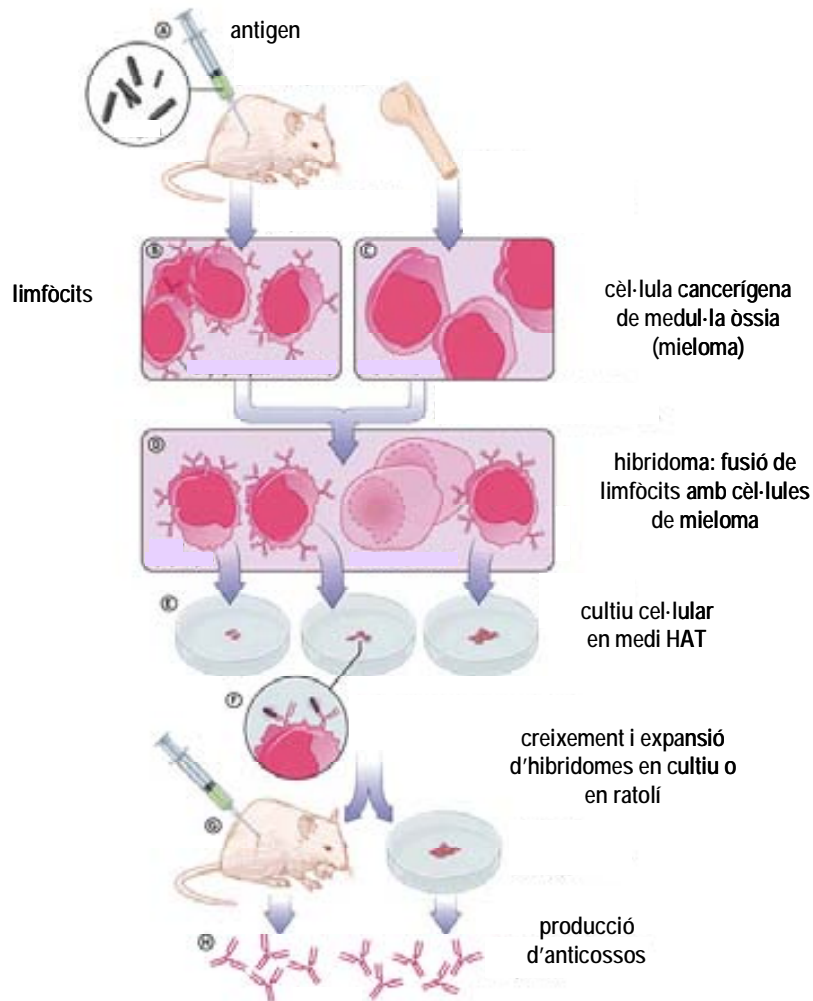


Figura 1.15: Etapes en la producció d'anticossos monoclonals.

Fins a mitjans dels anys 50 les tècniques d'anàlisi immunològica es basaven en la formació del complex antigen-anticòs en solució i la posterior detecció mitjançant la dispersió de llum o la formació de precipitats del complex en gels. Aquestes tècniques no eren prou sensibles, podien generar senyals erronis per la presència d'espècies interferents i majoritàriament s'aplicaven a l'anàlisi de molècules grans. Posteriorment a finals dels anys 60 es va desenvolupar la tècnica RIA (de l'anglès *RadiolImmunoAssay*) basada en l'ús d'antígens marcats amb radioisòtops els quals són reconeguts per anticossos immobilitzats en una superfície sòlida (Premi Nobel de Medicina, atorgat a Rosalyn Yalow el 1977). Aquesta tècnica és simple i sensible però té els desavantatges de l'ús de radioisòtops, com l'elevat cost de reactius i equips, la baixa estabilitat dels reactius marcats, la necessitat de mesures de precaució en la manipulació, la gestió dels residus radioactius generats i la necessitat de personal entrenat per a realitzar l'assaig. Per aquestes raons la tècnica RIA tot i que es fa servir

en alguns laboratoris per a la quantificació d'antigens ha quedat reemplaçada pels immunoassaigs enzimàtics en els quals es fan servir enzims com a marcadors.

1.3.2.1 Immunoassaigs enzimàtics

L'immunoassaig enzimàtic (EIA, de l'anglès *Enzyme ImmunoAssay*) és el nom general per a descriure assaigs immunològics que fan servir un enzim com a marcador per a la detecció del complex antigen-anticòs. Les característiques catalítiques dels enzims proporcionen una amplificació del senyal resultant de la formació del complex, millorant la sensibilitat respecte la tècnica RIA i eliminant els desavantatges de l'ús de radioisòtops. L'enzim es pot unir a l'antigen o a l'anticòs i l'activitat específica de l'enzim no s'ha de modificar després de la unió. Els enzims més emprats són la fosfatasa alcalina, la glucosa oxidasa i la peroxidasa de rave picant. Els assaigs EIA es poden classificar en homogenis o heterogenis.

- EIA homogeni: no és necessària la separació dels immunocomplexos dels reactius lliures amb passos de rentat. Un exemple d'EIA homogeni és la tècnica EMIT (de l'anglès *Enzyme Multiplied Immunoassay*) que es fa servir majoritàriament per a la detecció de fàrmacs i hormones en diagnòstic clínic. La clau d'aquest assaig radica en que l'activitat del conjugat enzimàtic està modulada per la formació del complex antigen-anticòs.
- EIA heterogeni: l'antigen o l'anticòs està immobilitzat a una fase sòlida i els reactius no units es separen amb passos de rentat. També es coneixen com Assaigs Immunoabsorbent Lligat a Enzims (ELISA, de l'anglès *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). L'assaig es pot realitzar en un ampli ventall de fases sòlides com plaques de microtitulació, membranes de cel·lulosa o partícules magnètiques (§ 1.4) i es poden realitzar seguint diferents formats descrits a continuació [17,18,55].

1.3.2.2 Assaig immunoabsorbent lligat a enzims (ELISA)

Els assaigs ELISA es poden classificar en dos formats:

- ELISA no competitiu, també anomenat *format sandvitx*, en el que els reactius estan en excés i no s'estableix cap etapa de competència;
- ELISA competitiu, en el que l'anàlit està en excés i la concentració dels altres reactius és constant i limitada.

ELISA NO COMPETITIU O SANDVITX

L'ELISA no competitiu (sandvitx) es basa en la immobilització d'un anticòs específic de l'antigen d'interès a la fase sòlida. Un cop immobilitzat l'anticòs s'addiciona l'antigen en concentracions variables i s'incuba. Després es realitza una etapa de rentat per tal d'eliminar l'antigen no unit i s'addiciona un altre anticòs que també és específic de l'antigen però en aquest cas marcat amb un enzim. Els dos anticossos adicionats han d'estar en excés. El primer, per a permetre una adsorció completa de l'antigen i el segon, per assegurar la marcació completa del complex format. La quantitat d'enzim unit es determina posteriorment amb la incubació amb un substrat cromogènic. El senyal proporcionat per l'enzim és directament proporcional a la concentració de l'antigen d'interès (Figura 1.16, A).

Cal destacar que aquest format només es pot fer servir quan els dos anticossos involucrats són capaços d'interaccionar amb diferents epítops de l'antigen. L'afinitat de la unió antigen-anticòs hauria de ser similar per als dos anticossos i no hi haurien d'haver impediments estèrics entre ells. Per aquestes raons, aquest sistema és més adient per a la quantificació de molècules de pes molecular elevat, com cèl·lules, enzims o proteïnes. En moltes ocasions no es disposa de dos anticossos amb especificitats diferents capaços d'interaccionar amb l'antigen i cal aplicar un format ELISA competitiu. Quan es volen detectar molècules de pes molecular més baix (<1 KDa), com antibiòtics, pesticides o pèptids, que actuen com a immunògens un cop conjugades a proteïnes portadores, habitualment es fa servir un assaig competitiu.

ELISA COMPETITIU

Hi ha diferents formats d'ELISA competitiu que difereixen en l'immunoreactiu que s'immobilitza (antigen o anticòs) a la fase sòlida i quin es el que es marca amb un enzim. Els formats més importants són l'ELISA competitiu directe i l'indirecte.

▪ ELISA competitiu directe

En aquest cas, s'immobilitza l'anticòs específic de l'antigen d'interès a la fase sòlida. Posteriorment l'antigen s'incuba simultàniament amb l'antigen conjugat amb un enzim, competint tots dos pels llocs d'unió de l'anticòs específic immobilitzat al suport (Figura 1.16, B). Els immunoreactius en excés s'eliminen mitjançant un simple pas de rentat. En aquest cas el senyal proporcionat per l'enzim és indirectament proporcional a la concentració de l'antigen d'interès.

▪ ELISA competitiu indirecte

En el format competitiu indirecte, l'antigen (o l'haptè conjugat amb la proteïna portadora) s'immobilitza a la fase sòlida. Posteriorment l'anticòs específic s'incuba simultàniament amb l'anàlit. La competència s'estableix entre l'anàlit i l'antigen immobilitzat per l'anticòs específic en solució. La quantitat d'anticòs específic unit al suport sòlid es determina amb un segon anticòs conjugat amb un enzim (Figura 1.16, C). Si l'anticòs primari es va produir en ratolins, es podria fer servir un anticòs secundari obtingut de la immunització d'un hoste, com un conill, amb anticossos de ratolí. Aquest anticòs secundari s'anomenaria IgG-antiratolí de conill. Els immunoreactius lliures i en excés s'eliminen mitjançant un simple pas de rentat. El senyal proporcionat per l'enzim és indirectament proporcional a la concentració de l'antigen d'interès.

La sensibilitat de l'ELISA competitiu indirecte és comparable o lleugerament més efectiu que l'assaig directe, amb els avantatges de que necessita menys anticòs i que no s'ha de preparar el conjugat enzimàtic de l'antigen o l'haptè-proteïna. Però presenta el desavantatge de que el protocol implica una etapa d'incubació addicional i per tant requereix més temps [55].

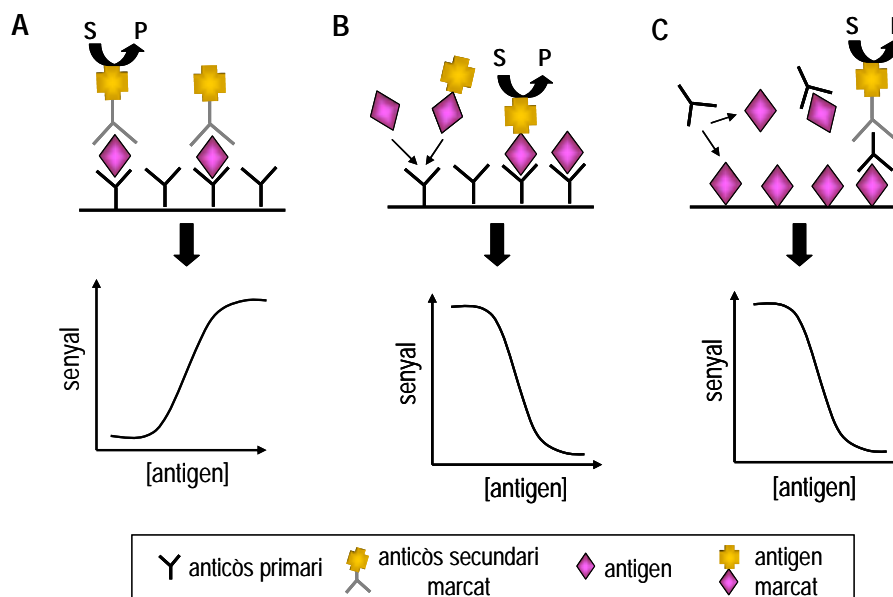


Figura 1.16: Representació esquemàtica i corbes associades de diferents formats d'ELISA: (A) no competitiu o sandvitx, (B) competitiu directe i (C) competitiu indirecte.

1.3.2.3 Anàlisi de la corba d'ELISA competitiu

El senyal obtingut en un assaig ELISA competitiu s'ajusta a una corba sigmoïdal que segueix l'equació següent [56]:

$$y = \{(A-B)/[1+10\exp((\log C - \log X) \cdot D)]\} + B$$

El paràmetre A correspon al senyal màxim, B al senyal mínim, C és la concentració d'anàlit que correspon al 50% del senyal màxim (IC 50), X la concentració d'anàlit i D el pendent al punt d'inflexió de la corba.

La corba de competència proporciona paràmetres com la sensibilitat i la concentració mínima que es pot detectar (límit de detecció), paràmetres que determinen la qualitat d'anàlisi d'un sistema analític. En el cas d'un assaig immunològic competitiu per *límit de detecció* s'entén la quantitat d'anàlit que determina una inhibició del 10 % de la unió de l'immunoreactiu marcat, es a dir, la concentració de l'anàlit correspon a la que proporciona el 90 % del senyal màxim. El rang de treball de l'assaig s'estableix entre el 20 % (límit de quantificació) i el 80 % del senyal màxim (Figura 1.17). La sensibilitat indica el factor de resposta del sistema analític en funció de la variació de la concentració de l'anàlit, el seu valor ve proporcionat pel pendent a la zona lineal de la corba.

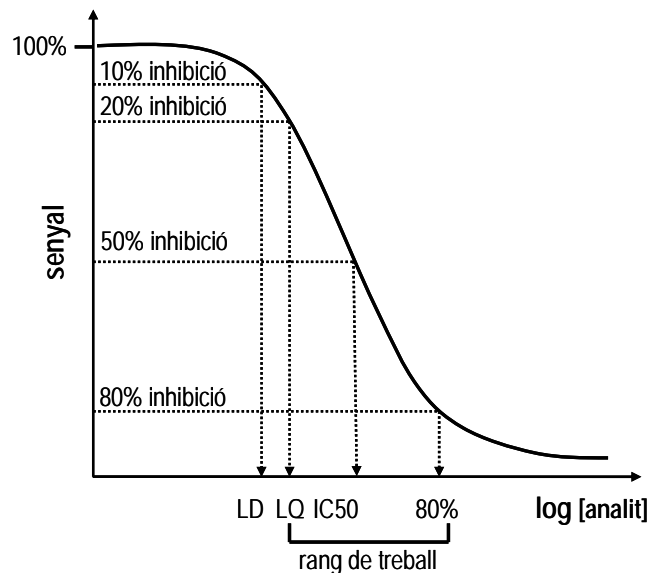


Figura 1.17: Típica corba sigmoïdal d'un immunoassaig competitiu amb els paràmetres que defineixen l'assaig: LD, LQ, IC50 i rang de treball.

1.4 ESTRATÈGIES D'IMMOBILITZACIÓ I SEPARACIÓ DE MATERIAL BIOLÒGIC BASADES EN PARTÍCULES MAGNÈTIQUES

Els orígens de les partícules magnètiques (en anglès *magnetic beads*) es situen a l'any 1976 quan el professor noruec John Ugelstad va aconseguir produir partícules magnètiques recobertes de poliestirè de mida uniforme. Les partícules magnètiques són unes esferes de ferrita de l'ordre de pocs micròmetres o nanòmetres recobertes d'un polímer aïllant, que tenen la propietat de ser magnetitzables. Addicionalment, mostren un comportament paramagnètic, és a dir, en presència d'un camp magnètic les partícules presenten propietats magnètiques i quan deixa d'aplicar-se no mostren magnetisme residual. Per tant, es poden separar fàcilment d'una fase líquida amb un imant, i es poden dispersar de nou quan l'imant es desactiva o s'enretira [57,58].

L'aparició de les partícules magnètiques ha revolucionat els protocols de separació i aïllament d'alguns materials biològics [59,60] i representa una alternativa molt viable per a realitzar bioassaigs heterogenis respecte altres suports sòlids, com les plaques de poliestirè, per aconseguir la immobilització de biomaterial [59, 61].

Actualment existeixen un gran nombre de cases comercials que proporcionen partícules magnètiques de diverses mides, activades amb grups químics (com grups amino, tosíl o carboxil) que faciliten l'enllaç amb el material biològic i, fins i tot, partícules magnètiques amb material biològic divers prèviament immobilitzat (proteïnes, anticossos, enzims, oligonucleòtids, entre altres). Les partícules magnètiques que es fan servir més assíduament són les que comercialitza l'empresa Invitrogen Dynal AS (Oslo, Noruega), que està especialitzada en la seva fabricació i proporciona un gran ventall de partícules de diferents mides, amb grups químics o biològics [62].

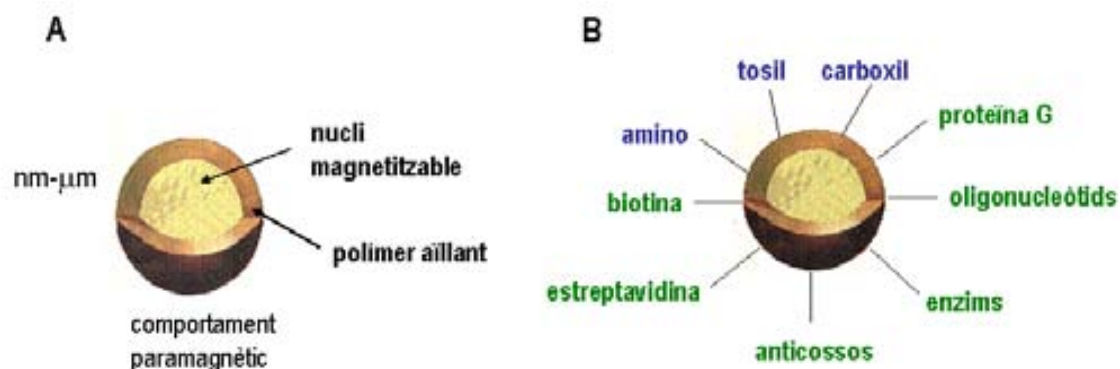

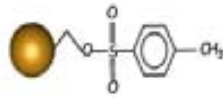


Figura 1.18: (A) Representació esquemàtica de partícules magnètiques, (B) activades amb grups químics o recobertes amb molècules biològiques.

En aquesta tesi s'han fet servir partícules magnètiques per a la immobilització i separació de material biològic per al desenvolupament de noves estratègies bioanalítiques. Les partícules magnètiques emprades estan recobertes de la proteïna estreptavidina o activades amb grups químics tosíl (veure Taula 1.1).

Taula 1.1: Característiques i propietats de les partícules magnètiques que es fan servir en aquesta tesi.

Partícula magnètica	Diàmetre	Concentració	Capacitat d'unió	Estratègia d'immobilització
 M-280 Estreptavidina	2.8 µm	10 mg/ml (6-7x10 ⁸ /ml)	- 700 pmols biotina/mg - 200 pmols biotina-DNA/mg	Unió per afinitat (enllaç biotina-estreptavidina)
 M-280 Tosil	2.8 µm	30 mg/ml (2x10 ⁹ /ml)	20 µg proteïna/ mg	Enllaç covalent

Les partícules recobertes d'estreptavidina tenen una gran varietat d'aplicacions, destacant la separació d'oligonucleòtids i d'anticossos marcats amb la molècula biotina. El material biològic marcat amb biotina s'uneix a les partícules mitjançant la forta unió de naturalesa no covalent que s'estableix amb l'estreptavidina ($K= 1 \times 10^{15} \text{ M}^{-1}$). La biotina és una vitamina de 244 Da present majoritàriament al fetge, ronyons i pàncrees. L'estreptavidina és una proteïna d'aproximadament 70 KDa aïllada del bacteri *Streptomyces avidinii*, formada per quatre subunitats idèntiques, on cada molècula s'uneix a quatre de biotina [19,63].

El complex biotina-estreptavidina format resulta de gran interès en assaigs biològics, ja aquesta associació es manté estable en un interval ampli de temperatura, pH i solvents orgànics [64,65,66]. Aquesta associació no covalent també es dona amb la proteïna avidina, provinent d'ou de pollastre. L'avidina i l'estreptavidina tenen estructures diferents, però la regió que interacciona amb biotina és molt similar de forma que totes dues tenen una gran afinitat per la biotina. Cal destacar que l'avidina pot proporcionar més adsorcions inespecífiques, ja que en comparació amb l'estreptavidina, conté més carbohidrats en la seva estructura. Aquest fet provoca que l'avidina presenti un punt isoelèctric superior (pI 10) que el de l'estreptavidina (pI 5-6). Malgrat aquest inconvenient, cal tenir en compte que l'avidina és molt més econòmica [67].

Unes altres partícules contenen grups tosíl formats per l'activació dels grups hidroxil amb clorur de *p*-toluesulfonil. Els grups tosíl permeten la unió de proteïnes o altres substàncies biològiques mitjançant la reacció amb els grups amino primaris que contenen. Els grups amino desplacen els grups tosíl de les partícules magnètiques formant-se un enllaç covalent.

Aquestes partícules immobilitzen el material biològic, ja sigui per afinitat (estreptavidina-biotina) o per formació d'enllaç covalent. També permeten la separació de la resta de la matriu aplicant un camp magnètic. Així, les partícules es poden separar de la solució sobrenadant, deixant a part les molècules que podrien actuar com a interferents generant adsorcions inespecífiques indesitjables. Per tant, minimitzen l'efecte matriu de la mostra (Figura 1.19).

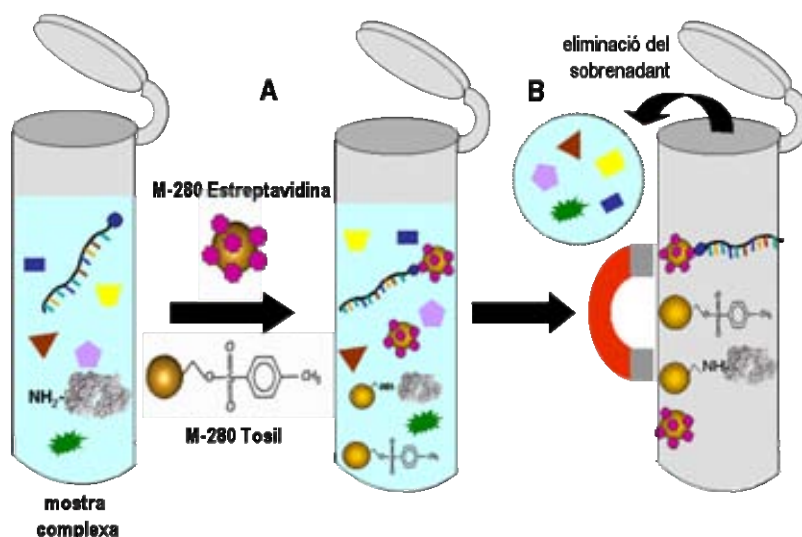


Figura 1.19: (A) Immobilització selectiva de material biològic mitjançant partícules magnètiques recobertes d'estreptavidina i activades amb grups químics tosíl. (B) Separació de les partícules amb un camp magnètic i eliminació de la solució sobrenadant.

1.5 NOVES ESTRATÈGIES BIOANALÍTQUES: GENOSENSORS I IMMUNOSENSORS

1.5.1 Sensors químics i biosensors

Un sensor químic és una nova classe d'instrumentació analítica, que apareix com a resposta a la necessitat d'obtenir més informació i de millor qualitat. Un sensor és un dispositiu capaç de proporcionar informació quantitativa o qualitativa sobre paràmetres físics, químics o biològics. Els seus principals trets característics són: dimensions reduïdes, baix cost, fàcil manipulació i generació d'informació a temps real.

Normalment un sensor químic està format per dos components bàsics connectats en sèrie: un element de reconeixement molecular o iònic (el receptor) i un transductor físic. El receptor d'aquest sensor ha de ser capaç d'interaccionar selectivament amb un determinat anàlit generant un senyal primari (de tipus electroquímic, òptic, tèrmic o màssic) que és transformat pel transductor en un senyal secundari, normalment de tipus elèctric, fàcilment mesurable i interpretable [68].

Els sensors químics anomenats *quimiosensors* contenen un element de reconeixement de tipus sintètic. Quan s'incorporen elements biològics com a sistema de reconeixement selectiu s'obtenen sensors coneguts com a *biosensors*. La incorporació de material biològic confereix una elevada selectivitat al biosensor i el dispositiu adquireix una bona sensibilitat si s'escull el transductor adient [69,70].

En un biosensor es donen tres etapes bàsiques de funcionament (Figura 1.20):

- Reconeixement específic de l'anàlit amb el material biològic immobilitzat a la superfície del transductor
- Detecció de la variació de les propietats físico-químiques al produir-se la interacció
- Processament del senyal i l'obtenció de resultats.

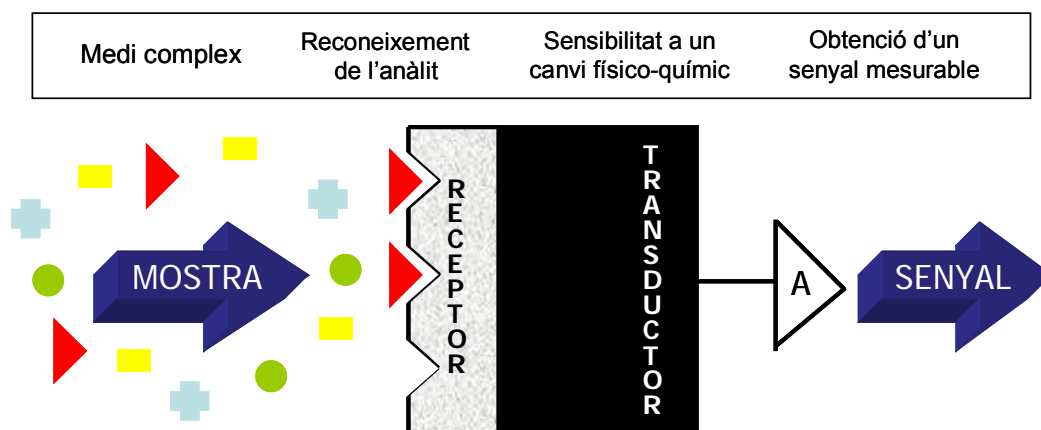


Figura 1.20: Principi de funcionament d'un biosensor. (1) Reconeixement específic de l'anàlit, (2) transductor sensible a un canvi físico-químic i (3) obtenció d'un senyal relacionat amb la quantitat d'anàlit a la mostra.

El tipus de material que es fa servir als biosensors pot ser molt variat: enzims, cèl·lules [71,72], teixits [73,74], microorganismes [75,76], espècies immunoquímiques i DNA, entre altres. Generalment, el material biològic s'immobilitza a la superfície del transductor mitjançant tècniques com adsorció directa, entrecruament (en anglès, *cross-linking*) mitjançant agents bifuncionals, enllaç covalent i retenció en membranes o gels. El mètode d'immobilització és un punt clau en el desenvolupament del

biosensor, ja que ha de permetre l'activitat del material biològic, per tal de no alterar la capacitat de reconèixer l'anàlit, i la sensibilitat del transductor no ha de quedar malmesa.

Els biosensors es poden classificar en funció de la propietat física que es mesura al transductor. Els transductors més àmpliament utilitzats són els electroquímics, els òptics i màssics [77].

1.5.2 Biosensors electroquímics

Els biosensors basats en transductors electroquímics es poden classificar bàsicament en dos grups principals: amperomètrics i potenciomètrics. Els sensors amperomètrics són els primers que es van desenvolupar i es basen en el mesurament del corrent elèctric a un potencial fixat. Dins d'aquest grup es troba el conegut biosensor de glucosa. Els sensors potenciomètrics es basen en el mesurament de la diferència de potencial d'un elèctrode (metàl·lic o de membrana) en condicions de corrent pràcticament nul. Dins d'aquest grup hi destaquen els elèctrodes selectius a ions (ISEs, de l'anglès *ion-selective electrodes*) [78] com el clàssic elèctrode de pH, i els transistors d'efecte de camp, més coneguts com a ISFETs (de l'anglès, *ion-sensitive field-effect transistors*) [79]. També cal destacar els biosensors electroquímics conductimètrics, basats en el canvi de conductivitat quan el receptor reconeix l'anàlit complementari, i els impedimètrics, que mesuren el corrent elèctric a diferents freqüències aplicant un potencial altern [80].

Cal destacar que els transductors amperomètrics són els més populars degut a la seva simplicitat, facilitat de fabricació i el baix cost dels dispositius i la instrumentació associada [81]. A continuació es descriu en detall la tècnica amperomètrica per ser el tipus de transducció que es fa servir principalment a la present tesi.

1.5.2.1 Tècnica amperomètrica

Els sensors amperomètrics mesuren la intensitat de corrent resultant de l'oxidació o reducció sobre la superfície d'un elèctrode, com a conseqüència de l'aplicació d'un potencial constant [82]. Les mesures amperomètriques es realitzen en una cel·la electroquímica amb configuració de tres elèctrodes. El pas de corrent es mesura en l'elèctrode de treball, un cop s'ha fixat una diferència de potencial entre l'elèctrode de treball i l'auxiliar, actuant aquest últim com a contraelèctrode per a tancar el sistema.

Mitjançant un potenciòstat i un tercer elèctrode (elèctrode de referència) s'aconsegueix mantenir constant la diferència de potencial. L'elèctrode de referència més usual és el de Ag/AgCl, mentre que els elèctrodes de treball i auxiliar solen ser de materials conductors i inerts, com ara metalls nobles, diferents formes de carboni i polímers conductors.

La intensitat del corrent obtinguda és una mesura directa de la velocitat de la reacció electroquímica a la superfície de l'elèctrode, que es descriu amb la llei de Faraday:

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

On I és la intensitat de corrent, n és el nombre d'electrons implicats en la reacció d'oxidació o reducció, F la constant de Faraday (96.5 C/mol) i dC/dt la velocitat de la reacció en mol/l.

Tal i com indica l'equació, la intensitat de corrent és directament proporcional a la velocitat de transformació de l'anàlit a la superfície de l'elèctrode. Mentre les molècules d'anàlit a la superfície es van electrolitzat, es difonen noves molècules des de la solució a la superfície de l'elèctrode. Per tant, la intensitat de corrent també depèn de forma crítica de la velocitat del transport de massa de l'anàlit des de la solució a la superfície de l'elèctrode. Aquest paràmetre depèn de la concentració de l'anàlit a la solució, de l'àrea de l'elèctrode i de les condicions de migració, convecció i difusió. La migració, deguda al transport de l'anàlit per un gradient elèctric, generalment s'elimina addicionant un electròlit suport a la cel·la. La convecció, deguda al transport de l'anàlit impulsat per un moviment de la solució- per exemple, mitjançant agitació-, es pot controlar simplement sense aplicar agitació a la solució o aplicant una agitació constant. La difusió, deguda al transport de l'anàlit pel gradient de concentració del mateix depèn del temps, fet que limita aquest tipus d'experiments.

Si es redueix la migració amb l'addició d'un electròlit suport i la convecció es manté constant amb una agitació controlada, es forma una capa de difusió estàtica a la superfície de l'elèctrode, en la que el transport de massa només es degut a la difusió [83]. D'aquesta forma la intensitat es regeix per la següent expressió:

$$I = \frac{nFADC_s}{L}$$

On A és l'àrea de l'elèctrode, D el coeficient de difusió, C_s la concentració d'anàlit en solució i L el gruix de la capa de difusió.

Aquesta equació es pot simplificar com:

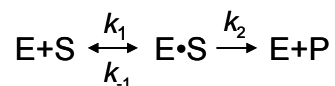
$$I = KC_s$$

Per a simplificar l'equació s'assumeix que la concentració de l'anàlit a la superfície de l'elèctrode es propera a zero, i que la distribució d'anàlit en la solució és uniforme fins a la capa de difusió [84].

L'elecció adequada del potencial aplicat en l'amperometria aporta certa selectivitat electroquímica, produint la reducció/oxidació de certes espècies químiques. Però cal destacar, que en molts casos la selectivitat que s'aconsegueix no és suficient, per aquesta raó es sol modificar superficialment l'elèctrode (química o biològicament), millorant-ne així la selectivitat i la sensibilitat del sensor. Quan es fan servir enzims per a modificar l'elèctrode es parla de biosensors amperomètrics enzimàtics. En aquesta tesi s'han fet servir enzims com a marcadors del material biològic que es vol detectar. A continuació es detallen les característiques principals d'aquests elèctrodes.

1.5.2.2 Biosensors amperomètrics enzimàtics

En aquests dispositius el material biològic que modifica l'elèctrode es un enzim, que és una proteïna d'alta selectivitat capaç de catalitzar una determinada reacció redox. L'enzim selectiu d'un anàlit (substrat, S) catalitza la transformació a un determinat producte (P) segons l'equació:



En aquest cas, la intensitat enregistrada per l'equip amperomètric dependrà de la cinètica de la reacció enzimàtica, seguint l'equació de Michaelis-Menten, que relaciona la velocitat de l'enzim (v) amb la concentració de substrat catalitzat mitjançant l'expressió:

$$v = \frac{v_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

On V_{\max} és la velocitat màxima de la reacció, K_m la constant de Michaelis-Menten i $[S]$ la concentració del substrat.

En el cas de treballar amb $[S] \ll K_m$, la velocitat variarà linealment amb la concentració del substrat i el corrent mesurat per l'amperímetre dependrà linealment de la concentració del substrat. En canvi, quan $[S] \gg K_m$ l'enzim es trobarà saturat i la velocitat serà equivalent a la V_{\max} de l'enzim, segons:

$$v = v_{\max} = k_2 [E]$$

En condicions de saturació del substrat, el corrent mesurat correspondrà al corrent màxim que pot proporcionar l'enzim i serà proporcional a la seva concentració [85].

Un grup important d'enzims emprats als biosensors amperomètrics són les peroxidases. Aquests enzims catalitzen la reacció de reducció del peròxid d'hidrogen a aigua, en presència d'un mediador, que és un substrat de propietats electroquímiques reversibles i que actua millorant la transferència electrònica entre l'enzim i l'elèctrode. El conjunt de reaccions electroquímiques que té lloc a la superfície de l'elèctrode es mostra a la Figura 1.21.

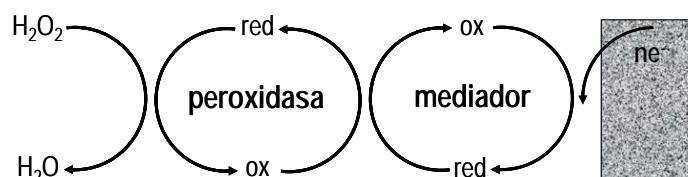


Figura 1.21: Mecanisme enzimàtic de l'enzim peroxidasa a la superfície d'un transductor electroquímic, fent servir peròxid d'hidrogen com a substrat i hidroquinona com a mediador.

Tal i com s'observa, el mediador es regenera amb l'aplicació d'un potencial reductor a la superfície de l'elèctrode, i si es treballa en saturació de substrat (H_2O_2), la intensitat mesurada pel potenciòstat és directament proporcional a la concentració de la peroxidasa. Per a que aquest mecanisme sigui vàlid, el mediador ha de complir una sèrie de condicions: reacció ràpida amb l'enzim, ràpida transferència d'electrons, baix potencial per ser regenerat i estabilitat de la forma oxidada i reduïda. Alguns exemples dels mediadors més emprats són l'hexacianoferrat(III), el ferroçè, amines aromàtiques, o compostos fenòlics com la hidroquinona [68].

1.5.2.3 Transductors amperomètrics basats en compòsits i biocompòsits

Un dels avantatges dels transductors amperomètrics resideix en la simplicitat i accessibilitat dels materials emprats en la seva construcció. El requeriment principal és que els materials siguin conductors. Es poden fer servir materials simples (metalls com el platí i l'or o derivats del grafit com el carboni vitrificat o el grafit pirolític), o bé materials compostos (anomenats *compòsits*).

Un compòsit resulta de la combinació de dos o més components diferents. Cada component manté les seves característiques originals però en conjunt li atorguen al compòsit qualitats químiques, mecàniques i físiques distintives, diferents de les de cada component per separat. Es preparen amb la dispersió d'un material sòlid

conductor (com platí, or o grafit) en una matriu polimèrica de característiques aïllants. Les propietats dels compòsits depenen de la naturalesa de cada component, les quantitats relatives i la seva distribució. Els primers compòsits, anomenats de *pasta de carboni*, formats amb la mescla de grafit amb un aglomerant com la parafina, presentaven baixa estabilitat físico-química. Per aquesta raó es van desenvolupar compòsits rígids, alternatius als descrits de pasta de carboni. Els compòsits rígids s'obtenen amb la mescla de carboni en pols amb una matriu polimèrica no conductora, obtenint un material tou que s'endureix després del curat del material [86]. Al nostre grup s'han descrit compòsits rígids fent servir la resina epoxi com a matriu polimèrica, resultant un compòsit de grafit-epoxi (GEC) [87,88]. El fet que el material sigui tou abans de curar-lo permet que es puguin construir elèctrodes de diverses formes i mides. Un cop es curen, aquests materials són molts resistents des del punt de vista físico-químic, sent estables a temperatures elevades i en presència de solvents orgànics. En aquests materials, la modificació del transductor amb material biològic es realitza a la superfície del compòsit.

Per altra banda, el material biològic es pot incorporar directament en el si del compòsit, generant en aquest cas biocompòsits de grafit-epoxi (GEB). El biocompòsit no només actua com a transductor, sinó que també és un reservori de material biològic. Els biocompòsits presenten l'avantatge de que no necessiten una etapa d'immobilització de material biològic sobre el transductor, la qual, sovint és tediosa, costosa (ja que intervenen diversos reactius), lenta i poc reproduïble. Addicionalment, la superfície dels biocompòsits és renovable, és a dir, amb un simple polit s'obté una nova superfície reproduïble amb material biològic actiu. Aquests dispositius simplifiquen els assaigs i poden ser fàcilment transferibles a la construcció a gran escala [89,90].

1.5.3 Genosensors

Un genosensor (o biosensor de DNA) és un dispositiu que utilitza DNA com a element de reconeixement, que es pot fer servir amb dues finalitats:

- Detectar una molècula que interacciona selectivament amb la doble cadena de DNA mitjançant la intercalació o interaccions específiques amb l'estructura del DNA. Aquests sensors s'han fet servir extensament per a la detecció de traces d'antibiòtics [91,92], entre d'altres anàlits.
- Evidenciar la presència d'una determinada seqüència de DNA mitjançant el fenomen de la hibridació, es a dir, la unió d'una cadena de DNA amb la seva

cadena complementària. Aquests dispositius s'anomenen genosensors (o biosensors de DNA) d'hibridació [93].

Part dels dispositius desenvolupats a la present tesi són genosensors d'hibridació que tenen com a objectiu determinar una seqüència específica de DNA com anàlit. El disseny de genosensors d'hibridació sol comprendre els següents passos: (1) immobilització de seqüències de DNA sondes, (2) hibridació amb la seqüència de DNA anàlit i (3) marcatge de l'híbrid format.

Les sondes de DNA com a element de reconeixement confereixen una elevada selectivitat a aquests dispositius, ja que la seqüència de la sonda és específica a l'anàlit que es vol detectar. A diferència dels anticossos i els enzims, les sondes de DNA es poden obtenir de forma sintètica, per tant és un reactiu econòmic i que no requereix procediments de purificació complexos. Addicionalment, el DNA és un material molt resistent a solvents orgànics i a canvis de força iònica. Un punt crític en el desenvolupament dels genosensors és l'elecció del mètode d'immobilització de la seqüència sonda. El mètode més adient és el que permet immobilitzar la sonda per un dels extrems (5' o 3') a la superfície del transductor. D'aquesta forma, millora l'eficiència de la reacció d'hibridació, situació pròxima al que succeeix en solució, respecte la immobilització que es dona en múltiples punts de la cadena, que provoca que la reacció sigui més lenta. Posteriorment l'híbrid es pot marcar amb molècules fluorescents o enzimàtiques unides a alguna de les seqüències hibridades. La detecció es realitza amb l'acoblament de sistemes amb diferents transductors: òptics, piezoelèctrics o electroquímics.

En moltes ocasions la quantitat de DNA present a la mostra problema és insuficient per a poder realitzar la detecció directa amb genosensors d'hibridació, és a dir, la quantitat de DNA està per sota del límit de detecció del dispositiu [94]. En aquestes situacions és necessària l'amplificació del material genètic mitjançant la tècnica d'amplificació sintètica per PCR (§ 1.3.1.1).

En aquesta tesi també s'han desenvolupat biosensors per a la detecció de DNA de doble cadena provinent de mostres amplificades prèviament per PCR. En aquest cas, la selectivitat del dispositiu no ve atorgada pel reconeixement del DNA anàlit amb una sonda, sinó que ve aportada per les condicions de la PCR i l'elecció d'encebadors específics de l'amplificació. En aquests sistemes la selectivitat de l'amplificació de la PCR es combina amb la sensibilitat del transductor amperomètric emprat, deguda en bona part a la proximitat del material biològic i l'elèctrode. En el cas que la PCR no estigui optimitzada i pugui donar lloc a productes amplificats no específics (diferents del DNA original), la selectivitat de la metodologia es pot millorar amb la separació per

calor de la doble cadena de DNA amplificada i hibridació amb una sonda que només es pot hibridar amb una seqüència interna del producte amplificat específic.

En el cas que el genosensor d'hibridació tingui un límit de detecció inferior a la quantitat de DNA a la mostra, la hibridació directa sense amplificació per PCR estarà dificultada per l'elevada longitud del genoma. És a dir, la sonda hauria de reconèixer un fragment molt petit (de 18 a 30 bases) respecte la longitud total del genoma (sobre 10^8 parells de bases). Aquesta hibridació està molt poc afavorida i a més, deguda a la homologia entre diferents fragments d'un genoma, pot donar lloc a la detecció d'un fragment similar al fragment anàlit, generant falsos positius.

En aquest context, la PCR no només augmenta la concentració de la mostra sinó que també la simplifica, és a dir, amplifica fragments curts habitualment de 200 a 500 parells de bases. Per tant, resulta un sistema òptim per a l'acoblament amb biosensors que detectin el producte amplificat. En el cas que l'especificitat de la PCR fos baixa i s'amplifiquessin diversos productes, es podrien fer servir biosensors d'hibridació amb la unió d'una sonda que només fos complementària al producte amplificat específic [95].

Aquests dispositius respecte les tècniques clàssiques d'anàlisi del DNA, presenten una elevada sensibilitat deguda a la proximitat entre el material biològic i el transductor, simplifiquen el procediment d'anàlisi i són més ràpids per a l'obtenció de resultats.

1.5.4 Immunosensors

Un immunosensor és un dispositiu capaç de proporcionar un senyal analític a partir de la formació d'un complex immunològic. Combina un element de reconeixement (antigen o anticòs) que li confereix selectivitat, amb un transductor, que li confereix sensibilitat i transforma el fenomen de reconeixement immunològic en un senyal electrònic amplificat. Els anticossos (§ 1.2.1) són reactius que es poden obtenir de forma relativament fàcil, són altament específics, versàtils, i formen amb l'antigen un enllaç fort i estable. La detecció es realitza amb l'acoblament de sistemes amb diferents transductors: òptics, piezoelèctrics o electroquímics. La major part dels immunosensors són electroquímics degut a que posseeixen diversos avantatges, com l'elevada sensibilitat, baix cost i disseny portable. Els immunosensors electroquímics es solen basar en la marcació dels immunoreactius amb marcadors electroactius, que poden ser de tipus enzimàtic [96]. Els enzims amplifiquen el senyal obtingut i es poden

obtenir comercialment conjugats a un gran nombre d'antígens o anticossos. La majoria dels immunosensors desenvolupats es basen en formats no competitiu (sandvitx) i competitiu (§ 1.3.2.2), els primers aplicats a la detecció de molècules de pes molecular alt (com proteïnes o cèl·lules) i els segons a molècules de pes molecular baix (com herbicides o toxines). Un punt clau en el desenvolupament dels immunosensors és la immobilització dels immunoreactius, antigen o anticòs, en funció del format. El mètode d'immobilització ideal hauria de complir les següents premisses: (1) proporcionar suficient quantitat activa d'antigen o anticòs, (2) estabilitat dels immunoreactius immobilitzats al llarg de la mesura, (3) evitar la modificació de la capacitat de reconeixement de l'immunosensor i (4) habilitat de regeneració. En el cas d'immobilitzar l'antigen, aquest es pot conjuguar a grans proteïnes com la BSA per tal de potenciar la immobilització i la interacció amb l'anticòs. Aquest format es fa servir generalment per a evitar problemes associats a la immobilització de l'anticòs sobre el transductor, com la correcta orientació de la regió Fab de l'anticòs i la pèrdua d'afinitat d'unió amb l'antigen després de unir-lo al transductor [97]. En el cas d'immobilitzar l'anticòs es poden fer servir diverses estratègies per aconseguir una correcta orientació sense perdre afinitat. Algunes d'aquestes estratègies són: la conjugació de l'anticòs amb biotina per a immobilitzar-lo a una superfície sòlida modificada amb estreptavidina (unió biotina-estreptavidina), la immobilització a un suport sòlid modificat amb proteïna A o G que s'uneixen al fragment Fc de l'anticòs, o la formació de monocapes autoassemblades (SAM, de l'anglès *self-assembled monolayers*) per aconseguir una immobilització controlada [98].

Els immunosensors respecte les tècniques clàssiques d'anàlisi immunològica, presenten una elevada sensibilitat deguda a la proximitat entre el material biològic i el transductor, simplifiquen el procediment d'anàlisi i són més ràpids per a l'obtenció de resultats.

1.6 LA SEGURETAT ALIMENTÀRIA

El concepte de seguretat alimentària implica garantir la producció i comercialització d'aliments per tal de no suposar un risc potencial per a la seguretat del consumidor final [99]. L'elevada incidència d'intoxicacions alimentàries, que cada any afecten a milers de persones de tot el món, implica la necessitat de desenvolupar metodologies ràpides per assegurar la qualitat i seguretat dels aliments.

Els contaminants alimentaris es poden classificar depenent de la seva naturalesa i origen. Bàsicament, hi ha contaminants microbiològics (com bacteris, virus o paràsits), material exogen, toxines naturals i compostos químics (com pesticides, metalls tòxics o residus veterinaris). Així com la detecció i el control d'additius van tenir una elevada importància en el passat, actualment la problemàtica més greu ve dels contaminants microbiològics, seguida dels pesticides i dels residus de medicaments en productes d'origen animal [100]. El mètode clàssic de detecció de microorganismes es basa en l'aïllament i enumeració de cèl·lules viables en aliments. Es poden fer servir medis selectius per a detectar determinats bacteris, que contenen inhibidors del creixement d'altres bacteris o substrats determinats que només els degraden els bacteris d'interès i que confereixen un color determinat a les colònies que creixen. Aquest mètode és molt sensible i econòmic, però requereix diversos dies per a proporcionar un resultat, ja que es basa en la formació de colònies que s'enumeren visualment. En canvi, la majoria dels contaminants de tipus químic s'analitzen amb tècniques de separació cromatogràfica (CG, HPLC o electroforesi capil·lar) acoblades a diferents detectors (FID, ECD, UV, MS). Aquestes tècniques són més ràpides però el cost econòmic associat és elevat.

Durant la dècada passada, el control de la seguretat alimentària s'ha dut a terme analitzant el producte final en comptes de controlar cadascuna de les etapes implicades en la seva producció. El principal problema de l'anàlisi del producte final és l'elevat nombre de mostres que s'han d'analitzar per a decidir si un lot segueix la normativa vigent, especialment quan els contaminants es distribueixen heterogèniament entre les mostres. Addicionalment, l'anàlisi del producte final no indica les causes de la contaminació alimentària, únicament determina que el producte no es apte pel consum humà. Darrerament s'ha remarcat la importància d'assegurar la qualitat i seguretat dels aliments en cada pas del seu processament i no únicament en el producte final. El programa preventiu HACCP (de l'anglès *Hazard Analysis Critical Control Point*) és acceptat mundialment com el sistema més efectiu per assegurar la seguretat alimentària. El programa HAACP té en compte els problemes associats a totes les etapes que intervenen en la producció d'un aliment, des de la matèria prima fins que arriba al consumidor final. Tot i que els programes HAACP són específics per a cada procés de producció, de forma general es poden identificar set etapes bàsiques: (1) anàlisi dels perills, (2) determinació dels punts crítics de control (CCPs, de l'anglès *Critical Control Points*), (3) establiment dels límits crítics per cada CCP, (4) establiment d'un sistema pel monitoratge dels CCPs, (5) establiment de mesures correctores quan un determinat CCP no està controlat, (6) establiment de procediments per a confirmar si el programa està funcionant correctament i (7)

establiment de la documentació pertinent [101]. Amb la implementació de sistemes HACCP per al control de CCP hi ha una elevada demanda de mètodes ràpids, sensibles i exactes. En concret, la incorporació de mètodes que proporcionen anàlisis en minuts o hores podrien servir per a prendre mesures correctores en temps reduït. En aquest context els biosensors s'alcen com a possibles candidats de nombroses aplicacions a la indústria alimentària. La importància dels biosensors resideix en la seva elevada selectivitat, sensibilitat, i en el fet que permeten la detecció d'un gran espectre d'anàlisis en mostres complexes amb el mínim pretractament de la mostra i en temps reduït.

Les aplicacions actuals dels biosensors en l'àmbit alimentari s'enfoquen cap a les següents àrees principals: seguretat alimentària, qualitat alimentària i control de processos industrials.

1.6.1 Additius alimentaris

Tot i que la contaminació microbiana i la detecció de residus (com pesticides, metalls tòxics i medicaments d'ús veterinari, entre altres) són problemàtiques de gran interès, també és important la detecció d'additius com colorants i aromatitzants, pels seus efectes nocius aguts i crònics a llarg termini.

Els additius alimentaris són aquelles substàncies químiques que s'addicionen intencionadament a l'aliment en la fase de transformació del producte per a millorar les seves qualitats i propietats, tals com l'estructura, color, estabilitat, entre altres.

Els additius alimentaris també es poden addicionar per a modificar la composició nutritiva d'un aliment, addicionant vitamines, calci i àcids grassos, entre altres. En aquest cas, aquests additius no solen presentar efectes nocius però és important assegurar que el producte conté les concentracions indicades per tal de subministrar la quantitat diària recomanada.

L'àcid fòlic (vitamina B9) és un additiu que s'inclou en llets, derivats làctics i sucres enriquits, per tal de suplir la deficiència d'aquesta vitamina. La correcta administració d'àcid fòlic és molt important durant l'embaràs, ja que la deficiència en la mare pot provocar defectes en el fetus com l'espina bífida. Addicionalment, la deficiència d'àcid fòlic és la causa principal de l'anèmia i s'associa al risc de patir atacs de cor.

El subministrament incorrecte d'aquesta vitamina pot provocar l'emascament de l'anèmia en gent gran, interferir en teràpies anticonvulsives o del tractament de càncer [102]. Per aquestes raons, és necessari el desenvolupament de controls eficients per a

certificar que la quantitat d'àcid fòlic es correspon amb el valor indicat als aliments enriquits.

El mètode clàssic de detecció d'àcid fòlic és el cultiu microbiològic, basat en el creixement de bacteris que només proliferen en presència d'àcid fòlic. Aquest mètode tot i que proporciona una bona especificitat i suficient rang dinàmic, és lent i pot resultar tediosos. Com a mètode alternatiu, s'han desenvolupat molts assaigs immunològics que proporcionen una bona sensibilitat per a la detecció d'àcid fòlic en mostres alimentàries [103,104].

La incorporació de partícules magnètiques en aquests assaigs permet que les reaccions es donin a la superfície d'aquestes partícules [105,106], amb els avantatges de que les etapes de separació i rentats resulten més efectives, fet que minimitza l'efecte matriu de la mostra. Per tant, l'anàlisi de les mostres es pot realitzar sense preenriquiment, purificació o pretractament, etapes que són necessàries pels mètodes estàndard.

La cromatografia líquida és un mètode alternatiu al cultiu microbiològic i als assaigs immunològics per a la detecció d'àcid fòlic [102,107-109]. Aquest mètode presenta l'inconvenient de que necessita volums elevats de mostra per a l'obtenció dels límits de detecció requerits. Addicionalment, l'equipament és costós i l'ha de manipular personal amb experiència, fets que dificulten la seva implementació en laboratoris oficials de control.

Per tant, és necessari el desenvolupament d'estratègies analítiques que siguin ràpides, econòmiques, sensibles i simples, per l'anàlisi d'un ampli ventall de matrius alimentàries. Els biosensors representen una alternativa prometedora respecte els mètodes tradicionals d'anàlisi d'aliments. A la bibliografia s'han descrit biosensors òptics per a la detecció d'àcid fòlic basats en SPR (de l'anglès *Surface Plasmon Resonance*) que mesuren el canvi en l'índex de refracció causat per modificacions estructurals al transductor [110-112]. Tot i que s'han obtingut bons resultats amb aquests biosensors per a la detecció d'àcid fòlic en mostres com productes làctics enriquits, els dispositius electroquímics poden proporcionar una detecció més ràpida, simple, de fàcil ús, econòmica i portable. Aquestes característiques són essencials per a la implementació en sistemes HACCP com una metodologia sistemàtica per a la seguretat alimentària.

A la Taula 1.2 es mostren els paràmetres obtinguts amb diferents metodologies per a la detecció d'àcid fòlic, en la que es detalla: i) tipus d'assaig, ii) tipus de mostra, iii) pretractament de la mostra, iv) límit de quantificació i v) percentatge de recuperació.

En aquesta tesi s'ha desenvolupat una estratègia electroquímica basada en un magneto sensor, sensible, simple, econòmica i de fàcil ús, en comparació amb els mètodes clàssics per a la detecció d'àcid fòlic en mostres de llet.

Taula 1.2: Característiques principals de diferents metodologies per a la detecció d'àcid fòlic.

Assaig	Mostra	Pretractament	LQ	Recuperació	Ref.
HPLC i cultiu microbiològic	Sèrum sanguini	minicolumna d'extracció sòlida	0.3 µg/l	78.0-109.5 %	[102]
HPLC	Vegetals, embotits i dieta de referència	Tractament enzimàtic i purificació amb columna d'afinitat	No especificat	78-113 %	[107]
HPLC	Begudes enriquides	minicolumna d'extracció sòlida	100 µg/l	Proper al 100 %	[108]
Biosensor òptic de SPR	Cereals i productes làctics per infants	Sonicació, sotmès a autoclau, centrifugació i filtració	No especificat	88-101 %	[110]
Biosensor òptic de SPR	Productes làctics per infants	Sonicació, sotmès a autoclau, centrifugació i filtració	2 µg/l	87- 96 %	[111]
Biosensor òptic de SPR	Productes làctics per infants	sotmès a autoclau i centrifugació	5 µg/100 g	95.5-109.0 %	[112]
Biosensor amperomètric	Productes làctics per infants	sotmès a autoclau i filtració	2 µg/l	88.2-98.8 % (respecte cultiu microbiològic)	[113]

1.6.2 Bacteris patògens

Els bacteris patògens més comuns associats al consum d'aliments contaminats són *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*. Aquests patògens es multipliquen ràpidament en ambients humits i calents, i en aliments rics en proteïnes, com carn, peix, marisc, llet, i ous. Alguns organismes infecciosos com *Salmonella* i *C.Perfringens* poden multiplicar-se al tracte digestiu i causar malaltia per invasió cel·lular i/o producció de toxines. Altres organismes produeixen enterotoxines (*E.coli*, *S.aureus*, *B.cereus*) en l'aliment durant el seu creixement i metabolisme.

Els bacteris *E.coli* i *Salmonella* han estat altament relacionades amb infeccions alimentàries. Totes dues pertanyen a la família de les *Enterobacteriaceae*, formada per 30 gèneres diferents, que es caracteritzen per ser gram-negatives, poder viure en un medi anaeròbic i una morfologia de “barres allargades” (en anglès, *straight rods*).

E.coli és el membre més important de les *Enterobacteriaceae* i probablement l'organisme més conegut. L'habilitat de certes soques de causar malalties es va conèixer a principis del segle XX i es pot relacionar amb diferents quadres clínics que sovint inclouen diarrea. *E.coli* es pot classificar en quatre grups: Enteropatogènica (EPEC), Enteroinvasiva (EIEC), Enterotoxigènica (ETEC) i Enterohemorràgica (EHEC). En els dos primers grups no es coneix exactament el mecanisme patogènic, en canvi en els dos darrers és molt conegut i es relaciona amb la producció de toxines. *E.coli* s'ha aïllat en una gran varietat d'aliments com llet fresca, vegetals o carn poc cuinada, però la font principal de contaminació és la carn de vedella. Cal remarcar que no tots els bacteris *E.coli* són patogènics, i és present en intestins de molts animals, incloent el dels humans [114]. Dintre de les soques d'*E.coli*, la que està més implicada en la contaminació d'aliments i que causa diverses morts cada any, és el serotip *E.coli* EHEC O157:H7. El seu nom es degut que presenta els antigens O157 i H7 específics d'aquesta soca a la membrana cel·lular. Aquest serotip destaca per la seva habilitat de viure en condicions àcides que prèviament es creia que eren letals per aquests bacteris [115].

Salmonella és la responsable dels brots de salmonel·losi, que és la principal malaltia causada per aliments contaminants. Existeixen un gran nombre de soques de *Salmonella* que es poden classificar en diferents serotips en funció de la composició antigènica de la membrana cel·lular. *Salmonella thipimurium*, causant de gastroenteritis, és la soca que s'ha aïllat en més ocasions d'aliments contaminats, com llet en pols, formatge, ous i derivats [116].

Moltes de les contaminacions alimentàries provenen d'animals portadors de patògens que poden causar malalties en humans, com es el cas d'*E.coli* i *Salmonella*, entre altres. Els animals es poden infectar a través de l'alimentació, d'altres animals o del medi ambient. Per afrontar aquest problema, les agències alimentàries han establert programes de control estrictes per eliminar la presència de patògens a la cadena alimentària. La seguretat alimentària només pot ser assegurada a través de sistemes de control estricte de la qualitat a cada etapa de la cadena alimentària, tant a les granges, com en la producció dels aliments i els punts de comercialització i venda dels productes.

Els mètodes clàssics basats en el cultiu són els mètodes de detecció estàndard per a la detecció de bacteris. Aquests mètodes solen comprendre les següents etapes: (1)

preenriquiment en un medi no selectiu, (2) enriquiment selectiu, (3) cultiu selectiu en plaques, (4) proves bioquímiques i (5) confirmació serològica.

El preenriquiment és el pas inicial durant el qual la mostra es cultiva en un medi no selectiu per a restablir cèl·lules malmeses a condicions fisiològiques estables. En el pas d'enriquiment selectiu la mostra es cultiva en un medi que conté inhibidors selectius, que permeten l'augment dels bacteris d'interès però restringeixen la proliferació de la gran majoria de bacteris. Al cultiu selectiu en plaques es fan servir cultius sòlids que restringeixen el creixement de qualsevol bacteri que no sigui el d'interès. Aquests cultius també són selectius ja que el bacteri d'interès apareix amb característiques distintives. Posteriorment els bacteris s'identifiquen amb proves bioquímiques específiques i es classifiquen amb mètodes serològics basats en l'anàlisi dels antígens del bacteri. Aquests mètodes són molt sensibles i poden proporcionar informació qualitativa i quantitativa, però el principal problema es que requereixen diversos dies per a proporcionar resultats i són molt laboriosos [114]. Tot i així, les agències oficials de seguretat alimentària, com la FDA (de l'anglès *Food and Drug Administration*), la USDA (de l'anglès *US Department of Agriculture*), la OACI (de l'anglès *Official Analytical Chemist International*) i la ISO (de l'anglès *International Organization of Standardization*), encara recomanen els mètodes clàssics de cultiu per a la detecció de bacteris en aliments.

Per a certificar la seguretat alimentària, els laboratoris oficials de control haurien de ser capaços de processar un gran nombre de mostres en un període de temps curt. Tenint en compte aquests requisits, és d'elevada importància el desenvolupament de nous mètodes ràpids alternatius als mètodes clàssics de cultiu, i que siguin idealment econòmics, sensibles i capaços de realitzar les mesures en camp, per a la detecció de riscos de contaminació bacteriana en aliments.

Aquests mètodes ràpids es farien servir per a discriminar les mostres que són negatives (absència de bacteris) i en el cas de proporcionar resultats positius es confirmarien amb un mètode de referència basat en cultiu. Per tant, l'obtenció d'un límit de detecció baix és la fita més important en el desenvolupament d'aquests nous mètodes.

Dintre dels mètodes ràpids cal destacar els mètodes instrumentals, com la citometria de flux (detecció de cèl·lules unides a marcadors fluorescents), turbidimetria i la impedància, entre altres. Dins d'aquests mètodes, els que es fan servir més assíduament són els de conductimetria i impedància, basats en la detecció del creixement dels bacteris. Aquests mètodes tenen els inconvenients de fer servir instrumentació complexa, costosa econòmicament i requereixen personal especialitzat per fer l'anàlisi, fets que limiten la seva aplicació en camp [117].

En les últimes dècades s'han desenvolupat altres metodologies basades en la detecció immunològica de bacteris, espores, virus i toxines, que proporcionen anàlisis sensibles, específiques, reproduïbles i que estan disponibles en immunoassaigs comercials per una gran varietat de microorganismes i dels seus productes metabòlics en aliments [18].

Per altra banda, els assaigs basats en la hibridació amb seqüències de DNA són progressivament més específics i sensibles que els mètodes immunològics. Sovint, la sensibilitat d'aquests assaigs depèn de la quantitat inicial de DNA, i en moltes ocasions no permeten la detecció per sota de 10^5 bacteris per gram de mostra. Aquest desavantatge es pot superar amb cultius de preenriquiment i/o mitjançant la tècnica de PCR (§ 1.3.1.1). La tècnica de PCR permet l'amplificació exponencial de la mostra original amb un simple procés enzimàtic, fet que ha contribuït de manera decisiva a augmentar la sensibilitat i la selectivitat dels assaigs basats en àcids nucleics [118]. Un problema associat a la PCR és que el DNA pot romandre intacte en aliments processats, en forma lliure o present en bacteris morts, i ser eventualment amplificat i posteriorment detectat, de manera que resultin falsos positius. Per tant, aquest mètode requereix un període d'enriquiment que retarda els resultats però que assegura una bona sensibilitat, de l'orde de 3 CFU (de l'anglès *Colony-Forming Unit*) per 25 grams de mostra alimentària [119].

Altres mètodes ràpids d'anàlisi són els biosensors de bacteris patògens, que es poden classificar en funció del mètode de transducció del senyal en: òptics, màssics, electroquímics i tèrmics. Els biosensors òptics són els més populars i com a principal avantatge cal destacar el fet que detecten bacteris patògens sense necessitat de marcatge. Dins d'aquests destaquen els biosensors de SPR (de l'anglès *Surface Plasmon Resonance*) basats en el mesurament del canvi en l'índex de refracció causat per modificacions estructurals al transductor. Aquesta metodologia tot i que s'ha aplicat exitosament a la detecció de bacteris [120,121] té els inconvenients de l'alt cost dels equips associats i que requereixen personal entrenat. En canvi, la detecció electroquímica és més robusta, i els equips associats són fàcils de fer servir, econòmics i portàtils. Addicionalment aquests dispositius poden treballar amb medis tèrbols característics de mostres alimentàries. Respecte als elements de reconeixement molecular emprats per a la detecció de patògens en biosensors, destaquen els receptors immunològics i els àcids nucleics [122]. Com a principal desavantatge cal destacar que requereixen marcatge, normalment de tipus enzimàtic. Recentment s'han publicat treballs que es beneficien de l'ús de partícules magnètiques com a suports de bioassaigs immunològics i genètics [123,124]. El terme de 'separació immunomagnètica' (IMS, de l'anglès *immunomagnetic separation*) designa l'ús de

partícules magnètiques per a la captura de la bactèria anàlit, mitjançant una reacció immunològica, amb la separació de la matriu i la concentració en volums petits per a la detecció posterior [60]. Els procediments IMS s'han combinat amb estratègies de detecció òptiques [125,126] i electroquímiques [127,128].

A la Taula 1.3 s'inclou un resum de les publicacions més destacades de mètodes ràpids d'anàlisi desenvolupats per a la determinació, en aquest cas, del bacteri *Salmonella*, que representa el bacteri que s'ha fet servir com a model de patògen alimentari en les aplicacions desenvolupades en la present tesi, conjuntament amb *E.coli* enteropatògena. En aquesta taula es detalla: i) tipus d'assaig, ii) tipus de mostra alimentària, iii) presència de preenriquiment, iv) temps total de l'anàlisi, i v) límit de detecció.

Cal destacar que la taula mostra mètodes ràpids basats en informació immunològica, en informació genètica i mètodes que combinen els dos tipus de reconeixement. Alguns d'aquests mètodes també inclouen un pas previ d'immunoseparació magnètica, per a concentrar els bacteris des de mostres alimentàries complexes a medis més adients per a realitzar les reaccions biològiques. Els límits de detecció per als mètodes de reacció immunològica són de l'ordre de 10^3 CFU/ml, mentre que els mètodes de PCR proporcionen límits de detecció compresos entre 10^1 to 10^4 CFU/ml, depenent de l'eficiència de l'extracció del DNA, amb o sense etapa d'enriquiment, i la naturalesa de les mostres alimentàries.

D'aquesta taula es pot deduir que, en tots els casos reportats, per obtenir els límits de detecció requerits per les agències de seguretat alimentària per a la majoria d'aliments (absència en 25 grams d'aliment) és necessari realitzar un pas de preenriquiment per amplificar el nombre de cèl·lules a nivells detectables. El pas de preenriquiment també és vital per a la regeneració de cèl·lules que han estat malmeses per les condicions adverses del processament dels aliments. Si no s'inclou aquest pas en el mètode, les cèl·lules malmeses no es podrien detectar.

La present tesi doctoral aborda aquesta problemàtica en un dels seus eixos, mitjançant el disseny d'estratègies alternatives als mètodes ràpids reportats, i es dirigeix principalment a solucionar aspectes relacionats amb el temps d'anàlisi, la sensibilitat i la integració metodològica, mitjançant el desenvolupament de dispositius genosensors de detecció electroquímica.

Taula 1.3: Característiques principals de diferents metodologies per a la detecció de *Salmonella*.

Assaig (immunològic)	Mostra	Preenriquiment	Temps d'anàlisi	LD	Ref.
ELISA amb detecció òptica, Immunoassaig sandvitx	aliments, inoculats artificialment	16 h	-3 h, per detectar 10^5 CFU/ml -3 h + 16 h (preenriquiment), per detectar 10 CFU/25 g	10^5 CFU/ml	[129]
Immunosensor piezoelèctric	Tampó, inoculat artificialment	No realitzat	5 h	10^5 CFU/ml	[130]
Immunosensor electroquímic, immunoassaig sandvitx	Diferents aliments, incloent carn de vedella, inoculada artificialment	18-22 h	-4 h, per detectar 5×10^4 CFU/ml -4 h + 18 h (preenriquiment), per detectar 1-5 CFU/g	10^4 CFU/ml	[131]
Immunosensor piezoelèctric	Tampó, inoculat artificialment	No realitzat	45 min	10^6 CFU/ml	[132]
Immunosensor electroquímic, immunoassaig sandvitx	Tampó, inoculat artificialment	No realitzat	~120 min	5×10^4 CFU/ml	[133]
Immunoassaig magnètic lligat a enzims amb detecció electroquímica (amb separació immunomagnètica)	Tampó, inoculat artificialment	No realitzat	80 min	8×10^3 CFU/ml	[134]
Immunoassaig magnètic amb detecció electroquimioluminiscent (amb separació immunomagnètica)	Diferents aliments, inoculats artificialment	No realitzat	1 h	10^3 CFU/ml	[135]
Biosensor òptic sense marcatge	Tampó, inoculat artificialment	No realitzat	5 min	5×10^5 CFU/ml	[136]
Immunosensor piezoelèctric	Tampó, inoculat artificialment	No realitzat	25 min	5.3×10^5 CFU/ml	[137]
Immunosensor piezoelèctric	Tampó, inoculat artificialment	No realitzat	30-90 min	9.9×10^5 CFU/ml	[138]
Immunoassaig lligat a enzims amb detecció electroquímica	Tampó, inoculat artificialment	No realitzat	2 h	5×10^3 CFU/ml	[139]
Immunosensor potenciomètric, immunoassaig sandvitx	pollastre, inoculat artificialment	No realitzat	15 min	10^2 CFU/ml	[140]
Immunosensor amperomètric, immunoassaig sandvitx	Tampó, inoculat artificialment	No realitzat	~35 min	50 CFU/ml	[141]
Biosensor òptic sense marcatge	Pollastre, inoculat artificialment	12 h	-10 min, per detectar 10^5 CFU/ml -10 min+12 h (preenriquiment), per detectar 20 CFU/ml	10^5 CFU/ml	[142]

Assaig (immunològic)	Mostra	Preenriquiment	Temps d'anàlisi	LD	Ref.
Mètode immunoelctroquímich amb separació immunomagnètica	Pollastre i aigua, inoculats artificialment	No realitzat	2.5 h	5×10^3 CFU/ml	[143]
Immunosensor piezoelèctric	Llet, inoculada artificialment	No realitzat	1 h	10^6 CFU/ml	[144]
Immunosensor piezoelèctric	Tampó, inoculat artificialment	No realitzat	~5 min	3.5×10^2 CFU/ml	[145]
ELISA amb detecció electroquímica, immunoassaig sandvitx	Carn (porc, pollastre i vedella), inoculades artificialment	Com a mínim 5 h	-3 h, per detectar 5×10^3 CFU/ml -3 h + 5 h (preenriquiment), per detectar 1-10 CFU/25 g	5×10^3 CFU/ml	[146]
Immunosensor de SPR	Tampó, inoculat artificialment	No realitzat	20 min	10^6 CFU/ml	[147]
Immunosensor electroquímich, immunoassaig sandvitx amb IMS	Pollastre, vedella i aigua, inoculats artificialment	No realitzat	2.5 h	1.09×10^3 CFU/ml	[148]
Immunosensor de SPR (Biacore)	Tampó, inoculat artificialment	No realitzat	25 min	10^7 CFU/ml	[149]
Biosensor de fibra òptica basat en FRET	Porc, inoculat artificialment	No realitzat	5 min	10^5 CFU/g	[150]
Immunosensor òptic basat en quantum dots i IMS	Tampó, inoculat artificialment	No realitzat	1 h	10^4 CFU/ml	[151]
Mesures de capacitància i IMS	Tampó, inoculat artificialment	De 1 h a 8 h	8 h, per detectar 10^1 CFU/ml 1.5 h, per detectar 10^6 CFU/ml	10^1 CFU/ml	[152]
Immunosensor de SPR	Llet, inoculada artificialment	No realitzat	1 h	1.25×10^5 CFU/ml	[153]

Assaig (genètic)	Mostra	Preenriquiment	Temps d'anàlisi	LD	Ref.
Sistema comercial de PCR Probelia™	Llet desnatada en pols i formatge ricotta, inoculats artificialment	16-20 h	24-28 h, per detectar 1-2 CFU/25 g	8 CFU/ml (en cultiu pur)	[154]
Q-PCR amb molècules SYBR Green I	Aus, inoculades artificialment	24 h	27 h, per detectar 10^3 CFU/ml	10^3 CFU/ml	[155]
PCR / electroforesi de gel d'agarosa	Carn (porc, pollastre i vedella), inoculats artificialment	5 h	~ 8 h	1 to 10 CFU/25 g	[156]

Assaig (immunològic i genètic)	Mostra	Preenriquiment	Temps d'anàlisi	LD	Ref.
PCR a temps real amb separació immunomagnètica	Carn, inoculada artificialment i contaminada naturalment	6 h	12-13 h per detectar 10 CFU/25 g	10 CFU/25 g	[157]

1.7 BIBLIOGRAFIA

- [1] Hartl, D.L., Orel, V. What did Gregor Mendel think he discovered? *Genetics*, 131 (1992) 245-253.
- [2] Bowler, P.J. Putting the peas in context. *Gregor Mendel: The first Geneticist. Nature*, 378 (1995) 100.
- [3] Clark, D. *Molecular Biology: Understanding the genetic revolution*, 2005. Academic Press, Oxford.
- [4] Zamenhof, G., Brawerman, G., Chargaff, E. On the desoxyribose nucleic acids from several microorganisms. *Biochimica et Biophysica Acta*, 9 (1952) 402-405.
- [5] Franklin, R., Gosling, R.G. Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Nature*, 171 (1953) 740-741.
- [6] Watson, J.D., Crick, F.H.C. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171 (1953) 737-738.
- [7] Nelson, D. L., Cox, M. M. *Lehninger. Principles of biochemistry*, 2004. W.H.Freeman, New York.
- [8] Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P.A., Rodwell, V. W. *Harper's illustrated biochemistry*, 2003. Mc Graw Hill, New York.
- [9] Davis, K. *Cracking the genome*, 2001. Simon and Schuster, New York.
- [10] Chakravarti, A. Single nucleotide polymorphisms: to a future of genetic medicine. *Nature*, 409 (2001) 822-823.
- [11] <http://ncbi.nlm.nih.gov/>. Data de consulta: 10 Abril 2009.
- [12] International Human Genome Sequencing Consortium. *Nature*, 409 (2001) 814-941.
- [13] Venter, J.C., et al. The sequence of the Human Genome. *Science*, 291 (2001) 1304-1351.
- [14] The International SNP Map Working Group. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*, 409 (2001) 928-933.
- [15] Jimenez-Sanchez, G., Childs, B., Valle, D. Human disease genes. *Nature*, 409 (2001) 853-855.
- [16] http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/home.shtml. Data de consulta: 12 Abril 2009.
- [17] Celada, A. *Immunología básica*, 1994. Editorial Labor, Barcelona.
- [18] Sharma, A. Enzyme immunoassays: overview. *Encyclopedia of Food Microbiology*, p. 625-633, 1999. Elsevier, Oxford.
- [19] Yang, M, McGovern, M. E., Thompson, M. Genosensor technology and the detection of interfacial nucleic acid chemistry. *Analytica Chimica Acta*, 346 (1997) 259-275.
- [20] Lampel, K.A., Levy, D.D. DNA-Based Assays. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, p. 79-85, 2002. Elsevier, Oxford.

- [21] Griffiths, M. Nucleic acid-based assays. *Encyclopedia of Food Microbiology*, p 1599-1608, 1999. Elsevier, Oxford.
- [22] Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., Erlich, H. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230 (1985) 1350-1354.
- [23] Mullis, K., Faloona, F. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155 (1987) 335-350.
- [24] Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., Mullis, K., Erlich, H. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239 (1988) 487-491.
- [25] Lockley, A. K., Jones, C.G., Bruce, J.S., Franklin, S.J., Bardsley, R.G. Colorimetric detection on immobilised PCR products generated on a solid support. *Nucleic Acids Research*, 25 (1997) 1313-1314.
- [26] Erlich, H.A. *PCR Technology: principles and applications for DNA amplification*, 1989. Stockton Press, New York.
- [27] Marmiroli, N., Maestri, E. Polymerase chain reaction (PCR). *Food Toxicants Analysis*, p. 147-187, 2007. Elsevier, Oxford.
- [28] Lutz, H., Leutenegger, C., Hofmann-Lehmann, R. The role of polymerase chain reaction and its newer developments in feline medicine. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 1 (1999) 89-100.
- [29] Ellis, J.S., Zambon, M.C. Molecular diagnosis of influenza. *Reviews in Medical Virology*, 12 (2002) 375-389.
- [30] Jiang Gu, M.D. *In Situ Polymerase Chain reaction and related Technology*, 1995. Eaton Publishing, USA.
- [31] Teo, I.A., Shaunak, S. Polymerase chain reaction *in situ*: an appraisal of emerging technique. *Histochemical Journal*, 27 (1995) 647-659.
- [32] Morrison, T.B., Weis, J.J., Wittwer, C.T. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR green I monitoring during amplification. *Biotechniques*, 24 (1998) 954-958.
- [33] Simpson, D.A.C., Feeney, S., Boyle, C., Stitt, A.W. Retinal VEGF mRNA measured by SYBR Green I fluorescence: A versatile approach to quantitative PCR. *Molecular Vision*, 6 (2000) 178-183.
- [34] Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., Gelfand, D.H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *PNAS*, 88 (1991) 7276-7280.
- [35] Stryer, L. Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annual Review of Biochemistry*, 47 (1978) 819-846.
- [36] Gibson, U.E.M, Heid, C.A., Williams, P.M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research*, 6 (1996) 995-1001.

- [37] Killgore, G.E., Holloway, B., Tenover, F. C. A 5' nuclease PCR (TaqMan) high-throughput assay for detection of the *mecA* gene in staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (2000) 2516-2519.
- [38] Martell, M., Gomez, J., Esteban, J.L., Sauleda, S., Quer, J., Cabot, B., Esteban, R., Guardia, J. High-throughput real-time reverse transcription-PCR quantitation of hepatitis C Virus RNA. *Journal of Clinical Microbiology*, 37 (1999) 327-332.
- [39] Oleksiewicz, M.B., Donaldson, A.I., Alexandersen, S. Development of a novel real-time RT-PCR assay for quantification of foot-and-mouth disease virus in diverse porcine tissues. *Journal of Virological Methods*, 92 (2001) 23-35.
- [40] Tyagi, S., Kramer, F. R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnology*, 14 (1996) 303-308.
- [41] Smit M. L., Giesenford, B.A.J., Vet, J.A.M., Trijbels, F.J.M., Blom, H.J. Semiautomated DNA mutation analysis using a robotic workstation and molecular beacons. *Clinical Chemistry*, 47 (2001) 739-744.
- [42] Durand, R., Eslahpazire, J., Jafari, S., Delabre, J-F., Mamorat-Khuong, A., di Piazza, J-P., Le Bras, J. Use of molecular beacons to detect an antifolate resistance-associated mutation in *plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44 (2000) 3461-3464.
- [43] Kaboev, O.K., Luchkina, L.A., Tret'iakov, A.N. Bahrmand, A.R. PCR hot start using primers with the structure of molecular beacons. *Nucleic Acids Research*, 28 (2000) e94.
- [44] Bernard, P.S., Wittwer, C.T. Homogeneous amplification and variant detection by fluorescent hybridization probes. *Clinical Chemistry*, 46 (2000) 147-148.
- [45] Neoh, S.H., Brisco, M.J., Firgaira, F.A., Trainor, K.J., Turner, D.R., Morley, A.A. Rapid detection of the factor V Leiden (1691 G>A) and haemochromatosis (845 G>A) mutation by fluorescence resonance energy transfer (FRET) and real time. *Journal of Clinical Pathology*, 52 (1999) 766-769.
- [46] Bellin, T., Pulz, M., Matussek, A., Hempen, H-G., and Gunzer, F. Rapid detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* by real-time PCR with fluorescent hybridization probes *Journal of Clinical Microbiology*, 39 (2001) 370-374.
- [47] Schalasta, G., Eggers, M., Schmid, M., Enders, G. Analysisi of human cytomegalovirus DNA in urines of newborns and infants by means of a new ultrarapid real-time PCR-system. *Journal of Clinical Virology*, 19 (2000) 175-185.
- [48] Applied Biosystems Support Tutorials. Real-time PCR vs traditional PCR. <http://www.appliedbiosystems.com/support/tutorials/>. Data de consulta: 21 Abril 2009.
- [49] Wong, M.L., Medrano, J.F. The PCR for mRNA quantification. *BioTechniques*, 39 (2005) 75-85.
- [50] Ginzinger, D.G., Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*, 30 (2002) 503-512.
- [51] Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., Mathieu, C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, 25 (2001) 386-401.

- [52] Bonetta, L. Prime time for real-time PCR. *Nature methods*, 2 (2005) 305-312.
- [53] Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsoon, M., Frootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Stahberg, A., Zoric, N. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27 (2006) 95-125.
- [54] Switzer, R., Garrity, L. *Experimental biochemistry*, 1999. W.H. Freeman and company, England.
- [55] Chu, F.S. Immunoassays. Radioimmunoassay and enzyme immunoassay. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, p. 3248-3255, 2003. Elsevier, Oxford.
- [56] Oubiña, A., Ballesteros, B., Carrasco, P.B., Galvé, R., Gascón, J., Iglesias F., et al. Immunoassay for environmental analysis. Sample handling and trace analysis of pollutants: Techniques, applications and quality assurance, p. 287-339, 1999. Elsevier, Oxford.
- [57] Solé, S. Merkoçi, A., Alegret, S. New materials for electrochemical sensing III. Beads. *Trends in Analytical Chemistry*, 20 (2001) 102-110.
- [58] Wang, J., Erdem, A. An overview to magnetic beads used in electrochemical DNA biosensors. *Nato Science Series*, 102 (2003) 297-303.
- [59] Cudjoe, K.S. Salmonella. Detection by immunomagnetic particle-based assay. *Encyclopedia of Food Microbiology*, p. 1968-1976, 2004. Academic Press, Oxford.
- [60] Fratamico, P., M., Crawford, C.G. Escherichia coli 0157. Detection by commercial immunomagnetic particle-based assays. *Encyclopedia of Food Microbiology*, p. 654-661, 2004. Elsevier, Oxford.
- [61] Stepaniak, L., Sorhaug, T., Jedrychowski, L. Analysis. Immunochemical. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, p. 62-67, 2004. Elsevier, Oxford.
- [62] <http://www.invitrogen.com/dynal>. Data de consulta: 28 Abril 2009.
- [63] Gitlin, G., Bayer, E.A., Wilchek, M. Studies on the biotin-binding site of avidin. Lysine residues involved in the active site. *Biochemistry Journal*, 242 (1987) 923-926.
- [64] Bitsch, R. Biotin. Properties and Determination in *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, p. 506-516, 2003. Elsevier, Oxford.
- [65] Hermanson, G. T. Avidin-Biotin Systems, in *Bioconjugate Techniques*, p.570-592, 1996. Academic Press, San Diego, CA.
- [66] Jones, M. L., Kurzban, G.P. Noncooperativity of biotin binding to tetrameric streptavidin. *Biochemistry*, 34 (1995) 11750-11756.
- [67] Savge, M.D., Mattson, G., Desai, S., Nielander, G.W., Morgensen, S., Conklin, E.J. Components of Avidin-Biotin Technology in *Avidin-Biotin Chemistry: A handbook*, p. 1-13, 1992. Pierce Chemical Company, Rockford, IL.
- [68] Alegret, S., del Valle, M., Merkoçi, A. *Sensores electroquímicos*, 2004. Servei de Publicacions de la Universitat Autònoma de Barcelona.
- [69] Thévenot, D.R., Toth, K., Durst, R.A., Wilson, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors and Bioelectronics*, 16 (2001) 121-131.
- [70] Goldschmidt, M. C. Biosensors: Scope in microbiological analysis. *Encyclopedia of Food Microbiology*, p. 268-279, 1999. Elsevier, Oxford.

- [71] Pancrazzio, J.J., Whelan, J.P., Borkholder, D.A., Ma, W., Stenger, D.A. Development and application of cell-based biosensors. *Annals of Biomedical Engineering*, 27 (1999) 697-711.
- [72] Gu, M.B., Mitchell, R.J., Kim, B.C. Whole-cell-based biosensors for environmental biomonitoring and application. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 87 (2004) 269-305.
- [73] Qin, W., Zhang, Z., Peng, Y. Plant tissue-based chemiluminescence flow biosensor for urea. *Analytica Chimica Acta*, 407 (2000) 81-86.
- [74] Liawrungrath, S., Purachat, P., Oungpipat, W., Dongduen, C. Sunflower leaves tissue-based bioelectrode with amperometric flow-injection system for glycolic acid determination in urine. *Talanta*, 77 (2008) 500-506.
- [75] Nanduri, V., Sorokulova, I.B., Samoylov, A.M., Simonian, A. L., Petrenko, V. A., Vodyanoy, V. Phage as a molecular recognition element in biosensors immobilized by physical adsorption. *Biosensors and Bioelectronics*, 22 (2007) 986-992.
- [76] Timur, S., Haghghi, B., Tkac, J., Pazarlioglu, N., Telefoncu, A., Gorton, L. Electrical wiring of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* with osmium redox polymers. *Bioelectrochemistry*, 71 (2007) 38-45.
- [77] Vo-Dinh, T., Cullum, B. Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. *Fresenius' Journal Analytical Chemistry*, 366 (2000) 540-551.
- [78] Bakker, E., Diamond, D., Lewenstam, A., Pretsch, E. Ion sensors: current limits and new trends. *Analytica Chimica Acta*, 393 (1999) 11-18.
- [79] Yuqing, M., Jianguo, G., Jianrong, C. Ion sensitive field effect transducer-based biosensors. *Biotechnology Advances*, 21 (2003) 527-534.
- [80] Cortina, M., Esplandiú, M.J., Alegret, S., del Valle, M. Urea impedimetric biosensor based on polymer degradation onto interdigitated electrodes. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 118 (2006) 84-89.
- [81] Tothill, I. E., Turner, A.P.F. Biosensors. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, p. 489-499, 2003. Elsevier, Oxford.
- [82] O'Connell, P. Analysis: Electrochemical Analysis. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, p. 101-106, 2004. Elsevier, Oxford.
- [83] Albery, J. *Electrode Kinetics*, 1975. Oxford University Press, Oxford.
- [84] Martorell, D. Desenvolupament de biosensors electroquímics per a la determinació d'inhibidors enzimàtics. *Tesi Doctoral*. Universitat Autònoma de Barcelona, 1995.
- [85] Mikkelsen, S.R., Cortón, E. *Bioanalytical Chemistry*, 2004. John Wiley and Sons, New Jersey.
- [86] Céspedes, F., Martínez-Fàbregas, E., Alegret, S. New materials for electrochemical sensing I. Rigid conducting composites. *Trends in Analytical Chemistry*, 15 (1996) 296-304.
- [87] Albareda-Sirvent, M., Merkoçi, A., Alegret, S. Thick-film biosensors for pesticides produced by screen-printing of graphite-epoxy composite and biocomposite pastes. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 79 (2001) 48-57.

- [88] Pividori, M.I, Merkoçi, A., Alegret, S. Graphite-epoxy composites as a new transducing material for electrochemical genosensing. *Biosensors and Bioelectronics*, 19 (2003) 473-484.
- [89] Alegret, S. Rigid carbon-polymer biocomposites for electrochemical sensing. A review. *Analyst*, 121 (1996) 1751-1758.
- [90] Céspedes, F., Alegret, S. New materials for electrochemical sensing II. Rigid carbon-polymer biocomposites. *Trends in Analytical Chemistry*, 19 (2000) 276-285.
- [91] Wang, J., Rivas, G., Cai, X., Shiraishi, H., Farias, P.A.M., Dontha, N., Luo, D. Accumulation and trace measurements of phenothiazine drugs at DNA-modified electrodes. *Analytica Acta*, 332 (1996) 139-144.
- [92] Erdem, A., Ozsoz, M. Electrochemical DNA biosensors based on DNA-drug interactions. *Electroanalysis*, 14 (2002) 965-974.
- [93] Pividori, M.I. Nuevos genosensores amperométricos. Diseño y construcción. Tesis doctoral. Bellaterra, Universitat Autònoma de Barcelona, 2002.
- [94] Teles, F.R.R., Fonseca, L.P. Trends in DNA biosensors. *Talanta*, 77 (2008) 606-623.
- [95] Lucarelli, F., Tombelli, S., Minunni, M., Marrazza, G., Mascini, M. Electrochemical and piezoelectric DNA biosensors for hybridisation detection. *Analytica Chimica Acta*, 609 (2008) 139-159.
- [96] Wang, H., Shen, G., Yu, R. Chapter 9: Aspects of recent development of immunosensors. *Electrochemical sensors, biosensors and their biomedical applications*, p. 237-260, 2008. Academic Press, Oxford.
- [97] Ricci, F., Volpe, G., Micheli, L., Palleschi, G. A review on novel developments and applications of immunosensors in food analysis. *Analytica Chimica Acta*, 605 (2007) 111-129.
- [98] Fowler, J.M., Wong, D.K.Y., Halsall, H.B., Heineman, W.R. Chapter 5: Recent developments in electrochemical immunoassays and immunosensors. *Electrochemical sensors, biosensors and their biomedical applications*, p. 115-143, 2008. Academic Press, Oxford.
- [99] Rooney, R., Wall, P.G. Food Safety. *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*, p. 2682-2688, 2003. Elsevier, Oxford.
- [100] Todd, E. Contamination of food. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, p. 1593-1600, 2003. Academic Press, Oxford.
- [101] Slatter, J. Hazard analysis critical control point. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, p. 3023-3028, 2003. Academic Press, Oxford.
- [102] Sweeney, R.M., McPartlin, J., Weir, G.W., Scott, J.M. Measurements of sub-nanomolar concentrations of unmetabolised folic acid in serum. *Journal of Chromatography B*, 788 (2003) 187-191.
- [103] Das Sarma, J., Duttagupta, C., Ali, E., Dhar, T.K. Antibody to folic acid: increased specificity and sensitivity in ELISA by using [ϵ]-aminocaproic acid modified BSA as the carrier protein. *Journal of Immunological Methods*, 184 (1995) 1-6.
- [104] Reichert, N., Rubach, K. Determination of biotin and folic-acid in vitamin-containing foods by competitive binding protein assays (Cbpa) and enzyme immunoassays (Elisa). *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 87 (1991) 341-345.

- [105] Palecek, E., Kizek, R., Havran, L., Billova, S., Fojta, M. Electrochemical enzyme-linked immunoassay in DNA hybridization sensor. *Analytica Chimica Acta*, 469 (2002) 73-83.
- [106] Centi, S., Laschi, S., Fránek, M., Mascini, M. A disposable immunomagnetic electrochemical sensor based on functionalised magnetic beads on carbon-based screen-printed electrodes (SPCEs) for the detection of polychlorinated biphenyls (PCBs). *Analytica Chimica Acta*, 538 (2005) 205-212.
- [107] Ruggeri, S., Vahteristo, L.T., Aguzzi, A., Finglas, P., Carnovale, E. Determination of folate vitamers in food and in Italian reference diet by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 855 (1999) 237-245.
- [108] Perez Prieto, S., Cancho Grande, B., Garcia Falcon, S., Simal Gandara, J. Screening for folic acid content in vitamin-fortified beverages, 17 (2006) 900-904.
- [109] Quinlivan, E.P., Hanson, A.D., Gregory, J.F. The analysis of folate and its metabolic precursors in biological samples. *Analytical Biochemistry*, 348 (2006) 163-184.
- [110] Caselunghe, M.C.B., Lindeberg, J. Biosensor-based determination of folic acid in fortified food. *Food Chemistry*, 70 (2000) 523-532.
- [111] Indyk, H.E., Evans, E.A., Caselunghe, M.C.B., Person, B.S., Finglas, P.M., Woollard, D.C., Filonzi, E.L. Determination of folate in infant formula and milk by optical biosensor-based immunoassay. *Journal of AOAC International*, 83 (2000) 1141-1148.
- [112] Gao, Y., Guo, F., Gokavi, S., Chow, A., Sheng, Q., Guo, M. Quantification of water-soluble vitamins in milk-based infant formulae using biosensor-based assays. *Food Chemistry*, 110 (2008) 769-776.
- [113] Hoegger, D., Morier, P., Vollet, C., Heini, D., Reymond, F., Rossier, J.S. Disposable microfluidic ELISA for the rapid determination of folic acid content in food products. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387 (2007) 267-275.
- [114] Pandey, A., Joshi, V.K., Nigam, P., Soccol, C.R. Enterobacteriaceae, coliforms and E.coli. *Encyclopedia of Food Microbiology*, p. 604-610, 2004. Academic Press, Oxford.
- [115] Batt, C.A. Escherichia coli. *Encyclopedia of Food Microbiology*, p. 633-640, 2004. Academic Press, Oxford.
- [116] Cox, J. Salmonella. *Encyclopedia of Food Microbiology*, p. 1928-1937, 2004. Academic Press, Oxford.
- [117] Ivnitski, D., Abel-Hamid, I., Atanasov, P., Wilkins, E. Biosensors for detection of pathogenic bacteria. *Biosensors and Bioelectronics*, 14 (1999) 599-624.
- [118] Upmann, M., Bonaparte, C. Rapid methods for food hygiene inspection. *Encyclopedia of Food Microbiology*, p. 1887-1894, 2004. Academic Press, Oxford.
- [119] Humphrey, T., Stephens, P. Salmonella detection. *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*, p. 5079-5084, 2003. Academic Press, Oxford.
- [120] Taylor, A.D., Yu, Q., Chen, S., Homola, J., Jiang, S. Comparison of E.coli O157:H7 preparation methods used for detection with surface plasmon resonance sensor. *Sensors and Actuators B*, 107 (2005) 202-208.

- [121] Waswa, J., Irudayaraj, J., DebRoy, C. Direct detection of E.coli O157:H7 in selected food systems by surface plasmon resonance biosensor. *LWT-Food Science and Technology*, 40 (2007) 187-192.
- [122] Lazcka, O., Del Campo, J.F., Muñoz, F.X. Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 22 (2007) 1205-1217.
- [123] Palecek, E., Fojta, M. Magnetic beads as versatile tools for electrochemical DNA and protein biosensing. *Talanta*, 74 (2007) 276-290.
- [124] Kuramitz, H. Magnetic microbead-based electrochemical immunoassays. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394 (2009) 61-69.
- [125] Gehring, A.G., Irwin, P.L., Reed, S.A., Tu, S-I. Enzyme-linked immunomagnetic chemiluminescence incorporating anti-H7 and anti-O157:H7. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 14 (2006) 349-361.
- [126] Varshney, M., Li, Y.B., Nanapanni R., Johnson, M.G., Griffis, C.L. A chemiluminescence biosensor coupled with immunomagnetic separation for rapid detection of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 11 (2003) 111-131.
- [127] Gehring, A.G., Crawford, C.G., Mazenko, R.S., VanHouten, L.J., Brewster, J.D. Enzyme-linked immunomagnetic electrochemical detection of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Immunological Methods*, 195 (1996) 15-25.
- [128] Gehring, A.G., Brewster, J.D., Irwin, P.L., Tu, S.I., Van Houten, L.J. 1-Naphthyl phosphate as an enzymatic substrate for enzyme-linked immunomagnetic electrochemistry. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 469 (1999) 27-33.
- [129] Lee, H.A., Wyatt, G.M., Bramham, S., Morgan, M.R.A. Enzyme-linked immunosorbent assay for *Salmonella typhimurium* in food: feasibility of 1-day *Salmonella* detection. *Applied and Environmental Microbiology*, 56 (1990)1541-1546.
- [130] Prusak-Sochaczewski, E., Luong, J.H.T., Guilbault, G.G. Development of a piezoelectric immunosensor for the detection of *Salmonella typhimurium*. *Enzyme and Microbial Technology*, 12 (1990) 173-177.
- [131] Brooks, J.L.; Mirhabibollahi, B.; Kroll, R.G. Experimental enzyme-linked amperometric immunosensors for the detection of salmonellas in food. *Journal of Applied Microbiology*, 73 (1992) 189-196.
- [132] König, B., Grätzel, M. Detection of viruses and bacteria with piezoelectric immunosensors. *Analytical Letters*, 26 (1993) 1567-1585.
- [133] Brewster, J.D., Gehring, A.G., Mazenko, R.S., Van Houten, L.J., Crawford, C.J. Immunochemical Assays for Bacteria: Use of Epifluorescence Microscopy and Rapid-Scan Electrochemical Techniques in Development of an Assay for *Salmonella*. *Analytical Chemistry*, 68 (1996) 4153-4159.
- [134] Gehring, A.G.; Crawford, C.G.; Mazenko, R.S.; Van Houten, L.J.; Brewster, J.D. Enzyme-linked immunomagnetic electrochemical detection of *Salmonella typhimurium*. *Journal of immunological methods*, 195 (1996) 15-25.

- [135] Yu, H., Bruno, J.G. Immunomagnetic-Electrochemiluminiscent detection of *Escherichia coli* O157 and *Salmonella typhimurium* in foods and environmental waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (1996) 587-592.
- [136] Schneider, B.H.; Edwards, J.G.; Hartman, N.F. Hartman interferometer: versatile integrated optic sensor for label-free, real-time quantification of nucleic acids, proteins, and pathogens. *Clinical Chemistry*, 43 (1997) 1757-1763.
- [137] Ye, J., Letcher, S.V., Rand, A.G. Piezoelectric biosensor for detection of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Food Science*, 62 (1997) 1067-1072.
- [138] Park, I-S., Kim, N. Thiolated *Salmonella* antibody immobilization onto the gold surface of piezoelectric quartz crystal. *Biosensors and Bioelectronics*, 13 (1998) 1091-1097.
- [139] Yang, Z., Li, Y., Balagtas, C., Slavik, M., Paul, D. Immunochemical assay in combination with homogeneous enzyme-labeled antibody conjugation for rapid detection of *Salmonella*. *Electroanalysis*, 10 (1998) 913-916.
- [140] Dill, K., Stanker, L.H., Young, C.R. Detection of salmonella in poultry using silicon chip-based biosensor. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 41 (1999) 61-67.
- [141] Abdel-Hamid, I., Ivnitski, D., Atanasov, P.; Wilkins, E. Highly sensitive immunoassay system for rapid detection of bacteria. *Analytica Chimica Acta*, 399 (1999) 99-108.
- [142] Seo, K. H., Brackett, R. E., Hartman, N. F., Campbell, D. P. Development of a rapid response biosensor for detection of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Food Protection*, 62 (1999) 431-437.
- [143] Che, Y. H., Li, Y., Paul, D., Slavik, M. Rapid and specific detection of *Salmonella typhimurium* in chicken carcass wash water using an immunochemical method. *Journal of Food Protection*, 63 (2000) 1043-1048.
- [144] Park, I-S., Kim, W-Y., Kim, N. Operational characteristics of an antibody-immobilized QCM system detecting *Salmonella* spp. *Biosensors and Bioelectronics*, 15 (2000) 167-172.
- [145] Pathirana, S.T., Barbaree, J., Chin, B.A., Hartell, M.G., Neely, W.C., Vodyanoy, V. Rapid and sensitive biosensor for *Salmonella*. *Biosensors and Bioelectronics*, 15 (2000) 135-141.
- [146] Croci, L., Delibato, E., Volpe, G., Palleschi, G. A rapid electrochemical ELISA for the detection of *Salmonella* in meat samples. *Analytical Letters*, 34 (2001) 2597-2607.
- [147] Koubova, V., Brynda, E., Karasova, L., Skvor, J., Homola, J., Dostalek, J., Tobiska, P., Rosicky, J. Detection of foodborne pathogens using surface plasmon resonance biosensors. *Sensors and Actuators B* 74 (2001) 100-105.
- [148] Yang, L.J.; Ruan, C.M.; Li, Y.B. Rapid detection of *Salmonella typhimurium* in food samples using a bienzyme electrochemical biosensor with flow injection. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 9 (2001) 229-240.
- [149] Bokken, G.C.A.M., Corbee, R. J., Knapen, F., Bergwerff, A. A. Immunochemical detection of *Salmonella* group B, D and E using an optical surface plasmon resonance biosensor. *FEMS Microbiology Letters*, 222 (2003) 75-82.
- [150] Ko, S.H., Grant, S.A. A novel FRET-based optical fiber biosensor for rapid detection of *Salmonella typhimurium*. *Biosensors and Bioelectronics*, 21 (2006) 1283-1290.

- [151] Yang, L.J., Li, Y.B. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium using quantum dots as fluorescence labels. *Analyst*, 131 (2006) 394-401.
- [152] Yang, L.J., Li, Y.B. Detection of viable *Salmonella* using microelectrode-based capacitance measurement coupled with immunomagnetic separation. *Journal of Microbiological Methods*, 64 (2006) 9-16.
- [153] Mazumdar, S.D., Hartmann, M., Kampf, P., Keusgen, M. Rapid method for detection of *Salmonella* in milk by surface plasmon resonance. *Biosensors and Bioelectronics*, 22 (2007) 2040-2046.
- [154] Wan, J., King, K., Craven, H., McAuley, C., Tan, S.E., Coventry, M.J. Probelia™ PCR system for rapid detection of *Salmonella* in milk powder and ricotta cheese. *Letters in Applied Microbiology*, 30 (2000) 267-271.
- [155] De Medici, D., Croci, L., Delibato, E., Di Pasquale, S., Filetici, E., Toti, L. Evaluation of DNA extraction methods for use in combination with SYBR Green I real-time PCR to detect *Salmonella enterica* serotype enteritidis in poultry. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (2003) 3456–3461.
- [156] 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*, 70 (2004) 1393–1396.
- [157] Notzon, A., Helmuth, R., Bauer, J. Evaluation of an Immunomagnetic Separation-Real-Time PCR Assay for the Rapid Detection of *Salmonella* in Meat. *Journal of Food Protection*, 69 (2006) 2896-2901.

2. OBJECTIUS

2 OBJECTIUS

Al camp alimentari hi ha una creixent demanda de metodologies analítiques ràpides per a la determinació de contaminants. Dites metodologies han de ser sensibles, fiables i descentralitzades, no tant sols per a la indústria alimentària, sinó també pels propis consumidors, per tal de garantir la seguretat al llarg de tota la cadena de producció, cada vegada més complexa. En aquest context, els biosensors electroquímics s'alcen com a candidats ideals com alternativa a la instrumentació analítica convencional per a l'anàlisi fora de l'àmbit del laboratori, ja que no requereixen supervisió professional, són fàcils de fer servir i tenen un cost baix.

L'objectiu global de la present tesi consisteix en el desenvolupament de nous dissenys biomoleculars basats en biosensors electroquímics per a la determinació i control de contaminants que comprometen la seguretat alimentària. En aquest context, s'aborden tres aspectes crítics dels dispositius biosensors que convergeixen cap a la simplificació metodològica: la immobilització orientada del biomaterial, la marcació i la transducció del senyal analític. Aquests tres aspectes crítics es tracten a la present tesi en els següents objectius específics:

- (1) Dissenyar, construir i caracteritzar nous transductors amperomètrics basats en biocompòsits d'afinitat com a plataforma universal d'immobilització de material biològic biotinilat.
- (2) Integrar l'ús de partícules magnètiques als procediments basats en biosensors electroquímics mitjançant el disseny de transductors amb propietats magnètiques i electroquímiques, per tal de preconcentrar l'anàlit des de matrius alimentàries complexes i augmentar així la sensibilitat de l'anàlisi.
- (3) Desenvolupar diferents estratègies per a la detecció de DNA i d'immunoespècies per aconseguir la interacció millorada de l'anàlit amb l'element de biorreconeixement, i per assegurar la versatilitat als procediments per a diferents situacions analítiques.
- (4) Integrar estratègies de marcació de material genètic i d'amplificació de l'anàlit per PCR, per tal d'aconseguir amb el mateix procediment la simplificació metodològica, la immobilització orientada i l'amplificació del senyal electroquímic.
- (5) Aplicar els dispositius biosensors desenvolupats per a la resolució de problemes analítics relacionats amb la seguretat alimentària, fent ús de reaccions d'afinitat genètica i immunològica per a l'obtenció d'informació analítica.

3. EXPERIMENTAL

3 EXPERIMENTAL

3.1 CONSTRUCCIÓ I CARACTERITZACIÓ DE NOUS MATERIALS PER A LA IMPLEMENTACIÓ EN BIOSENSORS ELECTROQUÍMICS

3.1.1 Introducció

En la fabricació de biosensors és primordial l'obtenció de dispositius reproduïbles, estables, selectius i que permetin la incorporació de biomolècules sense pèrdua de l'activitat biològica. Durant les últimes dècades s'han dirigit molts esforços cap a la producció de biosensors que compleixin aquestes fites. Els factors més rellevants en el disseny de biosensors inclouen la selecció del material transductor, el bioreceptor o el mètode d'immobilització de biomolècules en el transductor.

En aquesta secció es descriu la construcció i caracterització electroquímica de nous transductors amperomètrics. Aquesta etapa és de vital importància per a la posterior immobilització i detecció de les biomolècules amb els biosensors desenvolupats.

En aquest treball s'han seleccionat com a transductors electroquímics compòsits rígids basats en carboni grafit en pols, com a material conductor, dispers en resina epoxi, com a matriu polimèrica. Aquest material transductor anomenat compòsit de grafit-epoxi (GEC) ha estat àmpliament utilitzat per a la construcció de biosensors amperomètrics al grup d'investigació en el que s'ha realitzat la present tesi doctoral [1-3]. Els compòsits rígids presenten propietats electroquímiques millorades respecte materials conductors purs com el grafit vitri i metalls com l'or o el platí. Aquesta millora es pot explicar pel comportament electroquímic de la superfície del compòsit, format per partícules de grafit disperses en una matriu polimèrica, que actuen com a microelèctrodes de carboni connectats en paral·lel. El senyal generat és la suma dels senyals produïts per cada microelèctrode. El sensor resultant proporciona un senyal semblant a un macroelèctrode però mostrant la relació senyal/soroll d'un microelèctrode [4,5]. Els compòsits també presenten propietats adsorbents úniques i diferenciades respecte altres materials, ja que posseeixen característiques excel·lents per a l'adsorció "en sec" de DNA i proteïnes directament sobre el compòsit,

conservant l'activitat de la biomolècula com a element de biorreconeixement. Tanmateix, l'adsorció inespecífica de biomolècules sobre els compòsits GEC modificats i amb agitació realitzada en solució ha demostrat ser negligible. Addicionalment el material compòsit és fàcil de preparar i esdevé un material rígid un cop curat, amb excel·lents propietats físiques i mecàniques. Els compòsits són estables treballant a temperatures elevades i en presència de solvents orgànics.

És important destacar que els compòsits es poden modificar en volum addicionant biomolècules en la seva formulació, obtenint així biocompòsits específics. Aprofitant aquest avantatge, en aquest treball s'ha construït un nou transductor electroquímic basat en un compòsit rígid modificat en volum amb la proteïna avidina, obtenint un biocompòsit de grafit-epoxi-avidina (Av-GEB). Aquest biocompòsit és d'afinitat universal, ja que permet la immobilització de material biològic modificat amb biotina, degut a l'elevada especificitat d'unió entre les molècules biològiques avidina i biotina.

També es descriu la construcció d'un transductor basat en un compòsit rígid que incorpora un imant de neodimi, anomenat magneto elèctrode de grafit-epoxi (m-GEC). Aquest nou dispositiu amb propietats magnètiques permet la immobilització de partícules magnètiques modificades biològicament per a la posterior detecció electroquímica.

En aquesta secció s'avaluen els elèctrodes construïts, realitzant la caracterització general dels elèctrodes amb tècniques electroanalítiques. Posteriorment, en cadascun dels apartats posteriors s'explicaran les caracteritzacions particulars dels materials amb tècniques i procediments específics per als nous materials transductors desenvolupats.

3.1.2 Instrumentació

Les mesures electroquímiques es realitzen amb un Autolab PGSTAT (Eco Chemie, Holanda) amb un sistema de mesura de tres elèctrodes. L'elèctrode de referència és de doble unió Ag/AgCl (Orion 900200), amb una solució interna de KCl saturada amb AgCl subministrada per la mateixa casa comercial i solució externa 0.1 M de KCl. L'elèctrode auxiliar és un elèctrode de platí (Crison 52-67 1) i com a elèctrode de treball, els elèctrodes construïts (GEC, Av-GEB o m-GEC).

3.1.3 Reactius i solucions

Per a la preparació dels compòsits i biocompòsits es fa servir carboni grafit en pols amb mida de partícula de 50 μm (BDH Laboratory Supplies, Regne Unit) i resina epoxi Epo-Tek H77 part A+B (Epoxy Technology, USA). Els biocompòsits es preparen amb avidina provinent d'ou (A9275, Sigma). Els magneto elèctrodes es preparen amb imants de neodimi de 1.5 mm d'alçada i 3 mm (N35D315) i 4 mm (N35D415) de diàmetre subministrats per HALDE GAC.

Per a la renovació de la superfície dels elèctrodes es fan servir diferents papers abrasius i paper d'alúmina de 3 mm (polishing strips 948201, Orion). Les solucions aquoses es preparen en aigua bidestil·lada i els reactius són de grau analític (proporcionats per Sigma o Merck). La caracterització electroquímica es fa en un tampó 0.1 M fosfat, 0.1 M KCl, pH 7.0 (PBSE).

3.1.4 Construcció d'elèctrodes de configuració cilíndrica

Els elèctrodes construïts són de configuració cilíndrica (Figura 3.1). Estan formats per un connector elèctric de tipus femella de 2 mm de diàmetre (A), a l'extrem del qual es solda una placa de coure circular de 5 mm de diàmetre i 1 mm de gruix (B). Abans de soldar-la cal introduir-la en una solució de HNO_3 1:1 durant uns segons, esbandir-la amb aigua bidestil·lada i assecar-la amb paper. Aquest tractament es fa per tal d'eliminar la capa d'òxid laminar, que de no eliminar-la, podria disminuir el pas de corrent elèctric del transductor. Aquesta connexió s'introdueix en un tub cilíndric de PVC de 6 mm de diàmetre intern, 8 mm de diàmetre extern i 20 mm de llargada (C). El cargol metàl·lic que porta la connexió permet que aquesta encaixi perfectament dins del tub de PVC, quedant-hi fixada. A l'altre extrem del cos de l'elèctrode apareix una cavitat virtual de 3 mm de profunditat, delimitada per la placa de coure i el tub de PVC. En aquesta cavitat s'introdueix la pasta de compòsit o biocompòsit preparada (D). La preparació dels compòsits i biocompòsits pels elèctrodes construïts en aquest treball es descriu a les següents seccions.

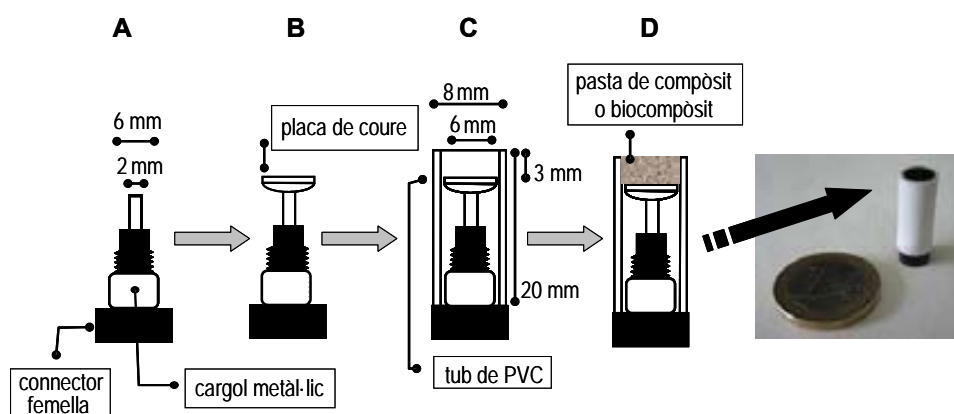


Figura 3.1: Representació esquemàtica de la construcció d'elèctrodes rígids de configuració cilíndrica.

3.1.4.1 Elèctrodes basats en compòsits de grafit-epoxi (GEC)

Els compòsits es preparen amb la barreja homogènia de carboni grafit i resina epoxi en relació 1:4 en pes. La resina està formada per dos components, la resina pròpiament (part A) i l'enduridor (part B), amb els que prèviament es prepara una mescla homogènia en relació 20:3 en pes. Seguidament s'addiciona el carboni grafit en forma de pols i es barreja amb una espàtula fins a l'obtenció d'una mescla homogènia (30 min aproximadament). La pasta obtinguda es diposita a la cavitat de l'elèctrode i la mescla esdevé rígida amb la curació dels elèctrodes a 40° C durant 1 setmana o a 90° C durant un temps mínim de dos dies.

3.1.4.2 Elèctrodes basats en biocompòsits de grafit-epoxi modificats amb avidina (Av-GEB)

Els biocompòsits modificats amb avidina (Av-GEB) es preparen de forma similar als compòsits, però després d'afegir el grafit en pols s'addiciona avidina per tal d'obtenir un percentatge del 1% en pes de proteïna. Després d'obtenir una mescla homogènia, s'introdueix la pasta a la cavitat de l'elèctrode i es cura durant una setmana a 40 °C. Un cop curat s'emmagatzema a 4 °C. La introducció de material biològic implica que la curació es realitzi a temperatura més baixa que en el cas dels compòsits i posteriorment la preservació refrigerada per tal de mantenir les propietats de la proteïna.

3.1.4.3 Magneto elèctrodes basats en composts de grafit-epoxi (m-GEC)

Per a la preparació dels magneto elèctrodes (m-GEC) es segueix la mateixa metodologia que a la Figura 3.1 (A- C), però en aquest cas es fan servir tubs de PVC de llargada 21.5 mm, quedant una cavitat virtual de 4.5 mm (Figura 3.2). Posteriorment es varia el protocol de preparació dipositant primerament una capa fina de grafit-epoxi, d'un gruix aproximat de 1 mm, en contacte amb la placa de coure. A continuació es diposita un imant de neodimi centrat en aquesta primera capa i s'acaba d'omplir el cos de l'elèctrode amb la pasta de grafit-epoxi. És important que l'imant no estigui en contacte directe amb la placa de coure, ja que això dificultaria la conducció elèctrica. La curació dels elèctrodes es realitza de forma similar als composts de grafit-epoxi (GEC). Es van introduir imants de 1.5 mm de alçada i de dos diàmetres, 3 i 4 mm, obtenint magneto elèctrodes que difereixen en l'àrea de la superfície magnètica respecte l'àrea total de la superfície del transductor. Aquests elèctrodes ofereixen la possibilitat de capturar de forma ràpida i simple partícules magnètiques, a més de presentar característiques electroquímiques millorades del material grafit-epoxi.

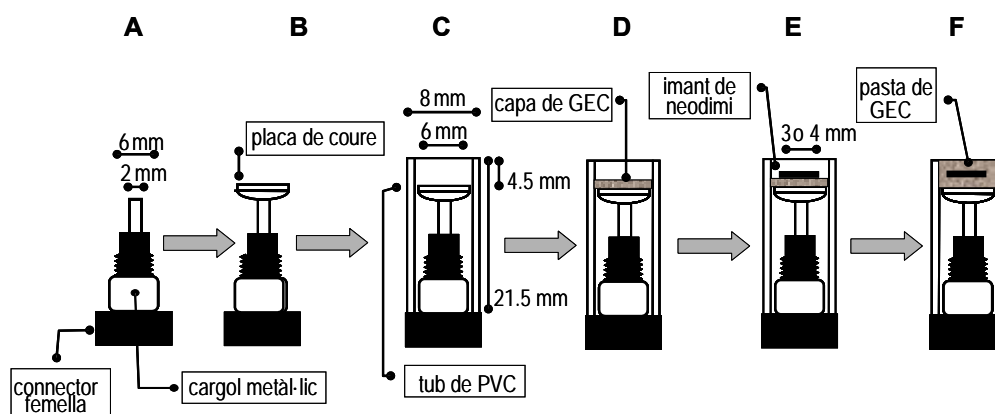


Figura 3.2: Representació esquemàtica de la construcció d'elèctrodes magnètics m-GEC.

A la Taula 3.1 es mostra conjuntament la composició dels elèctrodes construïts.

Taula 3.1: Composició dels elèctrodes construïts.

Elèctrode	Resina part A (mg)		Resina part B (mg)		Grafit (mg)		Bioreceptor (mg)	
		%		%		%		%
GEC	208.7	70	31.3	10	60.0	20	-	-
Av-GEB	208.7	70	31.3	10	57.0	19	3.0	1
m-GEC	313.0	70	47.0	10	90.0	20	-	-

3.1.5 Renovació de la superfície

La superfície dels elèctrodes es renova amb un simple tractament físic de polit amb diferents papers abrasius: 1) paper abrasiu (N ° 800), 2) paper abrasiu (N ° 1200) i paper d'alúmina de 3 mm. Els elèctrodes es poleixen mullant la superfície amb una gota d'aigua bidestil·lada.

3.1.6 Caracterització electroquímica dels elèctrodes per voltamperometria cíclica

La voltamperometria és una tècnica electroquímica que permet conèixer de forma ràpida el comportament redox d'espècies químiques en un ampli rang de potencial. Per a la caracterització dels elèctrodes construïts es fa servir la voltamperometria cíclica, que consisteix en la variació lineal amb el temps del potencial aplicat sobre un elèctrode de treball, realitzant un escombrat que va d'un potencial inicial fins a un potencial determinat. Posteriorment s'inverteix la direcció de rastreig fins arribar de nou al potencial inicial, obtenint així un voltamperograma cíclic característic per a cada sistema redox. Als voltamperogrames es representa el potencial aplicat respecte la intensitat mesurada a l'elèctrode de treball.

La voltamperometria cíclica proporciona informació qualitativa, de la que es pot extreure informació respecte paràmetres, com el potencial d'oxidació i reducció; aspectes cinètics de la transferència electrònica a la superfície del transductor; el comportament del sistema respecte una senyal d'excitació, com és el potencial; i aspectes interfacials com l'adsorció de substàncies electroactives.

La cel·la electroquímica emprada consta d'un sistema de tres elèctrodes, descrit a § 3.1.2, submergits en 20.0 ml de tampó PBSE. El comportament electroquímic dels elèctrodes construïts s'avalua mitjançant el sistema redox hidroquinona/benzoquinona, amb una velocitat de rastreig de 50 mV/s. La hidroquinona s'addiciona a la cel·la electroquímica obtenint una concentració resultant de 1.81 mM. Les mesures es realitzen sense agitació.

S'escull aquest sistema redox ja que als posteriors anàlisis es farà servir la hidroquinona com a mediador electroquímic dels sensors modificats amb l'enzim peroxidasa. Com a mediador, la hidroquinona és l'encarregada de facilitar la transferència dels electrons des dels centres actius de l'enzim fins la superfície de l'elèctrode.

Com a elèctrodes de treball es fan servir els elèctrodes construïts en aquesta tesi: basats en compòsits (GEC), en biocompòsits modificats amb avidina (Av-GEB) i els magneto elèctrodes de compòsit (m-GEC).

3.2 GENOSENSORS ELECTROQUÍMICS PER A LA DETECCIÓ DE *SALMONELLA*

3.2.1 Introducció

En aquesta secció es descriu el desenvolupament de genosensors electroquímics per a la detecció del bacteri *Salmonella* mitjançant la detecció de seqüències del fragment d'inserció IS200 [6], [7]. El fragment IS200 està format per una seqüència d'oligonucleòtids molt conservada d'uns 700 pb [8], present en el 90 % d'aïllaments patogènics de *Salmonella* [9].

En la primera part de la secció s'avaluen estratègies electroquímiques per a la detecció de seqüències sintètiques del fragment IS200 amb genosensors d'hibridació. Aquestes estratègies varien en la forma d'immobilitzar el material biològic (sobre la superfície de compòsits de grafit-epoxi o modificant partícules magnètiques amb la posterior captura amb un magneto elèctrode) i de realitzar la detecció (voltamperometria diferencial d'impulsos i amperometria). En primer lloc s'estudien estratègies electroquímiques basades en la detecció de la hibridació del DNA aprofitant les característiques electroquímiques de la base nitrogenada guanina del DNA (sistema de detecció sense marcatge). El material biològic s'avalua amb els elèctrodes GEC i m-GEC fent servir la voltamperometria diferencial d'impulsos per fer la detecció. Posteriorment, es dissenyen estratègies electroquímiques basades en la detecció de la hibridació emprant marcadors enzimàtics units al DNA. En aquest cas, el material biològic també s'avalua amb els mateixos elèctrodes (GEC i m-GEC) però amb detecció amperomètrica.

En el segon bloc d'aquesta secció s'aplica el sistema òptim electroquímic per a la detecció de producte amplificat per PCR (§ 1.3.1.1) provinent de mostres reals de *Salmonella*. En aquest últim punt s'avaluen diferents protocols per tal d'efectuar l'anàlisi en un temps reduït o incrementar la selectivitat en la detecció del patogen. Cal destacar la novetat d'una de les estratègies desenvolupades, en la que l'amplificació per PCR té lloc directament sobre partícules magnètiques mitjançant el disseny d'encebadors magnètics.

3.2.2 Instrumentació

Les mesures electroquímiques es realitzen amb un amperímetre LC-4C (BAS Bioanalytical System, USA), amb un sistema de mesura de tres elèctrodes descrit a § 3.1.2. Els elèctrodes de treball són GEC i m-GEC basats en compòsits de grafit-epoxy descrits a § 3.1.4.1 i 3.1.4.3. Les imatges de microscòpia electrònica d'escaneig s'obtenen amb un microscopi Hitachi S-570, Japó. Les separacions magnètiques es realitzen amb un separador magnètic Dynal MPC-S d'Invitrogen Dynal AS (Noruega). Les incubacions es realitzen a temperatura i agitació controlada (600 rpm) amb un equip Eppendorf Termomixer compact. L'amplificació per PCR es realitza amb un Eppendorf Mastercycler Personal thermocycler.

3.2.3 Reactius i solucions

El conjugat enzimàtic antiDigoxigenina-peroxidasa (Prod.Nº11207733910) és de Roche Diagnostics GmbH (Alemanya). La seroalbúmina bovina (BSA), el Tween 20, la hidroquinona i la formamida són de Sigma. Les partícules magnètiques recobertes amb estreptavidina (Dynabeads M-280 streptavidin, Prod. Nº 112.05) són d'Invitrogen Dynal AS (Noruega). El conjugat enzimàtic biotina-peroxidasa (P-9568) és de Sigma. Les solucions aquoses es preparen en aigua bidestil·lada i els reactius són de grau analític (proporcionats per Sigma o Merck). La composició de les solucions aquoses es detalla a continuació:

- Tampó fosfat (PBSD): 50 mM fosfat, 20 mM NaCl, pH 7.4
- Tampó fosfat (PBSE): 0.1 M fosfat, 0.1 M KCl, pH 7.0
- Tampó acetat (ABS): 0.2 M acetat, 20 mM NaCl, pH 4.8
- Tampó citrat (5xSSC): 75 mM citrat trisòdic, 0.75 M NaCl, pH 7.0
- Tampó citrat diluït (2xSSC): 30 mM citrat trisòdic, 0.3 M NaCl, pH 7.0
- Solució deshibriditzant: 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl
- Solució neutralitzadora: 0.5 M Tris-HCl, 1.5 M NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.2
- Solució d'hibridació 1: 5xSSC, 1xReactiu de Denhardt, 100 µg d'esperma de salmó, 0.5 % (p/v) SDS i 50 % (v/v) formamida
- Solució d'hibridació 2: 5xSSC, 0.5 % (p/v) SDS i 50 % (v/v) formamida
- Solució posthibridació: 2xSSC, 0.1% (p/v) SDS
- Tampó Tris: 0.1 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.5
- Tampó bloquejant: 0.1 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 2 % (p/v) BSA, 0.1 % (p/v) Tween 20, 5 mM EDTA, pH 7.5

Les seqüències sintètiques de DNA són de la casa comercial TIB MOLBIOL (Alemanya), subministrades per Roche Diagnostics. L'escala de síntesi és de 0.2 µmol i la purificació per HPLC. Les seqüències es dissolen en 1 ml d'aigua bidestil·lada esterilitzada i es guarden alíquotes de 100 µl a -20 °C. L'alíquota de treball es conserva a 4 °C. Les seqüències d'oligonucleòtids emprades a cada sistema es detallen a continuació:

Sistema electroquímic sense marcador

- Sonda de captura conjugada amb biotina i modificada amb inosines: 5'-Biotina-CCT ACT ICC CTA CIC TTC TCT CC-3'
- Seqüència del fragment IS200 de 23 bases: 5'-GGA GAG AAG CGT AGG GCA GTA GG-3'
- Seqüència del fragment IS200 de 56 bases: 5'-GGA GAG AAG CGT AGG GCA GTA GGC AGC ATA TTA AGA AAA TTG TGT GAA TGG AAA AA-3'
- Seqüència no complementaria (NC-1): 5'-AAC TCG ACA CAC TCA TCT TCG GC-3'
- Seqüència no complementaria (NC-2): 5'-CAC ACC CGA TGG AAC TGT AAA TAT CAC ATA GTT TTC GCG CCC AAA TAC CGA AGA CAA GCG TT-3'

Sistema electroquímic amb marcador enzimàtic

- Sonda de captura: 5'-GTG ATA TTT ACA GTT CCA TCG GG-3'
- Seqüència de captura biotinilada: 5'-GTG ATA TTT ACA GTT CCA TCG GG-Biotina-3'
- Seqüència del fragment IS200 de 62 bases: 5'-CAC ACC CGA TGG AAC TGT AAA TAT CAC ATA GTT TTC GCG CCC AAA TAC CGA AGA CAA GCG TT-3'
- Seqüència no complementaria en dues bases: 5'-CAC ACC CGA TGG AAC TTT AAA TAT CAC ATA GTT TTC GCG CCC AAA TAA CGA AGA CAA GCG TT-3'.
- Sonda conjugada amb digoxigenina: 5'-DIG-CTT GTC TTC GGT ATT TGG GCG CG-3'
- Encebador conjugat amb biotina (BIOTINA IS200 up): 5'-Biotina- ATG GGG GAC GAA AAG AGC TTA GC-3'
- Encebador conjugat amb digoxigenina (DIG IS200 down): 5'-DIG- CTC CAG AAG CAT GTG AAT ATG-3'
- Encebador no conjugat (IS200 down): 5'-CTC CAG AAG CAT GTG AAT ATG-3'

L'amplificació per PCR es realitza amb el kit Expand High Fidelity PCR System de Roche Biochemical Diagnostics. La soca de *Salmonella typhimurium* ATCC (American Type Culture Collection) 14028 la subministra LGC Standards.

3.2.4 Caracterització microscòpica de partícules magnètiques capturades sobre magneto elèctrodes

La distribució de les partícules magnètiques dipositades sobre els magneto elèctrodes es va observar per microscòpia electrònica d'escaneig. Es preparen solucions de diferent concentració de partícules magnètiques i es dipositen 20 µl sobre m-GEC tractats prèviament amb ultrasons durant 1 minut. Les partícules queden adherides sobre la superfície del transductor per atracció magnètica amb l'imant interior, i en una àrea confinada per la superfície d'aquest imant (de 3 mm de diàmetre). Les microscòpies es realitzen aplicant 10 KV de potencial d'acceleració i 10 µm de resolució.

3.2.5 Caracterització electroquímica dels magneto elèctrodes m-GEC modificats amb partícules magnètiques

Les propietats electroquímiques dels magneto elèctrodes construïts, amb imants de 3 i 4 mm de diàmetre, s'avaluen per amperometria amb un sistema model. Es preveu que les dimensions de l'imant incorporat puguin modificar el comportament electroquímic dels elèctrodes. Els magneto elèctrodes s'avaluen amb un model experimental molt simple, esquematitzat a la Figura 3.3, en el que les partícules magnètiques enllaçades amb estreptavidina s'uneixen a un conjugat de Biotina-HRP, i es mesura el senyal amperomètric generat per l'enzim peroxidasa. El protocol que es segueix s'adjunta a la Taula 3.2.

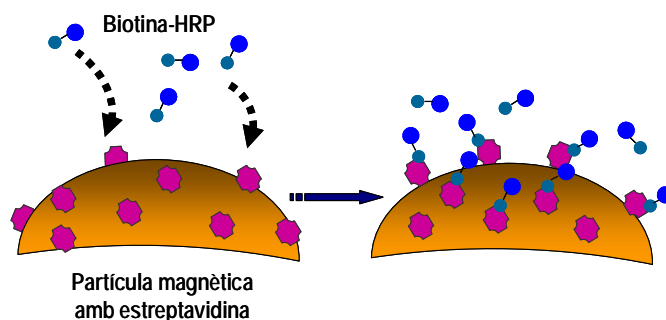


Figura 3.3: Esquema de la interacció de les partícules magnètiques modificades amb el conjugat biotina-HRP.

Les incubacions es realitzen en tubs Eppendorf, controlant la temperatura i l'agitació amb un termomixer. El volum total a cada etapa és de 355 µl de la solució pertinent. Després de cada etapa la solució sobrenadant es separa introduint els tubs en un separador magnètic. L'adsorció inespecífica del conjugat enzimàtic s'avalua realitzant les mateixes etapes però addicionant en el primer pas biotina en excés (10 nmols). En aquest control negatiu la biotina s'uneix a les partícules recobertes amb estreptavidina bloquejant la unió específica amb el conjugat enzimàtic biotinilat. Finalment es dipositen 20 µl de la solució resultant en cada magneto elèctrode i es realitza la mesura per amperometria tal i com es descriu a § 3.2.7.3.

Taula 3.2: Protocol experimental de la caracterització per amperometria.

Etapa	Concentració reactius	Condicions experimentals
1. Pre-Incubació	Partícules magnètiques (3.2×10^6 partícules)	30 min, 42 °C en tampó citrat
2. Immobilització	Biotina-HRP (60 pmols)	30 min, 42 °C en tampó citrat
3. Rentats		10 min, 42 °C en tampó Tris (per duplicat)

3.2.6 Detecció de seqüències sintètiques de *Salmonella* mitjançant l'activitat intrínseca del DNA

A la dècada dels 60 es va descobrir l'electroactivitat dels àcids nucleics deguda a la reducció/oxidació de les bases nitrogenades que formen part dels àcids nucleics sobre elèctrodes de mercuri [10]. S'ha descrit que dintre de les bases nitrogenades, les bases purines (guanina i adenina) són les bases que es poden oxidar més fàcilment [11], observant-se en el cas de la guanina una major activitat electroquímica, oxidant-se a un potencial més baix [12,13]. A la bibliografia s'han descrit nombrosos biosensors de DNA electroquímics que aprofiten la capacitat d'oxidació de la base guanina per a fer el seguiment de la hibridació de seqüències de DNA. El senyal electroquímic generat per la guanina decreix quan aquesta s'uneix amb la seva base complementària en donar-se la hibridació. També s'han dissenyat biosensors que detecten la seqüència de DNA d'interès mitjançant la hibridació amb una sonda de captura que conté inosines [14,15]. La base nitrogenada inosina, igual que la guanina, és complementària a la citosina [16], però presenta un comportament electroquímic tres ordres de magnitud inferior al de la guanina [17]. Per tant, quan es dona la hibridació amb la seqüència d'interès el senyal electroquímic augmenta i depèn majoritàriament del contingut en guanines de la seqüència complementària unida.

En aquesta secció s'avaluen estratègies electroquímiques basades en la detecció de la hibridació mitjançant el senyal d'oxidació de la guanina, fent servir una sonda de captura substituïda amb inosines (sistema de detecció sense marcador). En aquestes estratègies es fan servir partícules magnètiques recobertes amb estreptavidina per immobilitzar sondes biotinilades i a més, modificades amb inosines que s'hibriden amb la seqüència d'interès analític (fragment IS200). La detecció es realitza amb elèctrodes o magneto elèctrodes basats en compòsits de grafit-epoxi (GEC i m-GEC) tal i com es mostra a les següents seccions.

3.2.6.1 Estratègia basada en la immobilització de DNA sobre partícules magnètiques amb tractament alcalí emprant elèctrodes basats en compòsits de grafit-epoxi (GEC)

Les partícules magnètiques recobertes amb estreptavidina s'uneixen a sondes biotinilades mitjançant la unió específica biotina-estreptavidina. La sonda conté inosina en comptes de la base nitrogenada guanina. Després d'unir la sonda de captura es realitza la hibridació amb una seqüència del fragment IS200 relacionat amb el bacteri *Salmonella*. Posteriorment es realitza un tractament alcalí amb NaOH 0.05 M per tal de trencar l'enllaç estreptavidina-biotina entre les partícules i la sonda de captura, el qual també trenca la hibridació entre les seqüències complementàries. A continuació s'adsorbeixen 20 µl de la solució resultant sobre la superfície d'elèctrodes basats en compòsits de grafit-epoxi (GEC). L'adsorció del biomaterial es realitza sobre GEC prèviament pretractats aplicant un potencial de +1.2 V durant 1 minut en PBS. Els elèctrodes modificats es sotmeten durant 45 minuts a 80 °C. Posteriorment el mesurament es realitza per voltametria diferencial d'impulsos (§ 3.2.6.3). Les etapes seguides es descriuen a la Figura 3.4.

Les incubacions de les partícules i les seqüències es realitzen en tubs Eppendorf de 2 ml i després de cada pas la solució sobrenadant es separa introduint els tubs en un separador magnètic. Aquesta metodologia s'aplica per a la determinació de seqüències sintètiques específiques del fragment IS200 de *Salmonella*, de 23 i 56 bases. Per a més detalls experimentals consultar la publicació Lermo et al. (1).

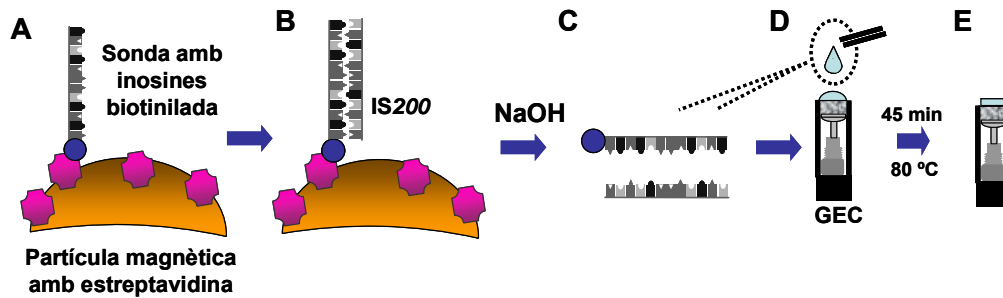


Figura 3.4: Representació esquemàtica de la estratègia electroquímica de detecció sense marcadors mitjançant elèctrodes GEC. (A) Unió de partícules magnètiques d'estreptavidina amb la sonda amb inosines biotinitilada, (B) Hibridació amb una regió del fragment IS200, (C) Hidròlisi de l'enllaç estreptavidina-biotina i deshibridació amb NaOH, (D) Deposició de la solució resultant, i (E) Adsorció sobre GEC.

3.2.6.2 Estratègia basada en la immobilització de DNA sobre partícules magnètiques emprant magneto elèctrodes basats en compòsits de grafit-epoxi (m-GEC)

Els fragments de la seqüència IS200 relacionada amb *Salmonella* també es detecten emprant magneto elèctrodes basats en compòsits de grafit-epoxi (m-GEC). En aquest cas el protocol es semblant al descrit a § 3.2.6.1 però sense realitzar el tractament alcalí amb NaOH i capturant les partícules magnètiques modificades amb l'híbrid de DNA introduint el magneto elèctrode dins del tub Eppendorf. Les partícules es capten per afinitat magnètica. També es realitza l'adsorció del biomaterial durant 45 min a 80 °C sobre elèctrodes pretractats aplicant +1.2 V durant 1 minut en PBS. El mesurament es realitza per voltametria diferencial d'impulsos (§ 3.2.6.3). Les etapes seguides es descriuen a la Figura 3.5. Per a més detalls experimentals consultar la publicació Lermo et al. (1).

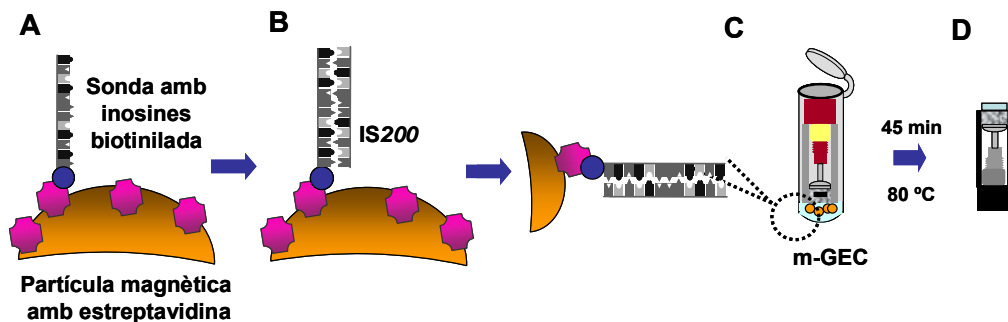


Figura 3.5: Representació esquemàtica de la estratègia electroquímica de detecció sense marcadors mitjançant magneto elèctrodes m-GEC. (A) Unió de partícules magnètiques d'estreptavidina amb la sonda amb inosines biotinitilada, (B) Hibridació amb una regió del fragment IS200, (C) Captura per afinitat magnètica amb m-GEC, i (D) Adsorció sobre m-GEC.

3.2.6.3 Detecció electroquímica per voltamperometria diferencial d'impulsos

La detecció es realitza per voltamperometria diferencial d'impulsos (DPV, de l'anglès *differential pulse voltammetry*). El mesurament es realitza a una cel·la electroquímica amb configuració de tres elèctrodes, descrita a § 3.1.2, en 10 ml de ABS. El potencial aplicat va de +0.3 a +1.2 V, amb una amplitud d'impuls de 100 mV i una velocitat d'escombrat de 15 mV/s (Figura 3.6).

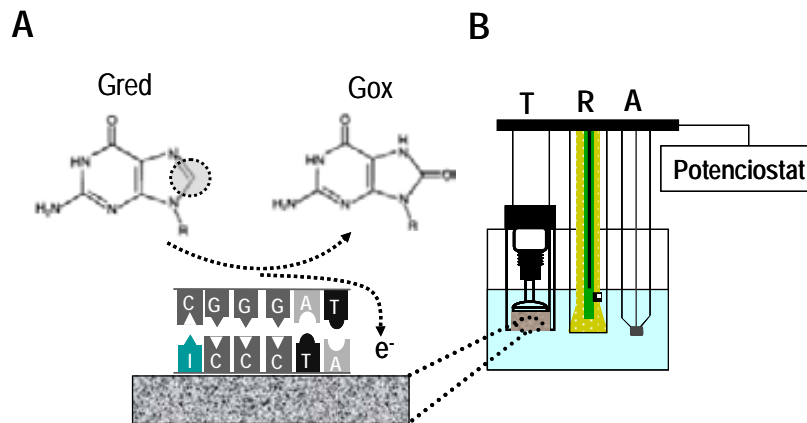


Figura 3.6: Representació esquemàtica de l'avaluació dels sensors electroquímics mitjançant l'oxidació intrínseca del DNA. (A) Detall de l'oxidació de la base guanina a la superfície del transductor electroquímic, (B) Configuració de la cel·la electroquímica formada per l'elèctrode de treball -T-, de referència -R- i auxiliar -A-.

3.2.6.4 Avaluació de la selectivitat de l'assaig

La selectivitat de les estratègies electroquímiques descrites basades en l'oxidació de la base guanina fent servir GEC i tractament alcalí (§ 3.2.6.1) es verifica realitzant l'anàlisi de dues seqüències no complementaries (NC-1, NC-2), tal i com es descriu a la publicació Lermo et al. (I).

3.2.7 Detecció de seqüències sintètiques de *Salmonella* mitjançant marcadors enzimàtics

El fenomen de la hibridació es detecta habitualment unint marcadors a una de les seqüències que s'hibrida. El mètode clàssic de marcatge d'oligonucleòtids, basat en la unió de radioisòtops ha caigut en desús degut a la dificultat i perillositat del seu ús. Com a mètodes alternatius hi destaca el marcatge enzimàtic que resulta especialment efectiu per a la detecció de la hibridació. La fosfatasa alcalina i la peroxidasa de rave

picant (HRP, de l'anglès *horseradish peroxidase*) són enzims àmpliament utilitzats com a marcadors de sondes. També es poden unir molècules covalentment a les sondes, com la digoxigenina (DIG), detectant en aquest cas la hibridació mitjançant un conjugat d'anticòs antiDIG enllaçat a un enzim [18,19]. En aquesta secció s'avaluen diferents estratègies electroquímiques basades en la detecció de la hibridació mitjançant l'activitat de l'enzim peroxidasa (sistema de detecció amb marcador).

3.2.7.1 Estratègia basada en la immobilització de DNA per adsorció sobre elèctrodes GEC

L'estratègia seguida en aquesta secció es basa en un format tipus sandvitx, en el que una seqüència del fragment IS200 de 62 bases, s'hibrida a una sonda de captura i una sonda marcada amb digoxigenina. Aquesta última permet la posterior unió amb un conjugat enzimàtic antiDIG-HRP. En aquest tipus de format es dona una doble hibridació, augmentant el nombre de bases nitrogenades reconegudes de la seqüència anàlit, amb el consegüent augment de l'especificitat de l'assaig.

En funció de com es realitza el pas de la hibridació, es poden distingir dos formats, hibridació seqüencial o en una pas. A la hibridació seqüencial primer es dona la hibridació de l'anàlit i posteriorment la sonda marcada amb digoxigenina. En canvi, a la hibridació en un pas els dos fragments s'addicionen al mateix temps. A la Figura 3.7 es pot observar l'esquema dels passos que intervenen en el dos formats.

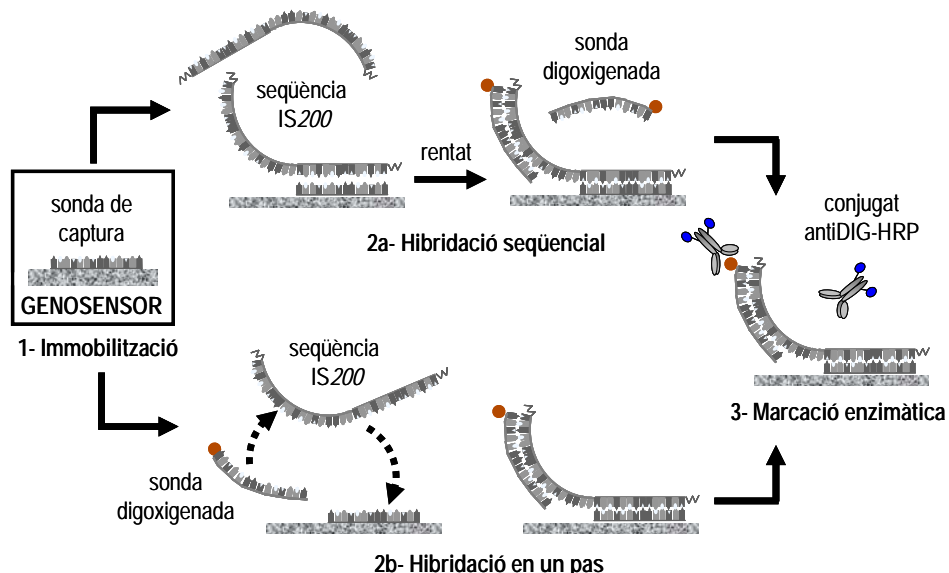


Figura 3.7: Representació esquemàtica de la detecció electroquímica del DNA amb hibridació seqüencial i en un pas.

El format d'hibridació (seqüencial o en un pas) s'optimitza seguint el protocol descrit a la Taula 3.3. S'immobilitzen 20 µl de la sonda de captura sobre un elèctrode GEC durant 45 min a 80 °C. Posteriorment la resta d'incubacions es realitzen amb agitació (600 rpm) submergint els elèctrodes en tubs Eppendorf amb un volum total de 140 µl de la solució pertinent. A la Figura 3.8 es mostra la disposició dels elèctrodes GEC als passos d'immobilització de la sonda de captura (A) i posteriors incubacions – tractament alcalí, hibridacions, marcació enzimàtica i rentats- (B).

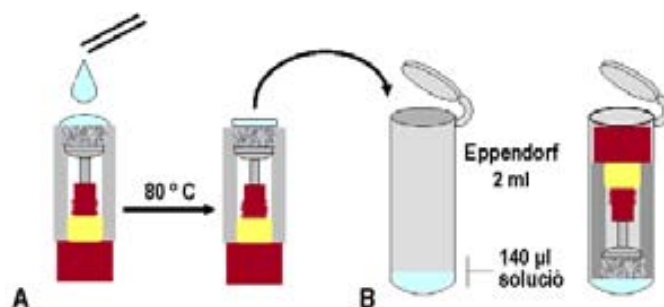


Figura 3.8: Disposició dels elèctrodes a l'etapa d'adsorció i incubacions.

Després de cada incubació els elèctrodes es canvien a nous tubs Eppendorf per a realitzar la següent etapa, mantenint temperatura i agitació constants amb un agitador termostatitzat. A l'últim pas del protocol els elèctrodes es conserven submergits en tubs Eppendorf amb 140 µl de tampó Tris fins al moment de la detecció electroquímica per amperometria (§ 3.2.7.3).

Taula 3.3: Protocol experimental del format sandwich seqüencial i en un pas.

Etapa	Concentració reactius	Condicions experimentals
1. Immobilització	Sonda de captura (30 pmols)	Adsorció en sec: 45 min, 80 °C
Tractament alcalí		5 min, 42 °C en solució deshibriditzant
Rentat 1		Submergir en solució neutralitzadora
Rentat 2		Submergir en 5xSSC
2a. Hibridació seqüencial	Seqüència IS200 (30 pmols)	60 min, 42 °C en solució d'hibridació
Rentat 1		5 min, 42 °C en solució posthibridació
Rentat 2		Submergir en 2xSSC
	Sonda digoxigenada (30 pmols)	45 min, 42 °C en solució d'hibridació
	REPETICIÓ Rentat 1 i 2	
2b. Hibridació en un pas	Seqüència IS200 (30 pmols) i Sonda digoxigenada (30 pmols)	60 min, 42 °C en solució d'hibridació
Rentat 1		5 min, 42 °C en solució posthibridació
Rentat 2		Submergir en 2xSSC
3. Marcació enzimàtica	Conjugat antiDIG-HRP (6µg)	30 min, 42 °C en tampó bloquejant
Rentat		Submergir en tampó Tris

Amb cada assaig es realitza paral·lelament un control negatiu, realitzant les mateixes etapes però sense addicionar la seqüència anàlit del fragment IS200.

3.2.7.2 Estratègia basada en la immobilització de DNA sobre partícules magnètiques emprant m-GEC

La determinació d'una seqüència de DNA fent servir l'estratègia d'immobilitzar una seqüència de captura directament sobre el transductor del GEC (§ 3.2.7.1), presenta com a principal desavantatge la manca d'orientació de la seqüència immobilitzada i a més, la possibilitat de desorció de DNA, degut a que l'adsorció depèn de forces físiques febles a diferència d'un enllaç químic.

Aquests desavantatges es van solucionar fent servir sondes biotinilades en un extrem per tal de fer la immobilització orientada sobre superfícies modificades amb estrept(avidina), mitjançant la forta unió biotina-estrept(avidina). Dels diferents suports sòlids modificats, en aquesta tesi es fan servir biocompòsits d'avidina Av-GEB, tal i com es veurà a § 3.3.8.4, i partícules magnètiques recobertes amb estreptavidina.

En el cas de fer servir partícules magnètiques s'immobilitza la sonda modificada amb biotina sobre les partícules magnètiques i les hibridacions amb la seqüència anàlit i la sonda marcada amb digoxigenina tenen lloc en el mateix pas. Posteriorment es realitza la marcació enzimàtica amb el conjugat enzimàtic antiDIG-HRP. Les partícules magnètiques modificades biològicament es capturen per afinitat magnètica, introduint l'elèctrode m-GEC dins del tub Eppendorf que les conté. A la Figura 3.9 es mostra un esquema d'aquest protocol.

Adicionalment, amb aquesta nova metodologia basada amb partícules magnètiques i m-GEC les hibridacions tenen lloc en solució millorant l'eficàcia de les hibridacions enlloc de donar-se en una interfase heterogènia (superfície del sensor/solució) com a § 3.2.7.1.

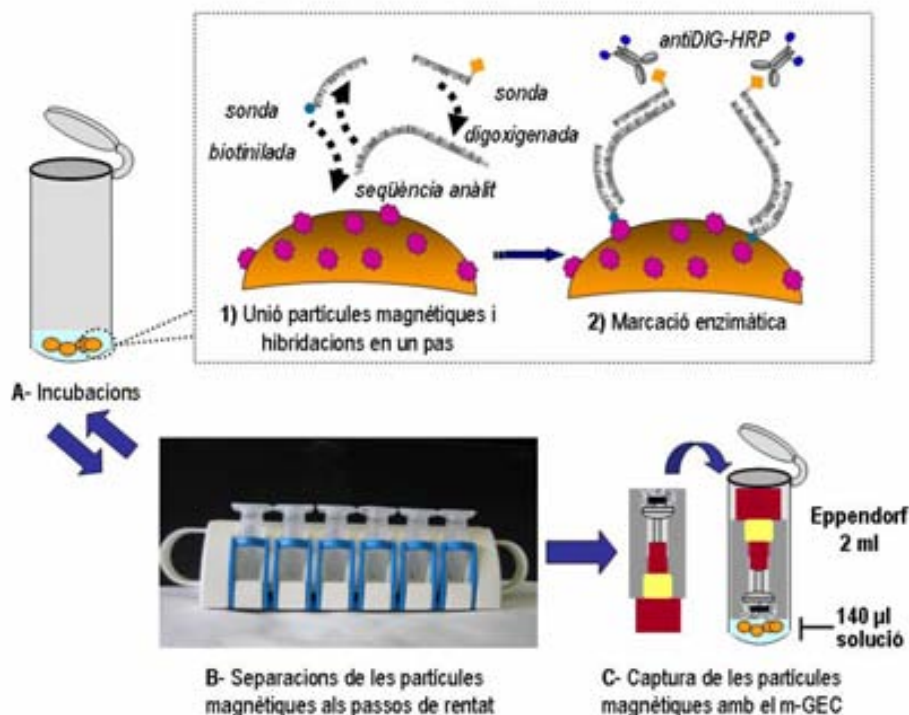


Figura 3.9: Representació esquemàtica de l'estratègia electroquímica de detecció de DNA amb marcació enzimàtica mitjançant elèctrodes m-GEC. (A) Les incubacions es realitzen en solució aquosa: (1) Unió de les partícules magnètiques i hibridacions en un pas i (2) Marcació enzimàtica; (B) Introducció dels tubs Eppendorf en un separador magnètic a les etapes de rentat; (C) Captura de les partícules magnètiques amb l'elèctrode m-GEC.

L'avaluació dels elèctrodes es realitza per amperometria amb el procediment descrit a § 3.2.7.3. Per a més detalls experimentals del protocol consultar les publicacions Lermo et al. (II) i (III).

3.2.7.3 Detecció electroquímica per amperometria

L'avaluació dels elèctrodes es realitza per amperometria amb una cel·la electroquímica amb configuració de tres elèctrodes, descrita a § 3.1.2, en 20 ml de PBSE. El senyal amperomètric està relacionat amb la quantitat de conjugat enzimàtic HRP unit a la seqüència marcada amb digoxigenina. S'addiciona peròxid d'hidrogen (4.90 mM) com a substrat de l'enzim HRP en presència d'hidroquinona (1.81 mM) que actua com a mediador electroquímico, facilitant la transferència electrònica entre l'enzim i l'elèctrode. La hidroquinona es regenera fàcilment aplicant un potencial de -0.1 V respecte Ag/AgCl. El senyal analític obtingut és proporcional a l'activitat de l'enzim ja que es treballa en condicions de saturació de substrat, i per tant s'obtenen valors d'intensitat

màxima. El conjunt de reaccions electroquímiques que tenen lloc a la superfície de l'elèctrode s'esquematzitza a la Figura 3.10.

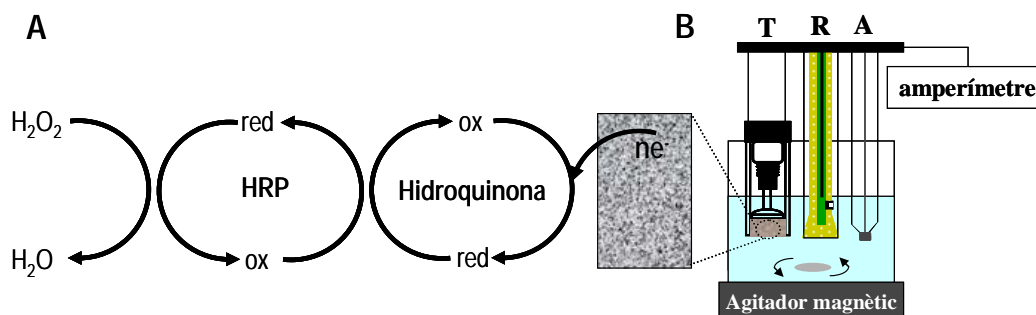


Figura 3.10: Representació esquemàtica de l'avaluació dels sensors electroquímics mitjançant l'activitat de l'enzim peroxidasa. (A) Mecanisme enzimàtic de l'enzim HRP a la superfície del transductor electroquímic, amb H_2O_2 com a substrat i hidroquinona com a mediador, (B) Configuració de la cel·la electroquímica formada per l'elèctrode de treball -T-, de referència -R- i auxiliar -A-.

3.2.7.4 Avaluació de la selectivitat de l'assaig. Discriminació de polimorfismes d'un sol nucleòtid (SNPs)

La selectivitat de l'estratègia basada en partícules magnètiques amb marcació enzimàtica (§ 3.2.7.2) es verifica amb una seqüència idèntica al DNA anàlit però amb dues bases diferents, una situada a la regió d'hibridació amb la seqüència de captura biotinilada i l'altra a la regió de la seqüència marcada amb digoxigenina. Aquests petits canvis en l'ordre dels nucleòtids de seqüències de DNA s'anomenen polimorfismes d'un sol nucleòtid (SNPs, de l'anglès *Single Nucleotide Polymorphisms*). La selectivitat d'aquesta estratègia per a la detecció de polimorfismes s'avalua fent servir 5xSSC com a solució de l'etapa d'hibridació i forçant les condicions addicionant un 50 % (v/v) de formamida (solució d'hibridació 2).

3.2.8 Estratègies electroquímiques basades en l'amplificació del genoma

S'amplifica per PCR el fragment d'inserció IS200 que és un element transposable d'uns 700 pb, present en un 90 % d'aïllaments patogènics de *Salmonella* [8]. Les estratègies electroquímiques basades en PCR per a la detecció de *Salmonella* comprenen els següents passos:

- Extracció del DNA cromosòmic
- Amplificació per PCR del fragment IS200
- Detecció de l'amplicó obtingut mitjançant un genosensor amperomètric

Prèviament a l'amplificació cal realitzar l'extracció del DNA cromosòmic ja que la mostra pot contenir compostos que inhibeixin la PCR. La detecció de l'amplicó es basa en la immobilització del producte amplificat sobre partícules magnètiques emprant m-GEC i marcació enzimàtica, fent servir diferents formats. Els passos seguits en aquestes estratègies es detallen en les següents seccions.

3.2.8.1 Extracció del DNA cromosòmic

La soca que es fa servir és *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 aïllada de pollastre contaminat. Des d'una placa d'agar sòlid de LB (Luria-Bertani) s'agafen colònies del bacteri, es dipositen en medi de cultiu líquid de LB i s'incuba tota la nit a 37 °C. Posteriorment part del cultiu preenriquit es centrifuga a 14000 rpm i es resuspen en aigua mil·liQ. L'extracció del DNA es realitza amb el protocol N°3 del kit Easy-DNA (Prod.N° K1800-01) de la casa comercial Invitrogen. El protocol seguit es basa en la lisi dels bacteris mitjançant l'acció d'enzims durant 10 min a 65 °C. S'addiciona cloroform al tub de reacció, es centrifuga i es separa la fase aquosa que conté el DNA. S'addiciona etanol per a precipitar el DNA i es resuspen en tampó TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0). S'addiciona l'enzim RNasa i s'incuba el tub de reacció per a degradar fragments de RNA. La solució resultant es guarda a la nevera a 4 °C.

3.2.8.2 Amplificació del DNA per PCR

L'amplificació del fragment IS200 es realitza per PCR (§ 1.3.1.1) fent servir uns encebadors específics per a l'amplificació selectiva d'aquest fragment. La mescla de reacció de 100 µl conté: 200 µM de cada desoxinucleòtid trifosfat (dATP, dGTP, dCTP i dTTP), 0.5 µM de cada encebador, 5 unitats de l'enzim Taq polimerasa, 1.5 mM de MgCl₂ i aproximadament 200 ng de DNA cromosòmic (provinent de *Salmonella typhimurium* ATTC14028). La mescla de reacció es sotmet inicialment durant 2 min a 95 °C (deshibridació inicial del DNA cromosòmic); posteriorment es realitzen 30 cicles de: 30 segons a 95 °C (deshibridació), 30 segons a 53 °C (hibridació dels encebadors), 30 segons a 72 °C (elongació); i finalment es sotmet durant 7 minuts a 72 °C.

La novetat d'aquesta amplificació resideix en la incorporació de nous encebadors marcats amb biotina i amb digoxigenina, per permetre la unió amb les partícules magnètiques modificades amb estreptavidina i amb el conjugat enzimàtic antiDIG-

HRP. Es realitzen dos tipus d'amplificacions fent servir els següents parells d'encebadors:

- Encebadors BIOTINA IS200 up i DIG IS200 down, per a generar un amplicó doblement marcat amb biotina i digoxigenina en cada extrem.
- Encebadors BIOTINA IS200 up i IS200 down, per a generar un amplicó marcat en un sol extrem amb biotina.

A la Figura 3.11 es mostra la seqüència completa del fragment IS200 i la posició dels encebadors que es fan servir a l'amplificació. En les dues amplificacions s'espera obtenir un amplicó de 201 parells de bases. Amb cada amplificació es realitza un control negatiu de la PCR, que conté tots el reactius excepte el DNA cromosòmic de *Salmonella*, en el que no s'espera obtenir productes amplificats.

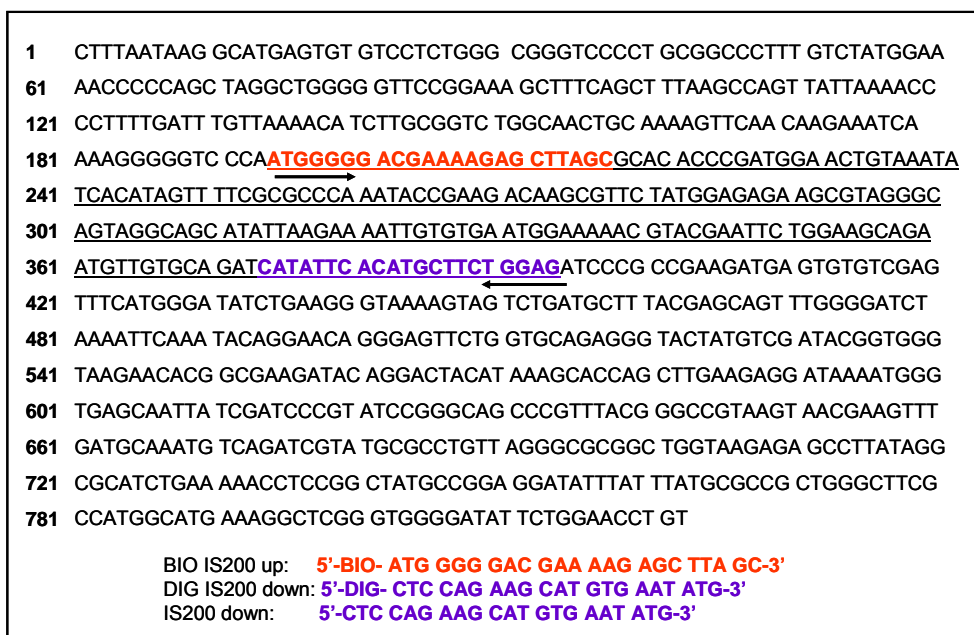


Figura 3.11: Seqüència del fragment IS200 obtinguda a la base de dades GenBank (AF025380) en la que es mostra la posició de l'encebador biotinilat (vermell) i l'encebador marcat amb digoxigenina i sense marcar (lila). L'amplicó esperat és de 201 pb (subratllat).

Els amplicons obtinguts s'avaluen per electroforesi de gel d'agarosa al 3 % en tampó TAE (Tris base 0.04 M, 1 mM EDTA, 0.1 % (v/v) àcid acètic, pH 8.0) amb 0.5 µg/ml de bromur d'etidi i 0.1 µg/µl de marcador de pes molecular. El marcador s'obté per la completa digestió del fag ΦX174 amb l'enzim de restricció *HinfI*, obtenint fragments de diferents pesos moleculars compresos entre 24 i 726 pb. Les bandes obtingudes a l'electroforesi es visualitzen amb UV i posteriorment es fotografien.

3.2.8.3 Detecció electroquímica del producte amplificat de *Salmonella*

El producte de PCR provinent de *Salmonella* es detecta directament amb una estratègia electroquímica ràpida fent servir partícules magnètiques amb captació amb m-GEC. En aquest cas es va avaluar el producte de PCR obtingut a § 3.2.8.2 doblement marcat amb biotina i digoxigenina en cada extrem. A la Figura 3.12 es mostra un esquema dels passos que intervenen en la detecció ràpida de *Salmonella*. El producte de PCR s'immobilitza sobre partícules magnètiques recobertes amb estreptavidina. Posteriorment es realitza el marcatge enzimàtic amb el conjugat antiDIG-HRP. Les partícules magnètiques modificades es capturen per afinitat magnètica, introduint l'elèctrode m-GEC dins del tub Eppendorf que les conté. L'avaluació dels elèctrodes es realitza per amperometria (§ 3.2.7.3). Per a més detalls consultar la publicació Lermo et al. (II).

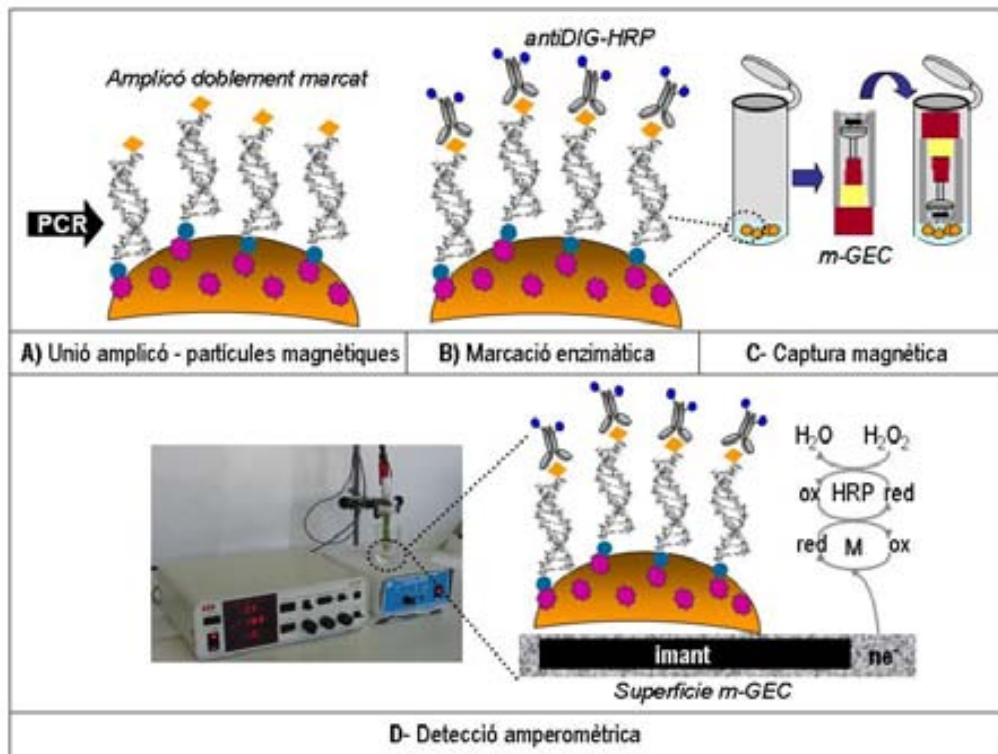


Figura 3.12: Representació esquemàtica per a la detecció ràpida de l'amplicó IS200 relacionat amb *Salmonella* amb genosensors amperomètrics. (A) Unió de l'amplicó doblement marcat amb les partícules magnètiques recobertes amb estreptavidina, (B) Marcatge enzimàtic, (C) Captura magnètica amb m-GEC i (D) Detecció per amperometria.

3.2.8.4 Detecció electroquímica i confirmació per hibridació del producte amplificat de *Salmonella*

La detecció específica del producte amplificat per PCR s'avalua mitjançant la hibridació amb una seqüència marcada. En aquest cas es fa servir l'amplicó marcat en un sol extrem amb biotina. El producte amplificat es deshibrida escalfant-lo a 95 °C i posteriorment s'uneix una seqüència complementària marcada amb digoxigenina seguint dos procediments que difereixen en el moment en el que s'addicionen les partícules magnètiques recobertes amb estreptavidina (Figura 3.13):

- Unió de l'amplicó a les partícules magnètiques, posterior desnaturalització de l'amplicó i hibridació amb la seqüència amb digoxigenina.
- Desnaturalització de l'amplicó, posterior unió amb la seqüència amb digoxigenina i unió amb les partícules magnètiques.

En ambdós casos es realitza posteriorment la marcació enzimàtica amb el conjugat antiDIG-HRP, la captura amb el magneto sensor i la detecció per amperometria (§ 3.2.7.3). Per a més detalls experimentals del protocol consultar la publicació Lermo et al. (III).

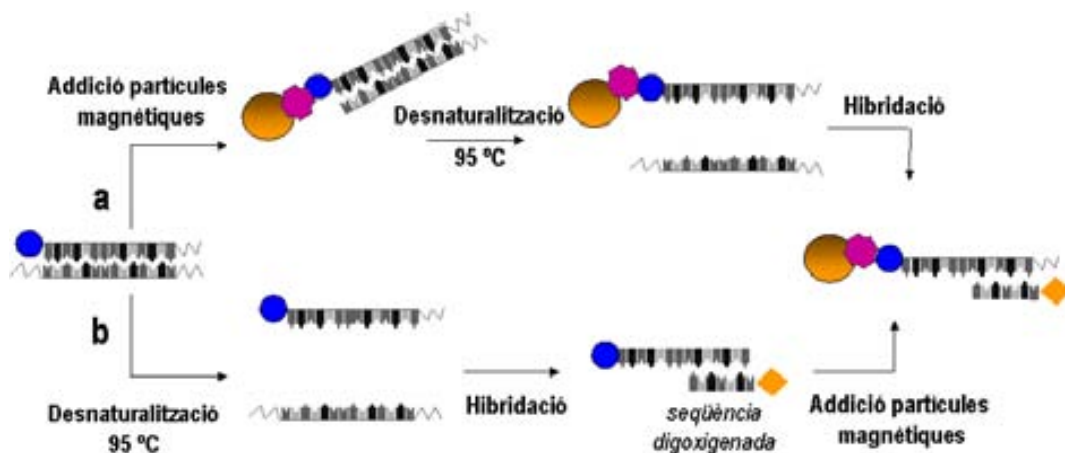


Figura 3.13: Detecció específica de l'amplicó IS200 relacionat amb *Salmonella* amb gensensors amperomètrics: (a) Escalfant les partícules magnètiques a l'etapa de desnaturalització i (b) Addicionant les partícules magnètiques després de l'etapa de desnaturalització.

3.2.8.5 Detecció electroquímica de l'amplicó de *Salmonella* mitjançant l'amplificació del genoma amb encebadors magnètics

S'ha dissenyat una nova estratègia en la que l'amplificació per PCR es realitza directament sobre la superfície de partícules magnètiques mitjançant l'ús d'encebadors

magnètics. Els encebadors magnètics es preparen fàcilment modificant les partícules magnètiques amb un excés de l'encebador biotinat. L'encebador magnètic s'incorpora a la mescla de reacció de la PCR que conté la resta de reactius (encebador marcat amb digoxigenina, desoxinucleotids trifosfats, el DNA cromosòmic i la Taq polimerasa). Així s'aconsegueix en un sol pas la unió de les partícules magnètiques i l'amplificació del fragment IS200. Posteriorment es realitza la marcació enzimàtica amb el conjugat antiDIG-HRP, la captura de les partícules magnètiques amb el magneto sensor i la detecció per amperometria (§ 3.2.7.3). Per a més detalls experimentals del protocol consultar la publicació Lermo et al. (III).

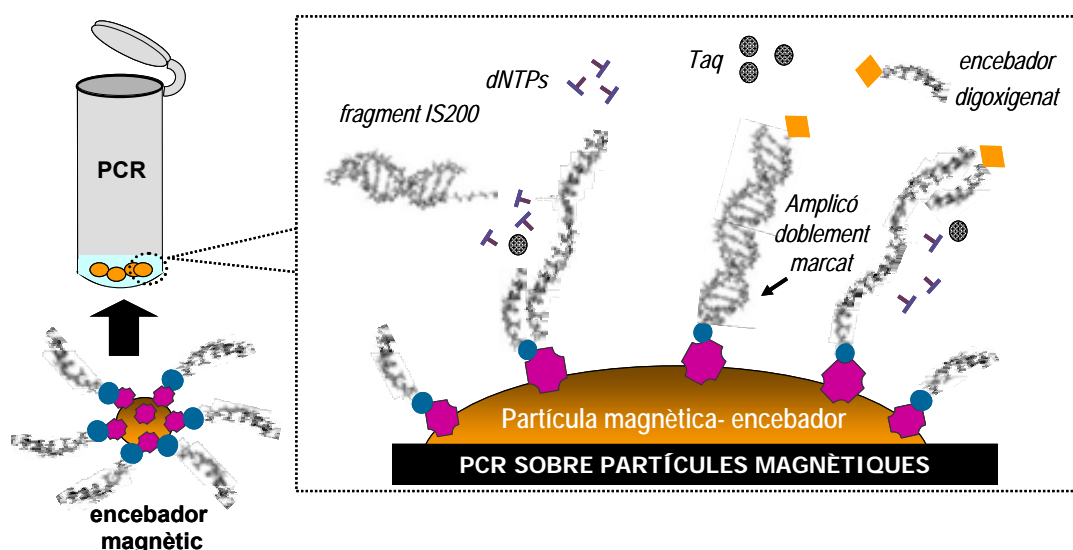


Figura 3.14: Amplificació del fragment IS200 relacionat amb *Salmonella* sobre partícules magnètiques modificades amb un encebador biotinat.

3.3 GENOSENSORS AMPEROMÈTRICS PER A LA DETECCIÓ D'*ESCHERICHIA COLI*

3.3.1 Introducció

Els bacteris *Escherichia coli* patògens es caracteritzen per la presència de gens relacionats amb la seva patogenicitat. Els gens més importants són aquells que codifiquen per una potent toxina anomenada toxina Shiga o verotoxina i el gen *eaeA*. La toxina Shiga inhibeix la síntesi de proteïnes produint dany cel·lular i el gen *eaeA* codifica una proteïna de membrana anomenada intimina relacionada amb l'adherència del bacteri a la mucosa intestinal [20].

En aquesta secció es desenvolupen genosensors amperomètrics per a la detecció d'un fragment del gen *eaeA* relacionat amb el bacteri *E.coli*. La selecció del fragment del gen *eaeA* es realitza amb un equip de PCR a temps real amb el sistema Taqman

comparant diferents soques del bacteri [21]. El fragment escollit, la seqüència conservada del gen, s'amplifica i s'avalua comparativament amb genosensors electroquímics basats en biocompòsits modificats amb avidina (Av-GEB) i magneto elèctrodes (m-GEC). Aquests genosensors electroquímics es fan servir per a la detecció de la soca *E.coli* O157:H7 avaluant el producte amplificat a diferents cicles de la PCR. Els resultats obtinguts es comparen amb el sistema de PCR a temps real amb el sistema Taqman.

3.3.2 Instrumentació

Les mesures electroquímiques es realitzen amb un amperímetre LC-4C (BAS Bioanalytical System, USA), amb un sistema de mesura de tres elèctrodes descrit a § 3.1.2. Els elèctrodes de treball són Av-GEB i m-GEC basats en compòsits de grafit-epoxy descrits a § 3.1.4.2 i 3.1.4.3. Les imatges de microscòpia de fluorescència s'obtenen amb un microscopi confocal Leica TCS 4D, Alemanya. L'amplificació per PCR a temps real amb el sistema Taqman es realitza en plaques de 96 pous amb un equip ABI 5700 (Applied Biosystems). La instrumentació restant és la mateixa que a § 3.1.2 i 3.2.2.

3.3.3 Reactius i solucions

Els encebadors són de la casa comercial TIB MOLBIOL (Alemanya), subministrats per Roche Diagnostics. L'escala de síntesi és de 0.2 µmol i la purificació per HPLC. Les seqüències són les següents:

- Encebador biotinitat (BIOTINA *eaeA* up): 5'-BIO- CTG AAT ATT CCG CAT GAT ATT AAT GGT ACT GA-3'
- Encebador amb digoxigenina (DIG *eaeA* down): 5'-DIG- GTA ATG CAC TAT CAT CCC AGA CGA T-3'

La seqüència Taqman consisteix en un oligonucleòtid marcat amb una molècula fluorescent (FAM) a l'extrem 5' i una molècula inhibidora de la fluorescència (NQF) a l'extrem 3'. La seqüència és la següent:

- Seqüència Taqman: 5'- FAM- ATC CAG ACC GTA TTT GC- NQF-3'

L'observació per microscòpia de fluorescència es realitza amb un conjugat fluorescent biotina-fluoresceïna (B941) i fluoresceïna disòdica (F6377), subministrats per Sigma. La resta de reactius i solucions són els mateixos que a § 3.1.3 i 3.2.3.

3.3.4 Optimització del potencial aplicat a magneto elèctrodes (m-GEC) i elèctrodes modificats amb avidina (Av-GEB)

El producte amplificat doblement marcat es detecta amb elèctrodes m-GEC i Av-GEB per amperometria. Per a fixar el potencial necessari per a la regeneració del mediador hidroquinona (§ 3.2.7.3) es realitzen uns assajos amb un conjugat biotina-HRP. En el cas de m-GEC, la immobilització del conjugat es realitza sobre partícules magnètiques recobertes d'estreptavidina i posteriorment es capturen per afinitat magnètica amb el magneto elèctrode. En canvi per Av-GEB, la immobilització del conjugat es realitza introduint els elèctrodes en posició invertida en una solució que conté el conjugat. La lectura es realitza variant el potencial aplicat (-0.050, -0.100, -0.150 i -0.200 respecte Ag/AgCl). El protocol en detall es descriu a Lermo et al. (VII).

3.3.5 Caracterització dels elèctrodes per microscòpia de fluorescència

Amb l'objectiu d'estudiar la distribució del material biològic als elèctrodes basats en biocompòsits de grafit-epoxi modificats amb avidina (Av-GEB), es modifica la superfície amb un conjugat fluorescent biotina-fluoresceïna. El protocol seguit es descriu a la Taula 3.4 Els elèctrodes es submergeixen en tubs Eppendorf amb un volum total de 140 µl de solució pertinent, mantenint temperatura i agitació constants amb un termomixer. Després de cada etapa els elèctrodes es canvien a nous tubs Eppendorf per a realitzar la següent incubació. Paral·lelament es realitza un control negatiu, substituint el conjugat biotina-fluoresceïna per fluoresceïna. Els elèctrodes s'observen per microscòpia de fluorescència. L'excitació del làser és de 568 nm i la radiació es recull amb un fotomultiplicador confocal. El voltatge emprat és de 352 V.

Taula 3.4: Protocol experimental de la caracterització per microscòpia de fluorescència.

Ètapa	Concentració reactius	Condicions experimentals
1. Immobilització	Biotina-fluoresceïna (80 pmols)	30 min, 37 °C en tampó bloquejant
2. Rentats		5 min, 37 °C en tampó Tris (per triplicat)

3.3.6 Selecció de la seqüència del gen *eaeA* i disseny dels encebadors

Es realitza un estudi comparatiu entre seqüències del gen *eaeA* de diferents soques d'*Escherichia coli* patogen. Les seqüències del gen s'obtenen consultant la base de dades GenBank. Es comparen 62 soques d'*E.coli* amb el programari Seqman 5.0 (DNA*DNASTar II, Lasergene, DNATAR Inc., USA) per tal de trobar la seqüència més conservada entre les soques avaluades. Posteriorment es dissenyen uns encebadors específics per a l'amplificació d'aquesta seqüència [21].

3.3.7 Avaluació de la selectivitat dels encebadors amb PCR a temps real amb el sistema Taqman

La selectivitat dels encebadors dissenyats s'avalua mitjançant un equip de PCR a temps real amb el sistema Taqman, amplificant 16 soques d'*E.coli* patogen, *E.coli* no patogen i d'*Erwinia chrysanthemi* amb el protocol que es detalla a la publicació Lermo et al. (VII). Un cop avaluada la selectivitat dels encebadors, aquests es fan servir per a l'amplificació de la soca *E.coli* O157:H7 i posterior detecció electroquímica.

3.3.8 Sistema electroquímic de PCR quantitativa

3.3.8.1 Extracció del DNA cromosòmic

La soca que es fa servir és *E.coli* O157:H7 proporcionada per l'Hospital Clínic de Barcelona. Es prepara un cultiu preenriquit amb el bacteri i es realitza l'extracció del DNA seguint les indicacions de § 3.2.8.1.

3.3.8.2 Amplificació del DNA

El DNA s'amplifica amb els encebadors dissenyats a § 3.3.6, però en aquest cas marcats amb biotina i digoxigenina per tal de generar un producte amplificat doblement marcat a cada extrem. L'amplificació es realitza amb una PCR convencional. La mescla de reacció de 100 µl conté: 200 µM de cada desoxinucleòtid trifosfat (dATP, dGTP, dCTP i dTTP), 0.5 µM de cada encebador, 5 unitats de l'enzim Taq polimerasa, 1.5 mM de MgCl₂ i aproximadament 200 ng de DNA cromosòmic (provinent d'*E.coli* O157:H7). La mescla de reacció es sotmet inicialment durant 5 min a 95 °C (deshibridació inicial del DNA cromosòmic); posteriorment es realitzen cicles de: 30

segons a 95 °C (deshibridació), 30 segons a 60 °C (hibridació dels encebadors), 30 segons a 72 °C (elongació); i finalment es sotmet durant 7 minuts a 72 °C. La PCR es realitza aturant la mescla de reacció a 5, 10, 15, 20, 25 i 30 cicles. Es segueix el mateix protocol variant la concentració de DNA cromosòmic, dilucions seriades 1/10 de 4.5 ng/µl a 4.5 fg/µl en 100 µl de mescla de reacció (7 dilucions). Les amplificacions es realitzen aturant la mescla de reacció a 10, 15 i 20 cicles.

A la Figura 3.15 es mostra una part de la seqüència del gen *eaeA* d'*E.coli* O157:H7 amb la posició dels encebadors. S'espera obtenir un amplicó de 112 parells de bases doblement marcat. Amb cada amplificació es realitza un blanc, que conté tots el reactius excepte el DNA cromosòmic. Els amplicons obtinguts s'avaluen per electroforesi de gel d'agarosa com a § 3.2.8.2.



Figura 3.15: Seqüència del gen *eaeA* d'*Escherichia coli* O157:H7 obtinguda a la base de dades GenBank (EF079676) en la que es mostra la posició de l'encebador biotinitat (vermell) i l'encebador marcat amb digoxigenina (lila). L'amplicó esperat és de 112 pb (subratllat).

3.3.8.3 Detecció electroquímica del producte amplificat d'*Escherichia coli* mitjançant m-GEC

El producte amplificat doblement marcat del gen *eaeA* es detecta fent servir partícules magnètiques i captació amb m-GEC. El protocol compren els següents passos:

- Unió de l'amplicó, doblement marcat mitjançant l'extrem 5' biotinitat, a partícules magnètiques recobertes amb estreptavidina
- Marcació enzimàtica de l'extrem 3' DIG de l'amplicó amb un conjugat antiDIG-HRP
- Captura magnètica
- Mesurament per amperometria

Les partícules magnètiques permeten la immobilització orientada del material amplificat i les etapes posteriors (marcació enzimàtica i rentats) tenen lloc en solució. El material biològic unit a les partícules es capta introduint els elèctrodes m-GEC en tubs Eppendorf de 2.0 ml que contenen les partícules. La detecció es realitza per amperometria mitjançant l'activitat de l'enzim peroxidasa com a § 3.2.7.3 amb el potencial optimitzat a § 3.3.4.

3.3.8.4 Detecció electroquímica del producte amplificat d'*Escherichia coli* mitjançant Av-GEB

El producte amplificat doblement marcat també es detecta amb una nova estratègia basada en la immobilització de l'amplicó sobre elèctrodes Av-GEB. El protocol compren els següents passos:

- Unió de l'amplicó, doblement marcat mitjançant l'extrem 5' biotinitat, a l'avidina present a la superfície dels elèctrodes Av-GEB
- Marcació enzimàtica de l'extrem 3' DIG de l'amplicó amb un conjugat antiDIG-HRP
- Mesurament per amperometria

Aquest suport permet la immobilització orientada de l'amplicó i es pot renovar fàcilment mitjançant un simple procediment de polit, obtenint una nova superfície d'avidina per cada assaig. Així l'amplicó es pot immobilitzar directament sobre l'elèctrode simplificant el protocol. En aquest cas, totes les incubacions es realitzen introduint els elèctrodes dins dels tubs Eppendorf, quedant la superfície dels elèctrodes en contacte amb les solucions. A la Figura 3.16 es mostra el protocol d'aquesta estratègia comparada amb l'estratègia amb m-GEC descrita a § 3.3.8.3.

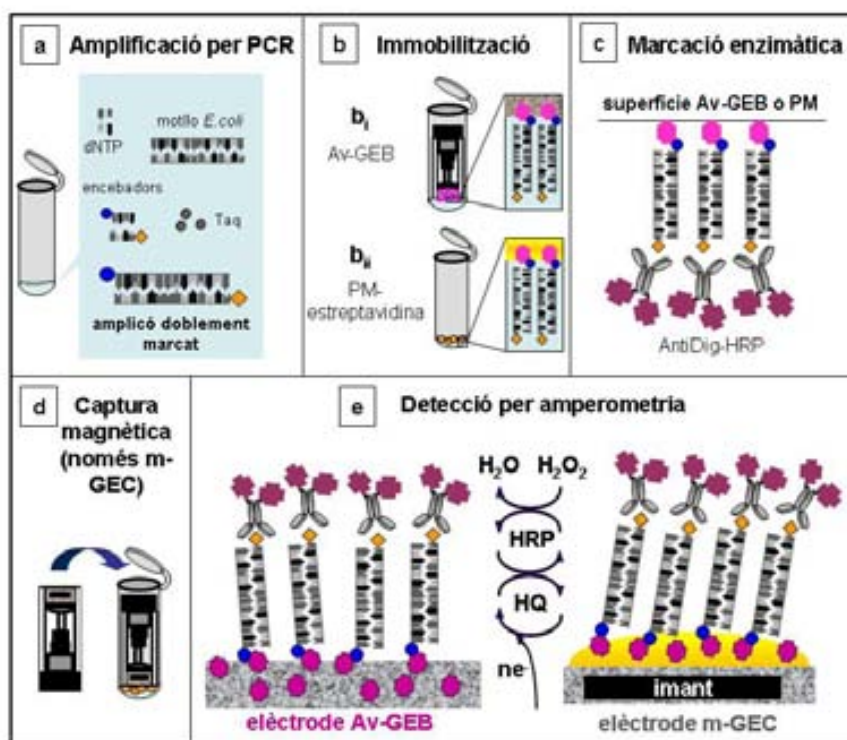


Figura 3.16: Representació esquemàtica de les estratègies basades en elèctrodes Av-GEB i m-GEC per a la detecció d'*E.coli*.

Amb aquestes estratègies electroquímiques es detecta el producte amplificat per PCR variant els cicles d'amplificació i la concentració de DNA cromosòmic inicial comparant els resultats amb un sistema de PCR a temps real amb el sistema Taqman. Per a més detalls experimentals consultar la publicació Lermo et al. (VII).

3.4 MAGNETO IMMUNOSENSOR AMPEROMÈTRIC PER A LA DETERMINACIÓ D'ÀCID FÒLIC EN LLET

3.4.1 Introducció

L'àcid fòlic (vitamina B9) s'addiciona a aliments com la llet o derivats làctics per tal de prevenir la deficiència de folat al cos humà. El consum d'aliments enriquits amb àcid fòlic és particularment important a l'etapa de l'embaràs ja que nivells insuficients d'aquesta vitamina poden provocar defectes al tub neural del fetus com l'espina bífida. Tot i que l'àcid fòlic no és tòxic, aquest pot emascarar l'anèmia en gent gran, interferir en teràpies anticonvulsives o del tractament de càncer. Per tant, són

necessaris assaigs ràpids per al control de la concentració d'àcid fòlic en aliments enriquits.

En aquesta secció s'ha desenvolupat un magneto immunosensor amperomètric per a la detecció d'àcid fòlic en llet enriquida. El format immunològic s'optimitza amb un sistema clàssic d'ELISA amb detecció òptica i posteriorment es fan servir partícules magnètiques com a suport per a la immobilització del material biològic, parlant en aquest cas d'un sistema magneto-ELISA amb detecció òptica. Posteriorment es desenvolupa el magneto immunosensor amperomètric basat en partícules magnètiques i m-GEC. Els sistemes basats en ELISA i el magneto immunosensor desenvolupat es comparen i s'avaluen per a la determinació d'àcid fòlic en mostres cegues i en diferents llets comercials enriquides.

3.4.2 Instrumentació

Les mesures electroquímiques es realitzen amb un amperímetre LC-4C (BAS Bioanalytical System, USA), amb un sistema de mesura de tres elèctrodes descrit a § 3.1.2. Els elèctrodes de treball són m-GEC descrits a § 3.1.4.3. Les plaques de microtitulació de poliestirè són de Nunc (Prod. N° 430341 C96 Maxisorp, Roskilde, DK). Les plaques ELISA es renten amb un rentador de plaques automàtic SLT 96PW (SLT Labinstruments GmbH, Salzburg, Austria). Les mesures òptiques es realitzen amb un lector de plaques SpectramaxPlus (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Les corbes de competència s'analitzen amb una equació de quatre paràmetres fent servir el software Graph Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Les separacions magnètiques es realitzen amb un separador Dynal MPC-S (Prod. N° 120.20D, Dynal Biotech ASA, Norway) o un separador 96-Well Plate Separation Rack (Prod. N° CD1001, Cortex Biochem, CA).

3.4.3 Reactius i solucions

Les partícules magnètiques recobertes amb grups tosíl (Dynabeads® M-280 Tosylactivated, Prod. N°142.03) són d'Invitrogen Dynal AS (Oslo, Norway). L'àcid fòlic és de Sigma, la solució stock (10 mM) es prepara en dimetilsulfòxid (DMSO) de Merck i es conserva a 4 °C. L'anticòs monoclonal específic de l'àcid fòlic (clon VP52), l'anticòs anti-ratolí marcat amb peroxidasa (antiIgG-HRP) i la peroxidasa són de Sigma. La solució de Bradford (BIO-RAD protein assay cat n° 600-0005) és de BIO-

RAD laboratories GmbH (Munich, Germany). Les solucions aquoses es preparen en aigua milliQ i els reactius són de grau analític (proporcionats per Sigma o Merck). La composició de les solucions aquoses es detalla a continuació:

- PBS: 10 mM fosfat, 0.14 M NaCl, pH 7.5
- PBST: 10 mM fosfat, 0.14 M NaCl, 0.05 % (v/v) Tween 20, pH 7.5
- PBSTC: 10 mM fosfat, 0.14 M NaCl, 0.01 % (v/v) Tween 20, pH 7.5
- Tampó coating: 50 mM carbonat-bicarbonat, pH 9.6
- Tampó citrat: 40 mM citrat de sodi, pH 5.5
- PBSE: 0.1 M fosfat, 0.1 M KCl, pH 7.0
- Tampó McIlvaine: 80 mM tampó fosfat, 60 mM àcid cítric, 10 mM EDTA, pH 3.5

3.4.4 Conjugació de l'àcid fòlic amb seroalbúmina bovina i peroxidasa (BSA-AF, AF-HRP)

L'àcid fòlic es conjuga amb seroalbúmina bovina (BSA) i peroxidasa de rave picant (HRP). Aquests conjugats són necessaris per a desenvolupar els formats directe i indirecte per a la detecció d'àcid fòlic descrits a § 3.4.6. La conjugació es realitza mitjançant el mètode de l'ester actiu [22]. Aquesta unió es basa en la formació d'enllaços covalents entre els grups carboxílics de l'àcid fòlic i els grups amino dels aminoàcids lisina que contenen les proteïnes BSA i HRP. La conjugació es realitza amb una prèvia etapa d'activació de l'àcid fòlic amb diciclohexilcarbodiimida (DCC) i N-hidroxisuccinamida (NHS), formant-se un ester actiu que es fa reaccionar amb el BSA o HRP. Els conjugats obtinguts (BSA-AF i AF-HRP) es purifiquen per diàlisi. A la Figura 3.17 es mostra un esquema de la conjugació. Els detalls experimentals es mostren al material suplementari de la publicació Lermo et al. (VIII).

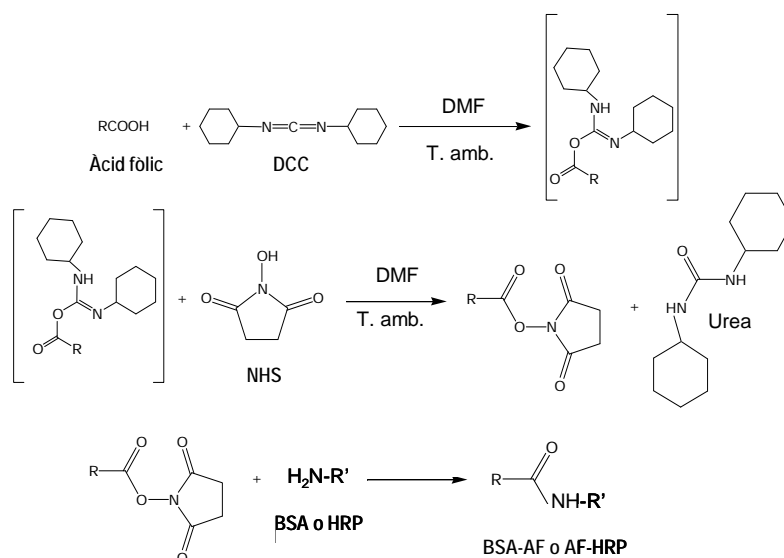


Figura 3.17: Conjugacions de l'àcid fòlic amb el mètode d'ester actiu.

3.4.5 Modificació de les partícules magnètiques

El conjugat BSA-AF sintetitzat a § 3.4.4 s'uneix covalentment a partícules recobertes amb grups tosíl, s'espera que els grups amino romanents del BSA desplacin els grups tosíl de les partícules (Figura 3.18). El protocol seguit és el descrit al material suplementari de la publicació Lermo et al. (VIII).



Figura 3.18: Modificació de les partícules magnètiques amb el conjugat BSA-AF.

L'eficiència de la modificació de les partícules amb el conjugat s'avalua mitjançant el Test de Bradford. Aquest mètode de quantificació de proteïnes desenvolupat a mitjans dels anys 70 [23] es basa en l'ús d'un reactiu orgànic anomenat Blau Brillant de Coomassie-G250 que s'uneix a proteïnes. Aquest reactiu s'uneix principalment amb els residus argenina i interacciona feblement amb els residus d'histidina, lisina, tirosina triptòfan, i fenilalanina. En absència de la proteïna, el reactiu és de color vermell i absorbeix a 465 nm, i després de la unió amb proteïnes, es genera una coloració blava

que té un màxim d'absorbància a 595 nm [24]. Aquest mètode és ràpid, sensible i presenta poca interferència amb la matriu de la mostra. Per determinar el percentatge de conjugat proteic unit es realitza una corba patró amb concentracions creixents de BSA-AF aplicant el test de Bradford. En aquesta corba s'interpol·la el valor d'absorbància obtingut amb la solució sobrenadant que conté el conjugat en excés, no unit a les partícules magnètiques. La concentració proteica obtinguda respecte el valor inicial addicionat de BSA-AF proporciona el % de conjugat unit a les partícules.

3.4.6 Optimització de l'immunoassaig

Es determina quin és el format més adient per a la determinació d'àcid fòlic. Es comparen els paràmetres obtinguts (LD i IC50) amb un format directe i indirecte competitiu d'ELISA amb detecció òptica (Figura 3.19). Les incubacions es realitzen en plaques de poliestirè de 96 pous amb fons pla. En el format directe, el traçador enzimàtic (AF-HRP) competeix amb l'àcid fòlic (AF) pels llocs d'unió amb l'anticòs específic immobilitzat sobre el suport sòlid de la placa. En canvi, en el format indirecte, el conjugat BSA-AF s'immobilitza sobre el suport sòlid de la placa i la competència s'estableix entre l'AF de la mostra i el conjugat immobilitzat BSA-AF per l'anticòs específic en solució. En aquest cas, la quantitat d'anticòs específic unit al suport sòlid es determina amb un segon anticòs conjugat amb peroxidasa (AntiIgG-HRP). La detecció òptica es realitza incubant el sistema immunològic amb la solució de substrat, que conté 0.004 % (v/v) de peròxid d'hidrogen i 0.01 % (p/v) de tetrametilbenzidina (TMB) en tampó citrat. L'enzim HRP catalitza la reducció del peròxid d'hidrogen oxidant el TMB, generant un producte de color blau. La reacció enzimàtica s'atura addicionant àcid sulfúric 2 M, transformant l'estructura del producte de color blau en una estructura que absorbeix llum a 450 nm (color groc). El senyal obtingut és indirectament proporcional a la concentració d'àcid fòlic addicionada. La corba de competència obtinguda s'analitza amb una equació sigmoïdal que segueix la fórmula: $y = \frac{A-B}{1+10^{\exp((\log C - \log X) \cdot D)}} + B$, on A i B són les absorbàncies màxima i mínima corresponentment, C és la concentració d'àcid fòlic que produeix el 50% de l'absorbància màxima, X la concentració d'àcid fòlic i D el pendent al punt d'inflexió de la corba sigmoïdal.

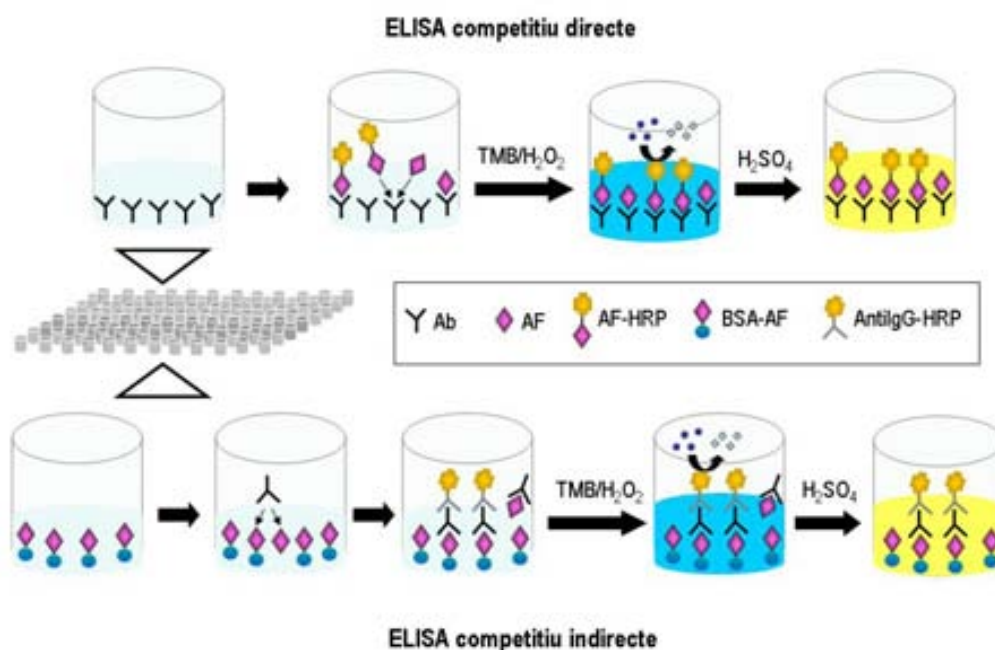


Figura 3.19: Etapes dels formats directe i indirecte de l'ELISA òptic.

Un cop establert el format s'optimitzen els paràmetres experimentals de l'etapa de competència (temps de pre-incubació de l'anticòs específic amb l'àcid fòlic, temps d'incubació, concentració de Tween 20, força iònica i pH). Els detalls experimentals es mostren al material suplementari de la publicació Lermo et al. (VIII).

3.4.7 Efecte matriu de la llet

La llet conté un elevat percentatge de greixos, proteïnes i minerals i s'espera que tingui un efecte matriu important, que pot afectar a la interacció de reconeixement entre l'àcid fòlic i l'anticòs específic. Per aquesta raó s'estudia l'efecte matriu de les llets comercials analitzades. Les llets enriquides es sotmeten a diferents tractaments (dilució, centrifugació i addició del tampó de McIlvaine que precipita les proteïnes presents a la llet). Els passos seguits en cada tractament es detallen al material suplementari de la publicació Lermo et al. (VIII). L'efecte matriu s'avalua comparant les corbes obtingudes en PBSTC amb les corbes obtingudes amb la mostra tractada fent servir l'assaig ELISA optimitzat a § 3.4.6.

3.4.8 Magneto-ELISA

Es desenvolupa un assaig magneto-ELISA fent servir les partícules magnètiques modificades amb el conjugat BSA-AF. La immobilització dels immunoreactius es realitza sobre les partícules magnètiques i les incubacions es realitzen en una placa ELISA de 96 pous amb fons rodó. El format seguit és competitiu indirecte (sistema optimitzat a § 3.4.6) i els rentats es realitzen amb un separador magnètic que s'adapta a la placa ELISA. Després de la incubació amb la solució substrat (H_2O_2 /TMB) i l'addició d'àcid sulfúric tal i com es descriu a § 3.4.6, les partícules magnètiques es separen amb el separador magnètic i el sobrenadant es transfereix a una placa ELISA de 96 pous amb fons pla per a realitzar el mesurament òptic a 450 nm, tal i com es pot observar a la Figura 3.20. Les dades obtingudes s'ajusten a una corba de competència com es descriu a § 3.4.6.

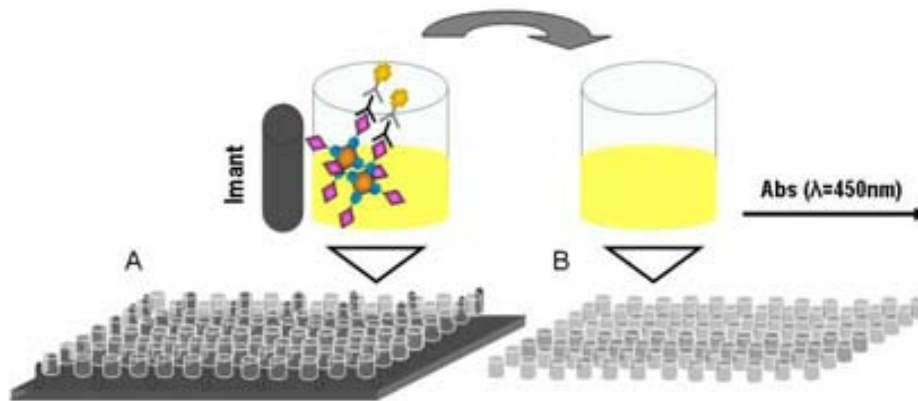
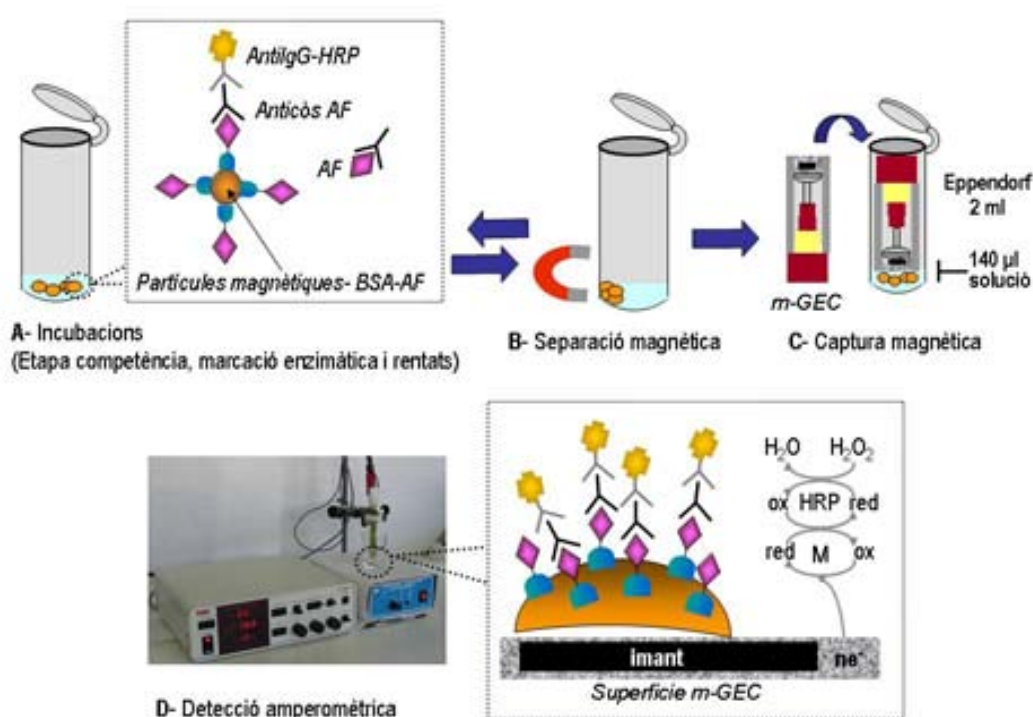


Figura 3.20: Representació esquemàtica de la determinació de l'activitat enzimàtica de les partícules magnètiques basada en la detecció òptica. (A) Separació de les partícules magnètiques amb el separador magnètic de placa i (B) Transferència del sobrenadant a una placa de fons pla per a realitzar la lectura d'absorbància a 450 nm.

3.4.9 Magneto immunoassaig electroquímico

L'assaig competitiu indirecte es realitza sobre les partícules modificades amb el conjugat BSA-AF, realitzant les incubacions en tubs Eppendorf de 2 ml. A les etapes de rentat les partícules magnètiques es separen introduint els tubs Eppendorf en un separador magnètic. Les incubacions (etapa de competència, marcació enzimàtica amb l'anticòs marcat amb peroxidasa i rentats) es realitzen a temperatura ambient i agitació constant (600 rpm). Posteriorment les partícules magnètiques es capturen introduint els magneto elèctrodes dins dels tubs Eppendorf. La detecció es realitza per amperometria mitjançant l'activitat de l'enzim peroxidasa unit a l'anticòs específic de

l'àcid fòlic. La cel·la està formada per un sistema de tres elèctrodes, descrit a § 3.1.2, submergits en 20 ml de tampó PBSE. El mesurament es realitza per amperometria aplicant un potencial constant de -0.15 V en presència del mediador hidroquinona (4.90 mM) i peròxid d'hidrogen (1.81 mM) com a substrat de l'enzim peroxidasa (§ 3.2.7.3). A la Figura 3.21 es mostren les etapes de l'immunoassaig magnètic. La corba de competència obtinguda s'analitza amb una equació sigmoïdal que segueix la fórmula: $y = \frac{A-B}{1+10^{\exp((\log C - \log X) \cdot D)}} + B$, on A i B són els senyals màxim i mínim corresponentment, C és la concentració d'àcid fòlic que produeix el 50 % del senyal màxim, X la concentració d'àcid fòlic i D el pendent al punt d'inflexió de la corba sigmoïdal.



3.21: Representació esquemàtica dels passos que intervenen al magneto immunoassaig amb detecció electroquímica.

3.4.10 Determinació d'àcid fòlic en mostres cegues i llet enriquida

Les estratègies descrites a § 3.4.8 i 3.4.9 s'apliquen per a determinar la concentració d'àcid fòlic en mostres cegues de llet desnatada i mostres comercials de llet enriquida. Les mostres cegues contenen concentracions de 160 nM a 2500 nM d'àcid fòlic. Les mostres comercials corresponen a llets desnatades enriquides amb 300 ppb d'àcid fòlic.

3.5 BIBLIOGRAFIA

- [1] Santandreu, M., Céspedes, F., Alegret, S., Martínez-Fàbregas, E. Amperometric immunosensors based on rigid conducting immunocomposites. *Analytical Chemistry* 69 (1997) 2080-2085.
- [2] Llopis, X., Merkoçi, A., del Valle, M., Alegret, S. Integration of a glucose biosensor based on a epoxy-graphite-TTF-TCNQ-GOD biocomposite into a FIA system. *Sensors and Actuators B* 107 (2005) 742-748.
- [3] Pividori, M.I, Merkoçi, A., Alegret, S. Graphite-epoxy composites as a new transducing material for electrochemical genosensing. *Biosensors and Bioelectronics*, 19 (2003) 473-484.
- [4] Céspedes, F., Martínez-Fàbregas, E., Alegret, S. New materials for electrochemical sensing I. Rigid conducting composites. *Trends in analytical chemistry*, 15(1996) 296-304.
- [5] Alegret, S., Rigid carbon-polymer biocomposites for electrochemical sensing. A review. *Analyst*, 121 (1996) 1751-1758.
- [6] Lam, S. and J.R. Roth, IS200: A salmonella-specific insertion sequence. *Cell*, 34(1983) 951-960.
- [7] Saunders, N.A., Insertion Sequence (IS) Typing and Oligotyping in New Approaches for the Generation and Analysis of Microbial Typing Data, p. 249-265, 2001. Elsevier Science B.V, Amsterdam.
- [8] R. Beuzón, C., Casadesús, J., Conserved structure of IS200 elements in Salmonella. *Nucleic Acids Research*, 25 (1997) 1355-1361.
- [9] Gibert, I., Barbé, J., Casadesús, J., Distribution of insertion sequence IS200 in Salmonella and Shigella. *Journal of General Microbiology*, 136 (1990) 2555-2560.
- [10] Palecek, E., Oscillographic Polarography of Highly Polymerized Deoxyribonucleic Acid. *Nature*, 188 (1960) 656-657.
- [11] Jelen, F., Fotja, M., Palecek, E., Voltammetry of native double-stranded, denatured and degrade DNAs. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 427 (1997) 49-56.
- [12] Steenken, S., Purine bases, nucleosides, and nucleotides: aqueous solution redox chemistry and transformation reactions of their radical cations and e- and OH adducts. *Chemical Reviews*, 89 (1989) 503-520.
- [13] Oliveira-Brett, A.M., Piedade, J.A.P., Silva, L.A., Diculescu, V.C., Voltammetric determination of all DNA nucleotides. *Analytical Biochemistry*, 332 (2004) 321-329.
- [14] Oszoz, M., Erdem, A., Özkan, D., Kara, P., Karadeniz, H., Meric, B., Kerman, K., Girousi, S., Allele-specific genotyping by using guanine and gold electrochemical oxidation signals. *Bioelectrochemistry*, 67(2005) 199-203.
- [15] Lucarelli, F., Marrazza, G., Palchetti, I., Cesaretti, S., Mascini, M., Coupling of an indicator-free electrochemical DNA biosensor with polymerase chain reaction for the detection of DNA sequences related to the apolipoprotein E. *Analytica Chimica Acta*, 469 (2002) 93-99.

- [16] Case-Green, C.S., Southern, E.M., Studies on the base pairing properties of deoxyinosine by solid phase hybridisation to oligonucleotides. *Nucleic Acids Research*, 22 (1994) 131-136.
- [17] Thorp, H.H., Cutting out the middleman: DNA biosensors based on electrochemical oxidation. *Trends in Biotechnology*, 16 (1998) 117-121.
- [18] Lampel, K.A., Levy, D.D. DNA-Based Assays. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, p. 79-85, 2002. Elsevier, Oxford.
- [19] Griffiths, M. Nucleic acid-based assays. *Encyclopedia of Food Microbiology*, p 1599-1608, 1999. Elsevier, Oxford.
- [20] Law, D., Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E.coli*. *Journal of Applied Microbiology*, 88 (2000) 729-745.
- [21] Zacco, E. Diseño de nuevos materiales de afinidad universal. Aplicación en sensores. Tesis doctoral. Bellaterra, Universitat Autònoma de Barcelona (2006).
- [22] Schneider, P., Hammock, B.D. Influence of the ELISA format and the hapten-enzyme conjugate on the sensitivity of an immunoassay for S-triazine herbicides using monoclonal antibodies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40 (1992) 525-530.
- [23] Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (1976) 248-254.
- [24] Mikkelsen, S.R., Cortón, E. *Bioanalytical Chemistry*, 2004. John Wiley and Sons, New Jersey.

4. DISCUSSIÓ GLOBAL DELS RESULTATS

4 DISCUSSIÓ GLOBAL DELS RESULTATS

4.1 INTRODUCCIÓ

En la present tesi doctoral s'han desenvolupat nous sistemes bioanalítics basats en biosensors electroquímics abordant tres aspectes crítics dels dispositius biosensors que convergeixen cap a la simplificació metodològica: la immobilització orientada del biomaterial, la marcació i la transducció del senyal analític.

Per aconseguir la simplificació metodològica s'han desenvolupat diferents estratègies per a la detecció de DNA i immunoespècies mitjançant la detecció amb nous transductors electroquímics, basats en: i) biocompòsits modificats amb la proteïna avidina (Av-GEB), i ii) compòsits amb un element magnètic integrat (m-GEC). Els biocompòsits d'avidina constitueixen una plataforma universal per a la immobilització directa de material biològic biotinitat. Els magneto elèctrodes permeten la integració de partícules magnètiques als procediments biosensors per tal de realitzar les reaccions biològiques de biorreconeixement de forma millorada en mostres complexes, la preconcentració de l'anàlit i una detecció, per tant, més sensible. Pel que fa a la marcació electroquímica, es van avaluar diferents tipus d'estratègies basades en tenir en compte tant la sensibilitat com la simplificació metodològica.

S'ha dissenyat una nova estratègia de detecció de DNA mitjançant l'ús de d'encebadors marcats pel reconeixement específic de seqüències gèniques. Amb aquesta estratègia, al mateix temps i durant la reacció de PCR, s'amplifica el senyal electroquímico i s'aconsegueix la immobilització orientada del DNA a diferents transductors electroquímics, simplificant per tant el procediment i augmentant la sensibilitat de la detecció. Per aconseguir-ho, es fan servir encebadors doblement marcats, que s'incorporen al producte amplificat i el marquen doblement a cada extrem durant la reacció de PCR. La doble marcació permet la immobilització orientada de l'amplicó a transductors electroquímics i la marcació per a la detecció electroquímica. Una simplificació metodològica i integració de procediments s'aconsegueix mitjançant

la realització de les PCR fent servir encebadors magnètics, és a dir, incorporant les partícules magnètiques.

Finalment, s'ha desenvolupat una estratègia immunosensora simplificada, basada en partícules magnètiques i en un format competitiu indirecte per a la detecció sensible de molècules petites de naturalesa haptènica. La simplificació metodològica en aquest cas s'aconsegueix fent servir la mateixa química de conjugació per a l'obtenció de l'immunogen i de la immobilització orientada de l'haptè al transductor per aconseguir un biorreconeixement millorat.

Els dispositius resultants s'han aplicat al camp de la seguretat alimentària, per a la detecció electroquímica de gens característics dels bacteris patògens *Salmonella* i *Escherichia coli* provinents de mostres reals i pel control de l'àcid fòlic com additiu alimentari en llet comercial.

A les següents seccions s'hi recullen els resultats obtinguts en quant a la caracterització dels elèctrodes construïts; les estratègies d'immobilització, marcació i detecció; i l'aplicació dels biosensors desenvolupats a mostres alimentàries. Aquests resultats han donat lloc a les següents publicacions incloses al final d'aquest document:

- I. Genomagnetic assay based on label-free electrochemical detection using magneto-composite electrodes
Sensors and Actuators B, 114 (2006) 591-598
Arzum Erdem, M. Isabel Pividori, Anabel Lermo, Alessandra Bonanni, Manel del Valle, Salvador Alegret

- II. Rapid Electrochemical DNA Biosensing Strategy for the Detection of Food Pathogens Based on Enzyme-DNA-Magnetic Bead Conjugate
Afinidad, 63 (2006) 13-18
M. Isabel Pividori, Anabel Lermo, Santiago Hernández, Jordi Barbé, Salvador Alegret, Susana Campoy
Article premiat amb la menció del millor treball de recerca "8th European A-IQS Award on Enzyme Technology" atorgat per l'Institut Químic de Sarrià

- III. In situ DNA amplification with magnetic primers for the electrochemical detection of food pathogens
Biosensors and Bioelectronics, 22 (2007) 2010-2017
A. Lermo, S. Campoy, J. Barbé, S. Hernández, S. Alegret, M.I. Pividori

- IV.** Procedure 31. Rapid electrochemical verification of PCR amplification of *Salmonella spp.* based on m-GEC electrodes
Comprehensive Analytical Chemistry, 49 (2007) e221-e226
María Isabel Pividori, Anabel Lermo, Susana Campoy, Jordi Barbé, Salvador Alegret
- V.** Procedure 32. In situ DNA amplification of *Salmonella spp.* with magnetic primers for the real-time electrochemical detection based on m-GEC electrodes
Comprehensive Analytical Chemistry, 49 (2007) e227-e231
María Isabel Pividori, Anabel Lermo, Susana Campoy, Jordi Barbé, Salvador Alegret
- VI.** Bioaffinity platforms based on carbon-polymer biocomposites for electrochemical biosensing
Thin Solid Films, 516 (2007) 284-292
M.I. Pividori, A. Lermo, E. Zacco, S. Hernández, S. Fabiano, S. Alegret
- VII.** Towards Q-PCR of pathogenic bacteria with improved electrochemical double-tagged genosensing detection
Biosensors and Bioelectronics, 23 (2008) 1805-1811
A. Lermo, E. Zacco, J. Barak, M. Delwiche, S. Campoy, J. Barbé, S. Alegret, M.I. Pividori
- VIII.** Immunoassay for folic acid detection in vitamin-fortified milk based on electrochemical magneto sensors
Biosensors and Bioelectronics, 24 (2009) 2057-2063
A. Lermo, S. Fabiano, S. Hernández, R. Galvé, M.-P. Marco, S. Alegret and M.I.Pividori

La present tesi doctoral també ha donat lloc a la publicació dels següents treballs:

- Electrochemical immunosensor for the diagnosis of celiac disease
Analytical Biochemistry, 388 (2009) 229-234
M.I. Pividori, A. Lermo, A. Bonanni, S. Alegret, M. del Valle

- Double-tagging polymerase chain reaction with a thiolated primer and electrochemical genosensing based on gold nanocomposite sensor for food safety
Analytical Chemistry, 81 (2009) 1332-1339
Paulo R. Brasil de Oliveira Marques, Anabel Lermo, Susana Campoy, Hideko Yamanaka, Jordi Barbé, Salvador Alegret and M. Isabel Pividori

- Magneto immunosensing of pathogenic bacteria and electrochemical magneto genosensing of the double-tagged amplicon
Analytical Chemistry, En premsa (ac-2009-007539.R1)
Susana Liébana, Anabel Lermo, Susana Campoy, Jordi Barbé, Salvador Alegret, María Isabel Pividori.

4.2 CONSTRUCCIÓ I CARACTERITZACIÓ DE NOUS MATERIALS PER A LA IMPLEMENTACIÓ EN BIOSENSORS ELECTROQUÍMICS

4.2.1 Caracterització electroquímica dels elèctrodes per voltamperometria cíclica

La modificació del material compòsit amb la introducció de biomolècules o la incorporació d'imants pot modificar les propietats electroquímiques de l'elèctrode resultant. Per aquesta raó, els elèctrodes construïts (Av-GEB i m-GEC) es van caracteritzar electroquímicament mitjançant voltamperometria cíclica i els resultats es van comparar amb el comportament electroquímic de l'elèctrode GEC.

La caracterització es va realitzar amb el sistema redox hidroquinona/benzoquinona (HQ/BQ). La caracterització per voltamperometria d'una banda, aporta informació del comportament electroquímic dels elèctrodes construïts i per l'altra, indica el potencial de reducció de la BQ als elèctrodes construïts, el qual s'aplicarà per fer les mesures d'amperometria. El potencial de reducció s'aplicarà amb l'objectiu de regenerar la hidroquinona, prèviament oxidada per l'enzim peroxidasa (§ 3.2.7.3).

A la Figura 4.1 (A) es compara el comportament electroquímic d'un transductor tipus GEC i un m-GEC amb imant de diàmetre de 3 mm. El comportament observat és molt similar. Això indica que la introducció d'un imant de 3 mm en un compòsit no fa variar les característiques del dispositiu final. Amb aquest tipus de sensors s'observa un potencial de reducció de la BQ cap a -0.050 V i un potencial d'oxidació de la HQ proper a $+0.200$ V.

En canvi en la comparació del GEC amb un m-GEC amb imant de diàmetre 4 mm (Figura 4.1(B)) es pot observar com els potencials de reducció i oxidació es desplacen lleugerament a esquerra i dreta respectivament, respecte els potencials del GEC. Per tant, amb la introducció d'un imant més gran s'observa una tendència a la modificació de les propietats electroquímiques del dispositiu final. Per aquest magneto elèctrode s'obté un potencial de reducció de la BQ a -0.100 V i d'oxidació de la HQ a $+0.250$ V.

El comportament electroquímic del compòsit modificat amb avidina (Av-GEB) es mostra a la Figura 4.1(C). Tal i com es pot observar, la incorporació de material biològic en el sí del compòsit desplaça lleugerament els potencials d'oxidació i

reducció respecte els elèctrodes GEC i m-GEC (3 mm). Pels elèctrodes Av-GEB el potencial de reducció de BQ és proper a -0.175 V i el d'oxidació de la HQ a $+0.300$ V.

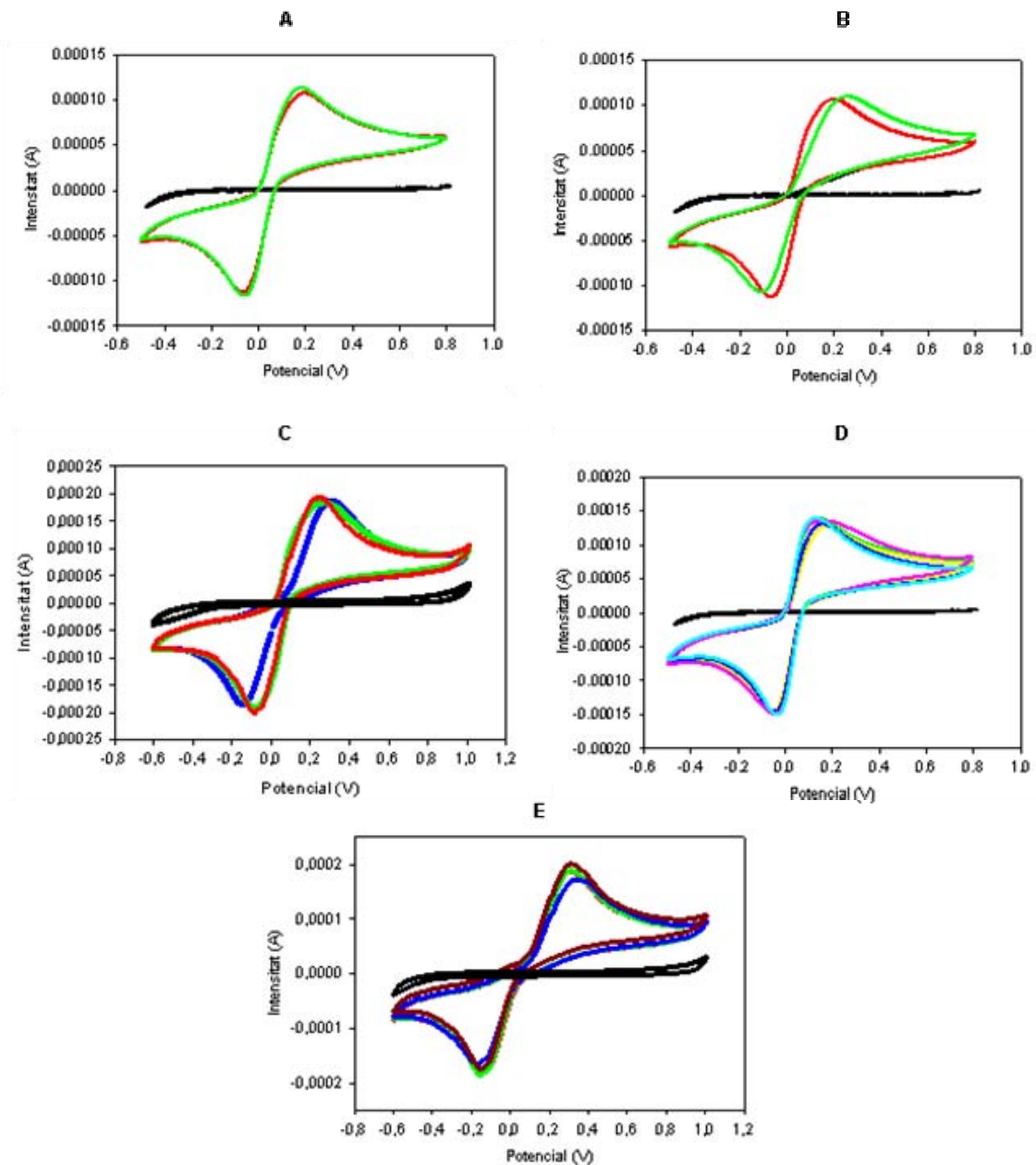


Figura 4.1: Voltamperogrames cíclics fent servir com a elèctrode de treball: **(A)** m-GEC amb imant de 3 mm (verd), GEC (vermell); **(B)** m-GEC amb imant de 4 mm (verd), GEC (vermell); **(C)** Av-GEB (blau), m-GEC de 3 mm (verd), GEC (vermell); **(D)** m-GEC amb imant de 3 mm, $n = 6$; **(E)** Av-GEB, $n = 4$. Tots els gràfics s'acompanyen d'una línia base (negre). En tots els casos el medi de treball és 0.1 M fosfat, 0.1 M KCl, pH 7.0. Exceptuant les línies base, la resta d'experiments es van realitzar en presència d'hydroquinona (HQ) 4.90 mM. La velocitat de rastreig va ser de 50 mV/s.

La caracterització dels elèctrodes també es realitza per a comprovar la reproductibilitat entre els sensors d'un mateix lot, és a dir, preparats amb la mateixa mescla de

compòsit de grafit-epoxi. A la Figura 4.1 (D) es comparen m-GEC de diàmetre d'imant de 3 mm construïts amb una mateixa mescla de compòsit grafit-epoxi. Els resultats obtinguts indiquen una bona reproductibilitat, de forma que es possible modificar un lot d'elèctrodes i comparar-ne els resultats obtinguts. La caracterització també es realitza per un mateix lot d'elèctrodes Av-GEB. A la Figura 4.1 (E) es mostra que els elèctrodes modificats amb la proteïna avidina també presenten una bona reproductibilitat.

Per tant, es pot concloure que hi ha una bona reproductibilitat entre transductors preparats amb una mateixa pasta de compòsit grafit-epoxi, i que la modificació del material compòsit amb la introducció de biomolècules o material magnètic pot canviar les propietats electroquímiques de l'elèctrode resultant. En el cas de m-GEC la introducció d'imants de diàmetre de 4 mm comporta una tendència a la separació dels potencials d'oxidació/reducció.

4.3 GENOSENSORS ELECTROQUÍMICS PER A LA DETECCIÓ DE SALMONELLA

En aquesta secció es mostren els resultats obtinguts en la detecció de seqüències d'oligonucleòtids que formen part del fragment IS200 relacionat amb la patogenicitat del bacteri *Salmonella*. S'han desenvolupat diverses estratègies que varien en el format de l'assaig (sistema de captura i sandvitx), els elèctrodes emprats (GEC i m-GEC) i la tècnica de detecció electroquímica que s'ha fet servir (voltamperometria diferencial d'impulsos i amperometria). Els resultats obtinguts amb cada estratègia s'avaluaran i es compararan amb l'objectiu de determinar quina estratègia proporciona millors resultats per a la seva aplicació en la detecció de mostres reals de *Salmonella*.

4.3.1 Caracterització microscòpica de partícules magnètiques capturades sobre magneto elèctrodes

La microscòpia electrònica d'escaneig es va fer servir per a observar la disposició de les partícules magnètiques sobre la superfície dels magneto elèctrodes. S'ha de trobar una situació de compromís entre la quantitat de partícules utilitzades per tal de poder immobilitzar el material biològic i afavorir el senyal electroquímic generat. L'objectiu és escollir aquella situació en la que les partícules es distribueixin homogèniament en forma d'una monocapa sobre la superfície de l'elèctrode, de tal forma que no

s'obstaculitzi la transferència electrònica que es dóna entre el transductor i els llocs actius de l'enzim peroxidasa, facilitada pel mediador hidroquinona.

Tenint en compte que les partícules magnètiques són esferes de diàmetre de $2.8 \mu\text{m}$ ($\text{CV} < 3\%$), teòricament es podria formar una monocapa sobre la superfície de l'elèctrode amb una quantitat de l'ordre de 10^6 partícules magnètiques. Calculant el nombre de partícules com la relació entre la superfície de l'imant i la de les partícules, on la superfície de l'imant és aproximadament $7 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ ($\pi \times r_{\text{imant}}^2$) i la superfície de la partícula $7 \mu\text{m}^2$ ($\pi \times r_{\text{partícula}}^2$).

Tal i com es pot observar a la Figura 4.2 amb la quantitat teòrica proposada (1×10^6) no es forma una monocapa, ja que les partícules no es distribueixen uniformement sobre la superfície de l'elèctrode, sinó que ho fan formant agregats, deixant forats lliures de partícules. De l'estudi de les imatges obtingudes es pot determinar que la situació òptima es trobaria entre 9.1×10^5 i 1.8×10^5 partícules immobilitzades al transductor. Augmentant la concentració, el nombre de partícules seria massa elevat i això podria dificultar la transferència del senyal elèctric, és a dir, que el mediador soluble es trobaria impedit per arribar al transductor. A concentracions inferiors hi haurien molt poques partícules, i això implicaria una disminució de la quantitat d'anàlit que es pot immobilitzar, amb la conseqüent disminució del senyal electroquímic generat.

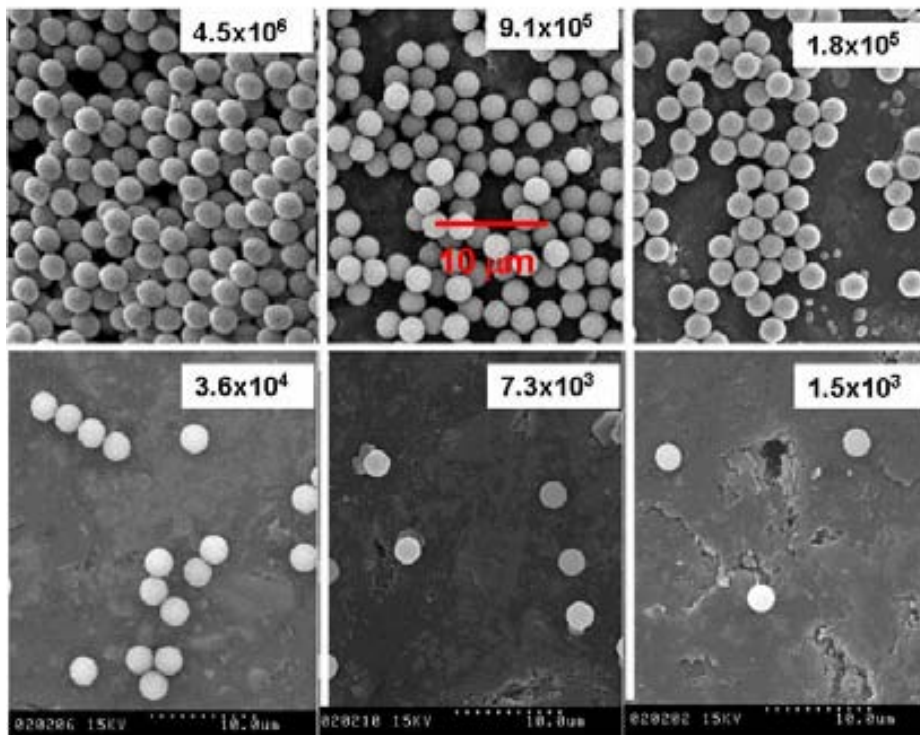


Figura 4.2: Imatges de partícules magnètiques dipositades sobre magneto elèctrodes (imant de 3 mm de diàmetre). La quantitat de partícules magnètiques es mostra a cada imatge. Resolució de $10 \mu\text{m}$ i potencial d'escaneig de 10 KV.

4.3.2 Caracterització electroquímica dels magneto elèctrodes m-GEC modificats amb partícules magnètiques

Les propietats electroquímiques dels magneto elèctrodes construïts, amb imants de 3 i 4 mm de diàmetre, es van avaluar per amperometria. Per fer-ho es va escollir un sistema d'elevada simplicitat, basat en la unió específica de partícules magnètiques amb estreptavidina i el conjugat biotina-HRP. Per a fer la mesura les partícules modificades amb el conjugat enzimàtic es van dipositar sobre els magneto elèctrodes construïts.

Tal i com es pot observar a la Figura 4.3, l'adsorció inespecífica del conjugat enzimàtic genera senyals molt baixos, indicant que la biotina addicionada bloqueja els llocs específics d'unió amb les partícules magnètiques, impedit la unió amb el conjugat enzimàtic. Els dos magneto elèctrodes mostren una bona reproductibilitat (RSD de 6.8 % pel m-GEC de 3 mm i 5.8 % pel de 4 mm), però la resposta amperomètrica del magneto elèctrode amb imant de 3 mm és més elevada que en el cas del magneto elèctrode d'imant de 4 mm. Com que els assajos es van fer sota les mateixes condicions, aquesta diferència pot ser deguda a una diferència de conducció elèctrica dels dos elèctrodes. Aquests resultats indiquen que en augmentar el diàmetre de l'imant la conducció elèctrica del magneto elèctrode m-GEC disminueix, obtenint més senyal pels magneto elèctrodes d'imant de 3 mm. Aquest fet, juntament amb els resultats obtinguts amb la caracterització electroquímica per voltamperometria cíclica (§ 4.2.1) evidencien que els magneto elèctrodes d'imant de 3 mm presenten millors característiques electroquímiques que els de 4 mm. Per aquesta raó seran els que es faran servir a les seccions següents.

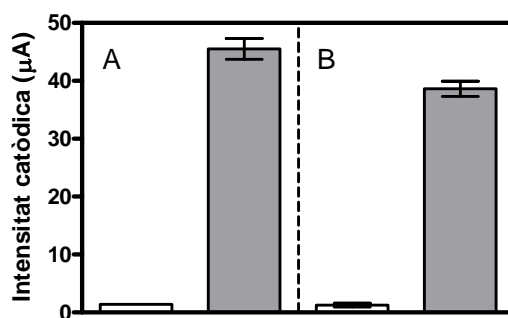


Figura 4.3: Comparació del senyal obtingut amb els magneto elèctrodes construïts amb imants de diàmetre 3 mm (A) i 4 mm (B) amb un sistema de partícules magnètiques-biotina-HRP. Les barres en blanc corresponen els controls negatius de cada assaig (addicionant biotina en excés per tal de bloquejar la unió del conjugat enzimàtic). Quantitat de reactius: 4.6×10^5 partícules magnètiques, 60 pmols de biotina-HRP. Medi: 0.1 M fosfat, 0.1 M KCl, pH 7.0. Mediador: 4.90 mM hidroquinona. Substrat: 1.81 mM H_2O_2 . E aplicat= -0.1 V (respecte Ag/AgCl), n= 3. Els resultats es mostren com la mitjana del senyal amb la corresponent desviació estàndard.

4.3.3 Detecció de seqüències sintètiques de *Salmonella* mitjançant l'activitat intrínseca del DNA

La detecció de seqüències sintètiques relacionades amb el fragment IS200 del bacteri *Salmonella* es va realitzar mitjançant l'oxidació de les bases guanines. Aquestes seqüències es van hibridar a una sonda de captura modificada amb biotina i que conté bases nitrogenades inosina en comptes de guanina, la qual està unida a partícules magnètiques modificades amb estreptavidina, mitjançant la unió estreptavidina-biotina. El mesurament per voltamperometria diferencial d'impulsos es va realitzar amb elèctrodes GEC i m-GEC, realitzant en els primers un tractament alcalí per a trencar l'enllaç de les partícules magnètiques amb la sonda de captura (§ 3.2.6.1). En tots dos casos el material biològic es va adsorbir en sec a 80 °C durant 45 min, per tal d'eliminar l'aigua i afavorir les interaccions físiques febles hidrofòbiques i per tant, la transferència electrònica entre la base guanina del DNA i el transductor electroquímic. A la Figura 4.4 es mostren els senyals obtinguts amb l'estratègia de GEC per a la detecció de dues seqüències del fragment IS200, de 23 i 56 bases. Els senyals obtinguts al potencial d'oxidació de la guanina en aquest transductor (+0.55V) es poden diferenciar clarament del control negatiu que conté únicament la sonda de captura amb inosines. La mitjana del senyal per la seqüència de 23 bases és més elevat que el senyal obtingut per la seqüència de 56 bases, ja que el nombre total de guanines és més elevat a la primera seqüència (en la de 23 bases: 12 guanines/seqüència i 53 pmols adicionats; en la de 56 bases: 19 guanines/seqüència i 22 pmols adicionats). Els valors de RSD són de 14.8 % per la detecció de la seqüència de 23 bases i 15.9 % per la de 56 bases.

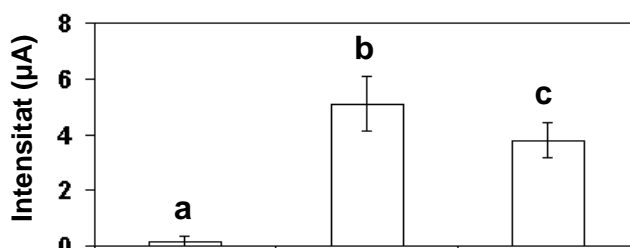


Figura 4.4: Histogrames de l'oxidació de la base guanina fent servir GEC i tractament alcalí: (a) sonda de captura amb inosines, (b) 20 µg/ml (53 pmols) seqüència anàlit de 23 bases, (c) 20 µg/ml (22 pmols) seqüència anàlit de 56 bases. Medi: 0.2 M acetat, 20 mM NaCl, pH 4.8. Potencial aplicat de 0.3 a 1.2 V, amplitud d'impuls de 100 mV i velocitat d'escombrat de 15 mV/s. n= 3. Els resultats es mostren com la mitjana del senyal amb la corresponent desviació estàndard.

Quan es fan servir elèctrodes m-GEC sense tractament alcalí, s'obté menys reproductibilitat tal i com es pot observar a la Figura 4.5 (RSD de 21.1 % per la

seqüència de 23 bases i 50.5 % per la de 56 bases). En aquest cas, l'adsorció de l'híbrid a 80°C es realitza amb el DNA unit a les partícules magnètiques. Les bases guanines no estan en íntim contacte amb el transductor i per tant la transferència electrònica no està afavorida, fet que pot empitjorar la reproductibilitat del resultat. Per aquesta raó es va considerar més adient aplicar l'estratègia de GEC amb tractament alcalí per a la detecció de seqüències no complementàries.

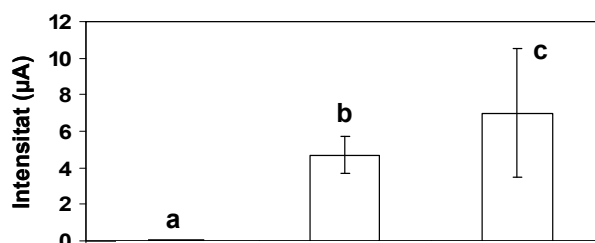


Figura 4.5: Histogrames de l'oxidació de la base guanina fent servir m-GEC sense tractament alcalí: (a) sonda de captura amb inosines, (b) 20 µg/ml seqüència anàlit de 23 bases, (c) 20 µg/ml seqüència anàlit de 56 bases. La resta de condicions experimentals com a la Figura 4.4.

A la Figura 4.6 es mostra l'estratègia amb elèctrodes GEC, aplicada a dues seqüències no complementàries de 23 bases (NC-1) i 62 bases (NC-2). Tal i com es pot observar, aquestes seqüències generen un senyal semblant al control negatiu que només conté la sonda amb inosines. Per tant, l'estratègia electroquímica basada en l'activitat intrínseca de les bases guanines fent servir GEC i tractament alcalí, és molt específica per a la determinació del fragments IS200 de *Salmonella*. Aquesta estratègia, malgrat no ser molt sensible, tal i com es veurà més endavant, en comparació amb les altres estratègies amb marcadors enzimàtics (§ 4.3.4), proporciona un assaig simple i específic, que es pot fer servir quan la quantitat de DNA anàlit no és un factor limitant.

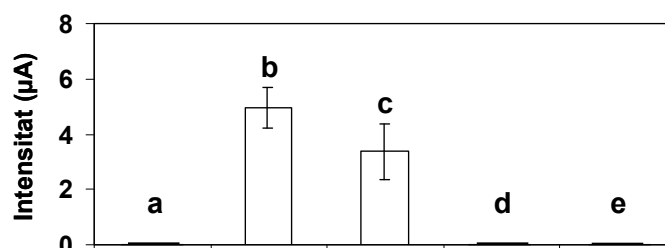


Figura 4.6: Histogrames de l'oxidació de la base guanina fent servir GEC i tractament alcalí: (a) sonda de captura amb inosines, (b) 20 µg/ml seqüència anàlit IS200 de 23 bases, (c) 20 µg/ml seqüència anàlit IS200 de 56 bases, (d) 20 µg/ml de NC-1, (e) 20 µg/ml de NC-2. La resta de condicions experimentals com a la Figura 4.4.

4.3.4 Detecció de seqüències sintètiques de *Salmonella* mitjançant marcadors enzimàtics

En les dues seccions incloses a continuació es mostren els resultats de la detecció d'una seqüència sintètica de 62 bases relacionada amb el fragment IS200 de *Salmonella* fent servir els elèctrodes GEC i m-GEC. En ambos casos la detecció es realitza per amperometria aplicant el potencial de reducció de la hidroquinona, mediador electroquímic d'aquest sistema (§ 3.2.7.3). El format que es fa servir és de tipus sandvitx, reconeixement de l'anàlit per una sonda de captura i una sonda marcada amb digoxigenina. Aquesta darrera és la que permet la unió del conjugat enzimàtic antiDIG-HRP. Amb els elèctrodes GEC es mostrarà quin format sandvitx és més viable (seqüencial o en un pas), i amb m-GEC els avantatges que incorpora l'ús de partícules magnètiques a l'assaig.

4.3.4.1 Estratègia basada en la immobilització de DNA per adsorció sobre elèctrodes GEC

El format sandvitx presenta molts avantatges respecte altres formats, ja que es dona el doble reconeixement de la seqüència anàlit per part de la sonda de captura i la sonda marcada, augmentant així la selectivitat de l'assaig.

Aquest format es pot realitzar donant-se la hibridació seqüencial o en un pas (veure § 3.2.7.1). A la Figura 4.7 es comparen els assajos realitzats amb hibridació seqüencial (A) i en un pas (B) per a la determinació d'una seqüència de 62 bases del fragment IS200. Tal i com s'observa, la relació de senyals de la seqüència anàlit/adsorció no específica (relació senyal/soroll) és més elevada en el format sandvitx en un pas (S/N de 2.0) que en el seqüencial (S/N de 1.3). En la captura seqüencial, aquests senyals són massa similars, disminuint l'efectivitat en la detecció del DNA anàlit. Això implica que és més favorable una metodologia en la que es dona una hibridació simultània entre la sonda de captura (immobilitzada al GEC), l'anàlit i la sonda marcada amb digoxigenina en comptes de realitzar en passos successius la hibridació de l'anàlit amb la sonda de captura, i posteriorment la hibridació del dúplex preformat al compost amb la sonda marcada amb digoxigenina.

En el cas de realitzar la captura en un pas, la millora de la relació senyal/soroll pot ser deguda a que la hibridació entre l'anàlit i la sonda marcada amb digoxigenina té lloc en solució. Les hibridacions resulten més efectives quan es donen en solució que amb un suport sòlid, ja que les reaccions estan més afavorides [1-3]. En canvi, a la captura

seqüencial, la hibridació de l'anàlit amb la sonda amb digoxigenina té lloc en fase heterogènia líquida/sòlida (solució d'hibridació/superfície de l'elèctrode), de forma que disminueix la efectivitat de les reaccions d'hibridació implicades. Per aquesta raó, i pel fet que el procediment és més simple i ràpid, s'aplicarà el format sandvitx en un pas en les següents seccions.

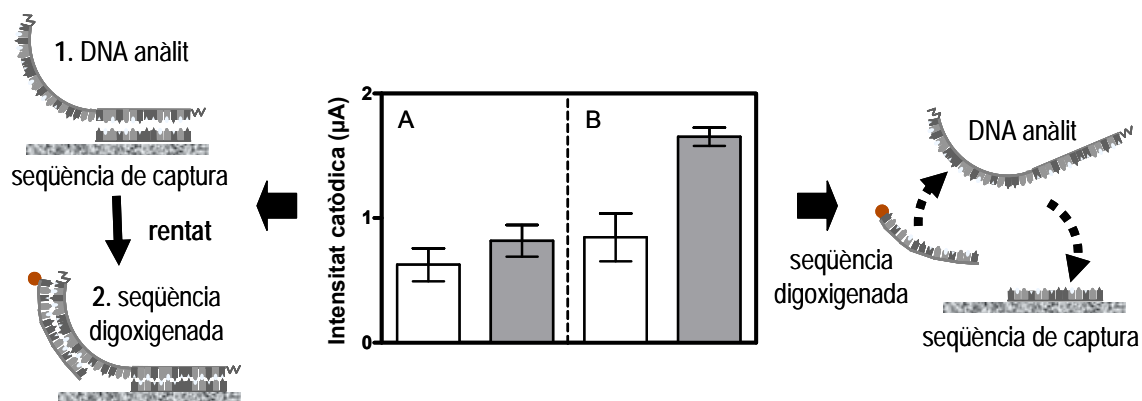


Figura 4.7: Comparació entre format sandvitx seqüencial (A) o en un pas (B) mitjançant elèctrodes GEC. Quantitat de reactius: 30 pmols de sonda de captura, 30 pmols de la seqüència anàlit, 30 pmols de sonda marcada amb digoxigenina i 6 µg d'antiDIG-HRP. Les barres en blanc corresponen a l'assaig realitzat amb tots els reactius excepte el DNA anàlit. Medi: 0.1 M fosfat, 0.1 M KCl, pH 7.0. Mediator: 4.90 mM hidroquinona. Substrat: 1.81 mM H₂O₂. E aplicat= -0.1 V (respecte Ag/AgCl), n= 4. Els resultats es mostren com la mitjana del senyal amb la corresponent desviació estàndard.

4.3.4.2 Estratègia basada en la immobilització de DNA sobre partícules magnètiques emprant magneto elèctrodes m-GEC

El format sandvitx en un pas es realitza immobilitzant la sonda de captura, en aquest cas marcada amb biotina, a partícules magnètiques modificades amb estreptavidina. La incorporació de partícules magnètiques permet realitzar les hibridacions en solució (unió de la seqüència anàlit amb la sonda de captura i la sonda digoxigenada) i posteriorment realitzar la captura de les partícules mitjançant els magneto elèctrodes (veure § 3.2.7.2).

La gran majoria dels problemes analítics genètics requereixen obtenir informació sobre la presència d'una determinada seqüència de DNA, destacant però, que en altres ocasions també es necessària la quantificació de la seqüència en qüestió, com en la quantificació de transcrits (mRNA), que es fa servir per avaluar l'expressió d'un determinat gen o en la quantificació del producte amplificat per PCR. Amb aquest objectiu es va avaluar la resposta amperomètrica dels magneto elèctrodes generada al variar la quantitat d'anàlit.

Tal i com es pot observar a la Figura 4.8 (A) existeix una clar augment de la intensitat generada quan s'addicionen quantitats creixents d'una seqüència de 62 bases del fragment IS200 específic del bacteri *Salmonella*. La figura també mostra dos tipus de blancs, un sense addicionar cap seqüència de DNA i l'altre sense addicionar el DNA anàlit. El primer avalua l'adsorció inespecífica del conjugat enzimàtic antiDIG-HRP sobre les partícules i el segon l'adsorció inespecífica total, sobre les partícules i sobre la sonda marcada amb digoxigenina adsorbida inespecíficament. Els senyals obtinguts per aquests dos tipus de blancs avaluats, són molt baixos i molt semblants entre ells, indicant que hi ha molt poca adsorció i que bàsicament es deguda a l'adsorció inespecífica del conjugat enzimàtic sobre les partícules. Per tant, l'adsorció inespecífica deguda a la sonda marcada amb digoxigenina és gairebé menyspreable. Ampliant el gràfic, tal i com es pot veure a la Figura 4.8 (B) s'observa que les intensitats enregistrades pels blancs no solen variar gaire entre experiments, de forma que l'adsorció inespecífica està molt controlada. Representant les dades respecte la quantitat de DNA anàlit s'obté una representació lineal, en un rang de treball aproximat comprès entre el segon i el vuitè punt del gràfic, que corresponen a 2.1 i 21.5 pmols d'anàlit respectivament, tal i com es pot veure a la Figura 4.8 (C).

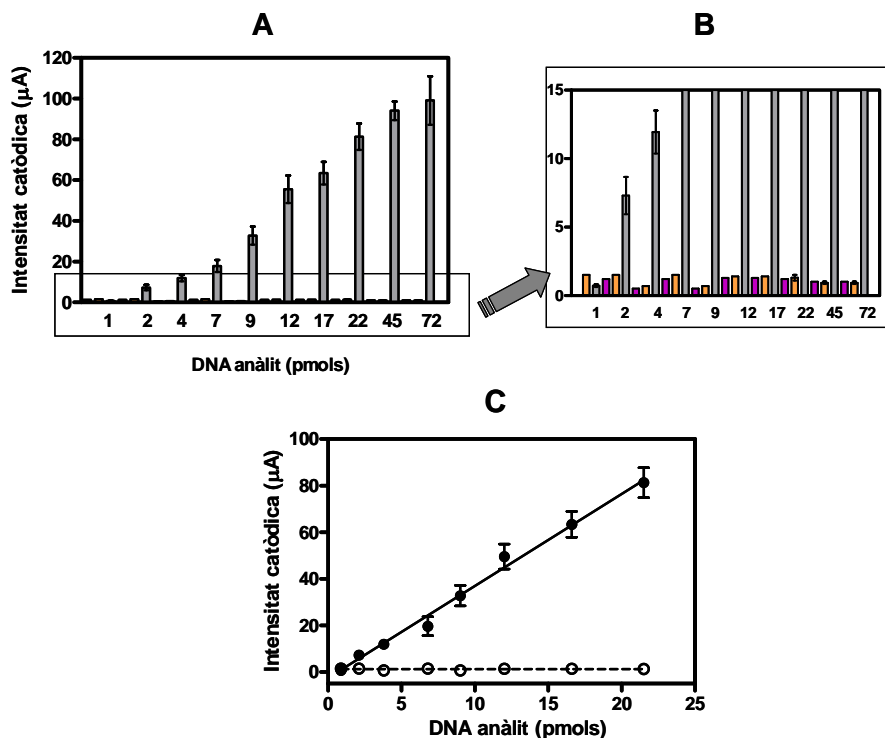


Figura 4.8: (A) Resposta obtinguda amb la variació de DNA anàlit (barra gris). Quantitat de reactius: 4.6×10^5 partícules magnètiques, 200 pmols de sonda de captura biotinilada, 225 pmols de sonda digoxigenada, i 60 µg d'antiDIG-HRP. (B) Ampliació dels senyals obtinguts per a mostrar l'adsorció inespecífica sense addicionar cap seqüència de DNA (barra lila) i sense addicionar el DNA anàlit (barra taronja) (C) Representació lineal. La resta de condicions experimentals idèntiques a les de la Figura 4.7, n= 3.

L'equació que relaciona el senyal obtingut amb la quantitat d'anàlit seria: " $I (\mu A) = 3.9 \cdot x \text{ (pmols DNA anàlit)} - 2.5$ " obtenint una r^2 de 0.982 ($n= 7$ punts). El límit de detecció és de 1.2 pmols de DNA anàlit, calculat per $\bar{I} \text{ màx}, B + 3 s$, on $\bar{I} \text{ màx}, B$ representa la mitjana de les intensitats dels replicats del blanc ($n=30$), i s la desviació estàndard associada.

Cal destacar que el senyal obtingut amb aquests genosensors és notablement superior a les altres estratègies descrites a § 4.3.3 i 4.3.4.1. A la Figura 4.9 es comparen els resultats obtinguts per cada estratègia determinant la mateixa quantitat de DNA anàlit. Tal i com es pot veure, la immobilització del DNA a partícules magnètiques amb captura magnètica (elèctrode m-GEC) i detecció amperomètrica genera senyals molt més elevats que les altres estratègies. La introducció de partícules magnètiques millora el procés d'hibridació, ja que les reaccions estan més afavorides quan es realitzen en solució. Les seqüències de DNA queden unides fortament a les partícules, ja que l'enllaç estreptavidina-biotina és molt estable. En canvi, a l'adsorció directa del material sobre elèctrodes GEC es pot donar la desorció del material biològic. També minimitza l'adsorció inespecífica ja que els passos de rentat esdevenen més efectius, eliminant reactius en excés. Aquest efecte es pot observar a la Figura 4.9 (A), on els blancs obtinguts amb l'elèctrode m-GEC i partícules magnètiques és inferior als obtinguts amb l'adsorció del material sobre els elèctrodes GEC. En aquest cas el senyal del blanc és degut a l'adsorció inespecífica de la sonda marcada amb digoxigenina i el conjugat enzimàtic adsorbit inespecíficament a la superfície de l'elèctrode GEC. L'estratègia basada en la detecció de DNA mitjançant l'oxidació de la base guanina presenta els avantatges de que no requereix marcadors per a detectar el fenomen d'hibridació, reduint la complexitat, el cost i les etapes extres que implica l'ús de marcadors enzimàtics. Aquesta estratègia també es beneficia dels avantatges de fer servir partícules magnètiques (efectivitat dels rentats i millora de les hibridacions) però tal i com es pot veure a la Figura 4.9 (B) el senyal és molt menor que amb la marcació enzimàtica, ja que al fer servir l'enzim peroxidasa, el senyal s'amplifica (més de 20 cops). La lectura directa del DNA proporciona menys sensibilitat que la marcació enzimàtica i té els inconvenients addicionals de que requereix instrumentació associada complexa i un tractament matemàtic per a la obtenció del senyal amb un ordinador i programari adequat. En canvi, la marcació enzimàtica requereix instrumentació més simple i és més sensible, tot i que té l'inconvenient de que es realitzen més passos.

Per tant, queda demostrada l'efectivitat de l'ús de partícules magnètiques, la captació de les partícules amb l'elèctrode m-GEC i la millora del senyal fent servir marcadors

enzimàtics. Per aquesta raó, a les seccions següents es farà servir aquesta metodologia.

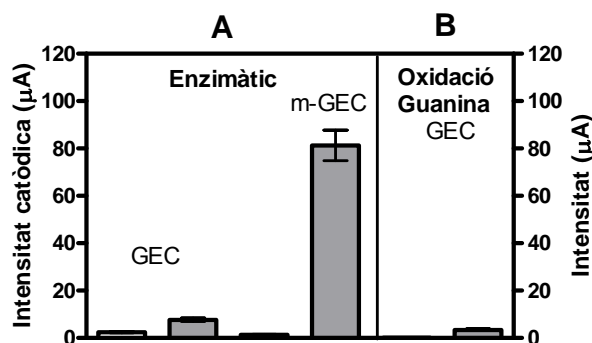


Figura 4.9: Comparació de la detecció de seqüències de *Salmonella* amb marcadors enzimàtics (A) i mitjançant l'activitat intrínseca del DNA (B). **A:** 30 pmols de sonda de captura, 30 pmols de sonda marcada amb digoxigenina (GEC) i 4.6×10^5 partícules magnètiques, 200 pmols de sonda de captura biotilada, 225 pmols de sonda digoxigenada (m-GEC), tant per GEC com m-GEC 60 µg d'antiDIG-HRP. **B:** 70 pmols de sonda amb inosines biotilada. A totes les estratègies s'addicionen 22 pmols de DNA anàlit. Les barres en blanc corresponen a l'assaig realitzat amb tots els reactius excepte el DNA anàlit. Condicions experimentals descrites a les figures 4.4, 4.7 i 4.8.

4.3.4.3 Avaluació de la selectivitat de l'assaig. Discriminació de polimorfismes d'un sol nucleòtid (SNPs)

Un genosensor ha de ser específic i per tant, capaç de discriminar petits canvis en una seqüència de DNA. L'especificitat d'un dispositiu genosensor ve donada per la reacció d'hibridació, que depèn principalment de la temperatura, la naturalesa del solvent i la força iònica emprada [4]. L'especificitat de la estratègia basada en partícules magnètiques amb marcació enzimàtica descrita a § 3.2.7.2 es va avaluar amb l'anàlisi d'una seqüència idèntica al fragment IS200 de 62 bases però amb dues bases nitrogenades diferents, una situada a la regió d'hibridació amb la sonda de captura i l'altra a la regió de la sonda marcada amb digoxigenina.

A la Figura 4.10 (A) es poden observar els resultats obtinguts per a la seqüència totalment complementària i la seqüència amb dues bases diferents. Tal i com es pot veure els resultats obtinguts amb les dues seqüències són molt similars realitzant la hibridació en solució 5xSSC, ja que sota aquestes condicions la hibridació depèn de les interaccions hidrofòbiques entre les bases nitrogenades més que dels ponts d'hidrogen. Amb l'objectiu d'obtenir un anàlisi més selectiu es va modificar la composició de la solució d'hibridació, addicionant un 50 % (v/v) de formamida. La formamida es sol addicionar a la solució d'hibridació ja que actua sobre les interaccions hidrofòbiques entre els parells de bases que estableixen la doble cadena

del DNA [5,6], de forma que fa que només es donin aquelles hibridacions que estan més afavorides pels ponts d'hidrogen, podent discriminar bases nitrogenades que són totalment complementaries de les que no ho són. La selectivitat també es podria millorar elevant la temperatura de l'assaig (68 °C equivalen a addicionar 50 % de formamida), però addicionant formamida es minimitza l'evaporació del solvent a l'incrementar la temperatura.

Tal i com es pot veure a la Figura 4.10 (B), l'addició de formamida fa possible diferenciar el senyal generat per les dues seqüències, és a dir, s'afavoreix la hibridació amb la seqüència que és totalment complementaria respecte la que conté dues bases canviades. També s'observa que quan s'apliquen condicions més exigents que dificulten la hibridació, el senyal disminueix dràsticament. Per tant, en funció de l'objectiu de l'anàlisi, caldrà forçar les condicions per augmentar la selectivitat de l'assaig o bé no addicionar formamida per tal d'incrementar el senyal obtingut.

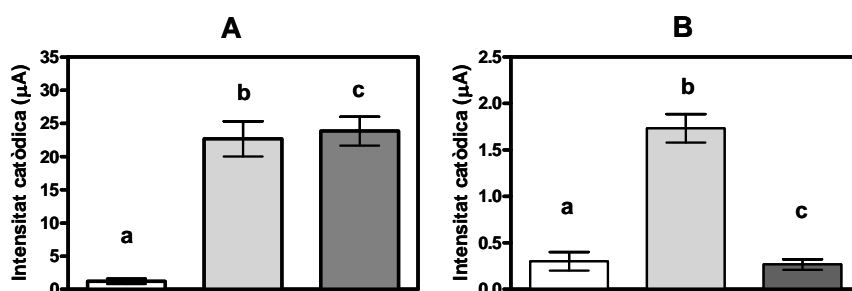


Figura 4.10: Estudi de selectivitat en solució d'hibridació 5xSSC (A) i addicionant un 50% (v/v) de formamida (B). a: sense addicionar el DNA anàlit o interferent, b: 22 pmols seqüència IS200 de 62 bases, c: 22 pmols seqüència interferent. La quantitat de reactius com a la figura 4.8. La resta de condicions com a la figura 4.7. n= 3.

4.3.5 Estratègies electroquímiques basades en l'amplificació del genoma

4.3.5.1 Amplificació del DNA per PCR

L'efectivitat de l'amplificació del fragment IS200 es verifica per electroforesi de gel. Amb aquesta tècnica es comprova si hi ha amplificació (absència d'inhibidors de la PCR, funcionament dels encebadors i de les condicions experimentals) i si la banda obtinguda és única. Introduint un marcador de pes molecular, també es pot determinar el nombre de parell de bases (pb) dels productes amplificats per comparació amb els fragments d'un marcador de pes molecular. Tal i com es pot observar a la Figura 4.11 en l'amplificació del fragment IS200 s'obté una única banda, que coincideix amb la

banda de 200 pb del marcador, que és la longitud aproximada del producte que es pretenia obtenir (201 pb). Per tant, el protocol descrit a § 3.2.8.2 resulta efectiu i els encebadors seleccionats mostren una bona especificitat.

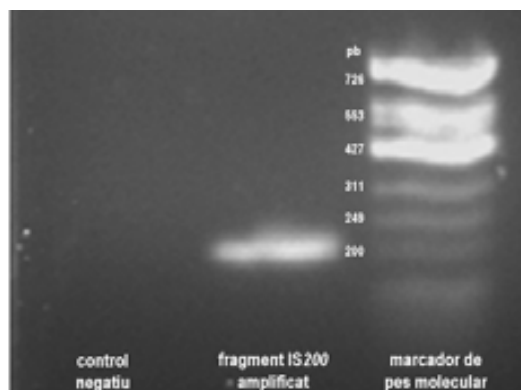


Figura 4.11: Electroforesi del producte d'amplificació del fragment IS200 comparat amb el control negatiu (sense addicionar DNA motllo) i el marcador de pes molecular del fag Φ X174/*Hinfl*.

4.3.5.2 Detecció electroquímica del producte amplificat de *Salmonella*

En l'amplificació del fragment IS200 s'incorporen per primera vegada dos encebadors marcats amb biotina i digoxigenina, amb l'objectiu d'obtenir un producte amplificat doblement marcat als seus extrems. Per tant, en el mateix pas s'amplifica la quantitat de DNA i es marca el producte per tal de simplificar l'estratègia (§ 3.2.8.3). L'amplicó s'immobilitza orientadament sobre les partícules magnètiques mitjançant l'extrem amb biotina i es marca enzimàticament amb el conjugat AntiDIG-HRP mitjançant l'extrem amb digoxigenina. La Figura 4.12 mostra la resposta obtinguda amb diferents dilucions del producte amplificat per PCR simulant cicles de PCR creixents. El gràfic es representa respecte la quantitat de producte amplificat determinat per espectrofotometria a 260 nm. El rang lineal de la determinació va de 2.8 a 75.4 fmols de producte amplificat, amb una sensibilitat de 1.315 μ A/fmol i un coeficient de regressió de 0.980. El senyal obtingut amb el control negatiu de la PCR, que conté tots els reactius menys el DNA motllo, proporciona senyals menyspreables per tot el rang de dilucions.

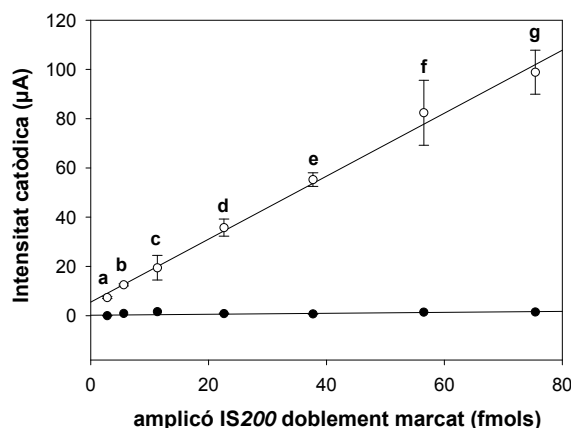


Figura 4.12: Resposta electroquímica del producte amplificat per PCR doblement marcat. El gràfic mostra diferents dilucions del producte amplificat (a: 1/400, b: 1/200, c: 1/100, d: 1/50, e: 1/30, f: 1/20, g: 1/15) juntament amb els controls negatius corresponent a cada dilució (●). Quantitat de reactius: 6.2×10^6 partícules magnètiques i 60 µg antiDIG-HRP. Medi: 0.1 M fosfat, 0.1 M KCl, pH 7.0. Mediator: 4.90 mM hidroquinona. Substrat: 1.81 mM H_2O_2 . E aplicat = -0.1 V (respecte Ag/AgCl), n = 3. Els resultats es mostren com la mitjana del senyal amb la corresponent desviació estàndard.

A la Figura 4.13 es compara la quantitat de fragment IS200 detectat amb aquesta estratègia i amb el format sandvitx d'hibridació descrit a § 3.2.7.2. S'obté un senyal pròxim a 80 µA amb 51.6 fmols de amplicó addicionat respecte 21.5 pmols detectats de seqüència IS200 amb el format sandvitx. El format sandvitx és menys sensible en la detecció de la seqüència IS200 degut a que es realitzen dues hibridacions amb la sonda de captura i la sonda amb digoxigenina, mentre que en la detecció del producte de PCR, l'híbrid ja està format i no es realitza cap hibridació. L'estratègia de detecció directa de l'amplicó proporciona un assaig ràpid (dues etapes: unió partícules i marcatge enzimàtic) i permet detectar quantitats de l'ordre de pocs fmols de fragment IS200. Però cal tenir en compte que la selectivitat de l'estratègia ve proporcionada per l'especificitat de la reacció de PCR en comptes de la reacció d'hibridació amb sondes. Per tant s'ha de tenir molt controlada l'especificitat dels encebadors dissenyats per no amplificar productes secundaris diferents al fragment d'interès. En el cas de no controlar les condicions, la PCR podria amplificar múltiples fragments i caldria un biosensor de DNA d'hibridació per a la detecció del fragment d'interès amb la hibridació amb sondes específiques.

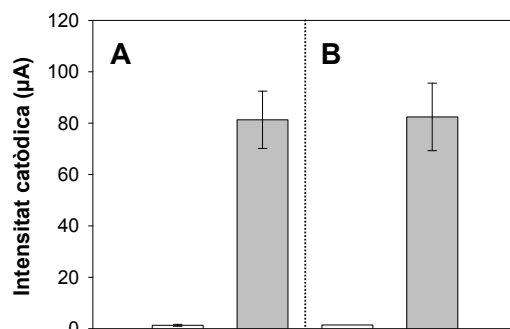


Figura 4.13: Senyals similars generats amb 21.5 pmols de la seqüència IS200 en el format sandvitx (A) i 51.6 fmols del producte de PCR doblement marcat (B). Condicions experimentals descrites a les figures 4.8 i 4.12. n= 3.

4.3.5.3 Detecció electroquímica i confirmació per hibridació del producte amplificat de *Salmonella*

La detecció específica del fragment amplificat per PCR es realitza amb la hibridació amb una sonda de cadena complementària a una regió de l'amplicó. La PCR s'amplifica amb un encebador marcat amb biotina i s'obté un producte amplificat únicament marcat en un extrem per tal d'unir-lo a les partícules magnètiques recobertes d'estreptavidina. El producte amplificat s'escalfa a 95 °C per a separar les dues cadenes del DNA i posteriorment s'hibrida amb una sonda complementària a una regió del IS200 marcada amb digoxigenina (§ 3.2.8.4). A la Figura 4.14 (A) es mostra el senyal electroquímic generat. Es pot observar que l'adsorció inespecífica proporcionada pel control negatiu de la PCR és elevada. Això pot ser degut a un canvi en la conformació de la proteïna estreptavidina de les partícules magnètiques per l'escalfament a 95 °C, provocant interaccions no específiques amb els reactius. Per comprovar aquest fenomen, es van intercanviar els passos seguits, realitzant en primer lloc la desnaturalització seguida de la hibridació amb la sonda amb digoxigenina i finalment la unió amb les partícules. Així s'evita escalfar les partícules magnètiques. Realitzant les etapes en aquest ordre, disminueix l'adsorció inespecífica i millora la relació S/N de 1.36 a 4.00 (Figura 4.14, B). Aquesta estratègia és útil quan el parell d'encebadors de la PCR no només amplifica l'amplicó d'interès analític sinó altres fragments no específics, observant més d'una banda a l'electroforesi de gel. En aquest cas és necessari identificar que el fragment esperat s'ha amplificat. Per tant, es podria fer servir aquesta estratègia per augmentar la selectivitat de l'assaig mitjançant la hibridació amb una segona sonda.

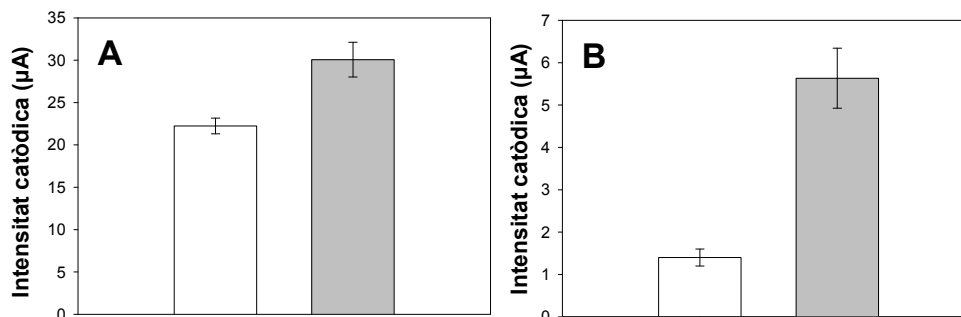


Figura 4.14: Detecció electroquímica específica de l'amplicó marcat amb biotina. Escalfant les partícules magnètiques a l'etapa de desnaturalització (A) i amb l'addició després de la desnaturalització (B). En els dos cassos es mostra l'adsorció inespecífica provinent del control negatiu de la PCR (barres en blanc). Quantitat de reactius: 6.2×10^6 partícules magnètiques, $60 \mu\text{g}$ antiDIG-HRP, 225 pmols sonda marcada amb digoxigenina. La resta de condicions com a la figura 4.12. $n=3$.

4.3.5.4 Detecció electroquímica de l'amplicó de *Salmonella* mitjançant l'amplificació del genoma amb encebadors magnètics

S'ha desenvolupat un nou assaig de PCR que presenta com a novetat l'amplificació per PCR a la superfície de partícules magnètiques. Amb aquest objectiu s'incorporen a la mescla de reacció de la PCR, encebadors magnètics. La Figura 4.15 mostra els resultats obtinguts amb quantitats creixents de partícules magnètiques (encebador magnètic) addicionades a la mescla de PCR. Com es pot observar el senyal augmenta fins a arribar a una zona de saturació en la que l'encebador biotinilat està en excés respecte als altres reactius de la PCR. L'adsorció inespecífica augmenta incrementant el nombre de partícules. Aquest fenomen es pot explicar per la modificació de l'estructura de les partícules a l'augmentar la temperatura tal i com s'ha explicat a la secció anterior. Tot i que l'adsorció inespecífica és elevada, s'observa una clara diferència amb el control positiu i el negatiu (sense addicionar el DNA motllo). Aquest assaig simplifica l'assaig per a la detecció del fragment IS200 i proporciona resultats prometedors per a la detecció directa electroquímica del fragment amplificat.

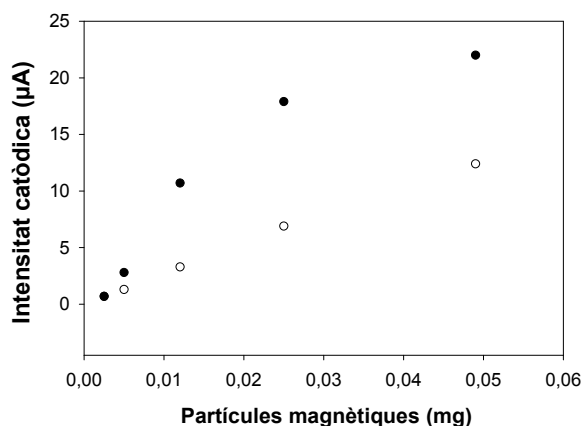


Figura 4.15: Amplificació del fragment IS200 per PCR sobre partícules magnètiques. Els punts en blanc mostren el senyal obtingut amb els controls negatius de la PCR. Condicions experimentals descrites a la figura 4.12.

4.4 GENOSENSORS AMPEROMÈTRICS PER A LA DETECCIÓ D'*ESCHERICHIA COLI*

4.4.1 Optimització del potencial aplicat a magneto elèctrodes (m-GEC) i elèctrodes modificats amb avidina (Av-GEB)

Per voltamperometria cíclica s'ha observat que la incorporació de la proteïna avidina desplaça el potencial de regeneració de la hidroquinona a potencials més negatius, aproximadament -0.175 V respecte -0.050 V per GEC i m-GEC respecte Ag/AgCl (§ 4.2.1). Aquest potencial pot variar amb la immobilització de biomaterial sobre la superfície de l'elèctrode. Amb l'objectiu d'optimitzar el potencial de regeneració de la hidroquinona es modifica la superfície d'elèctrodes m-GEC o Av-GEB amb el conjugat biotina-HRP i es realitza el mesurament per amperometria variant el potencial aplicat. Tal i com es pot observar a la Figura 4.16 el potencial òptim pels dos elèctrodes és de -0.150 V. Per tant, a les següents seccions s'aplicarà aquest potencial per a regenerar el mediador hidroquinona.

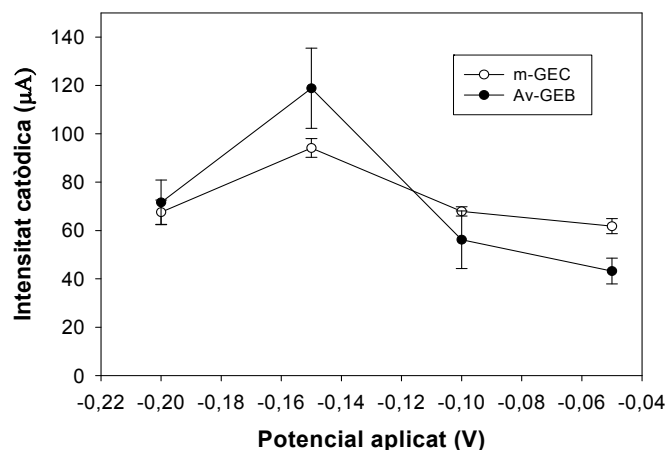


Figura 4.16: Optimització del potencial de regeneració del mediador per elèctrodes m-GEC i Av-GEB. Quantitat de reactius: 6.2×10^6 partícules magnètiques, 0.5 pmols de biotina-HRP (m-GEC) i 20 pmols de biotina-HRP (Av-GEB). Medi: 0.1 M fosfat, 0.1 M KCl, pH 7.0. Mediador: 4.90 mM hidroquinona. Substrat: 1.81 mM H_2O_2 . E aplicat respecte Ag/AgCl. n = 3. Els resultats es mostren com la mitjana del senyal amb la corresponent desviació estàndard.

4.4.2 Caracterització dels elèctrodes per microscòpia de fluorescència

La distribució de la proteïna avidina a la superfície dels biocompòsits construïts es va estudiar per microscòpia làser confocal de fluorescència, mitjançant un marcador fluorescent biotina-fluoresceïna.

A la Figura 4.17 (A) es pot observar una fluorescència intensa (en verd) que correspon als llocs d'unió específica avidina (GEB)/ biotina-fluoresceïna. El control negatiu per a l'avaluació de l'adsorció inespecífica es mostra a la Figura 4.17 (B). Tal i com es pot observar, la unió inespecífica és menyspreable respecte l'específica, demostrant la presència de llocs actius a la superfície del biocompòsit per a la unió amb biotina.

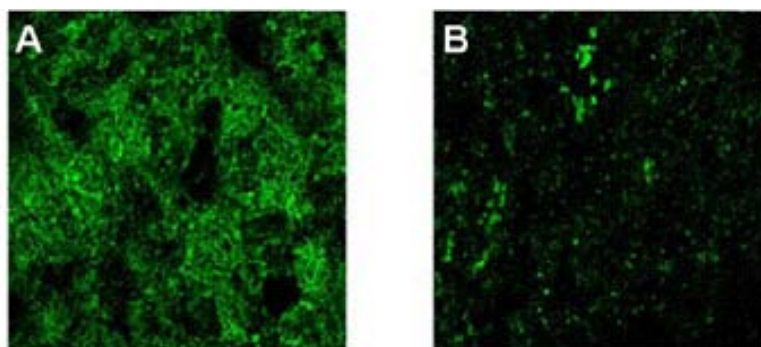


Figura 4.17: Microscopia làser confocal d'elèctrodes Av-GEB modificats amb 80 pmols d'un conjugat biotina-fluoresceïna (A) i el control negatiu amb 80 pmols de fluoresceïna (B). La λ d'excitació del làser és de 568 nm i el voltatge de 352 V.

4.4.3 Selecció de la seqüència del gen *eaeA* i disseny dels encebadors

Es comparen 62 soques d'*Escherichia coli* per tal d'obtenir una seqüència altament conservada del gen *eaeA* i dissenyar un parell d'encebadors específics. A la Figura 4.18 es mostra la seqüència escollida del gen *eaeA* de 469 parells de bases (pb). Les bases marcades amb la lletra "N" mostren una elevada variabilitat entre les seqüències analitzades i per tant són bases que cal evitar en el disseny dels encebadors (*eaeA* up i *eaeA* down). Es preveu que els encebadors dissenyats generin un únic fragment de 112 pb (bases subratllades a la figura).



Figura 4.18: Fragment escollit de 469 pb del gen *eaeA* on es mostra la posició dels encebadors i la seqüència Taqman.

4.4.4 Avaluació de la selectivitat dels encebadors amb PCR a temps real amb el sistema Taqman

Els encebadors seleccionats s'avaluen mitjançant un equip de PCR a temps real amb el sistema Taqman (§ 1.3.1.2) per a l'amplificació de 16 soques incloent *Escherichia coli* patogen, com *E.coli* 0157:H7; *E.coli* no patogen i *Erwinia chrysanthemi*. Els encebadors amplifiquen selectivament el fragment de 112 pb en tots els bacteris d'*E.coli* patogen sense amplificar el DNA inespecífic provinent d'*E.coli* no patògen i *Erwinia chrysanthemi* [7]. A la Figura 4.19 es mostra el gràfic obtingut en l'amplificació d'*E.coli* 0157:H7 amb l'estratègia TaqMan. Les corbes paral·leles corresponen a dilucions seriades 1/10 de 4.5 ng/μl a 0.45 fg/μl de DNA motllo (8 dilucions). Per cada dilució hi ha dos replicats. A l'eix d'ordenades es representa la fluorescència generada per la seqüència Taqman respecte el nombre de cicles d'amplificació de la PCR. El màxim de la segona derivada per a la primera concentració de DNA motllo (a) talla l'eix d'abscisses en un valor de cicle de PCR anomenat cicle de llindar (Ct, de l'anglès

threshold cycle). El valor de Ct indica el cicle a partir del qual el senyal fluorescent generat és superior al senyal llindar (en anglès *threshold*), calculat com 10 cops la desviació estàndard del valor mig del senyal de fons. El llindar es mostra com la línia paral·lela a l'eix d'abscisses que talla el gràfic de l'amplificació al valor de Ct (b). Tal i com es pot observar les corbes d'amplificació es desplacen a la dreta quan la concentració de DNA motllo decreix. Per la primera dilució, 4.5ng/μl, el Ct correspon a 16 cicles. Per les següents dilucions el Ct s'incrementa de 3 a 4 cicles.

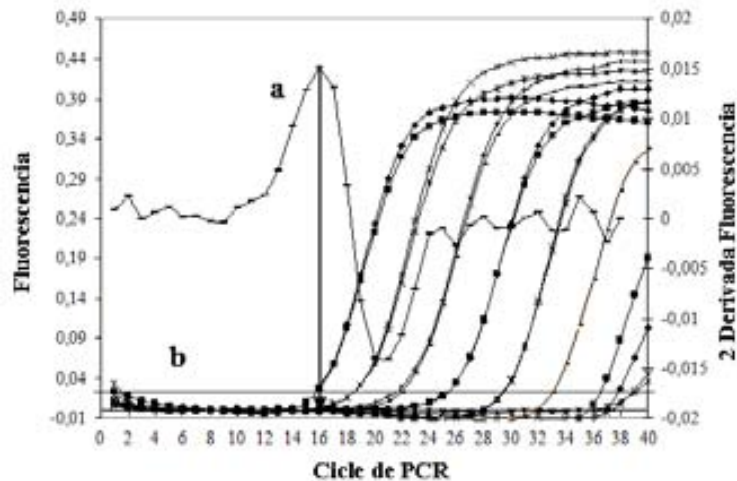


Figura 4.19. Amplificació d'*E.coli* 0157:H7 amb PCR a temps real amb el sistema Taqman. Les corbes paral·leles representen dilucions seriadades 1/10 de 4.5 ng/μl a 0.45 fg/μl de DNA motllo. El màxim de la segona derivada per a la primera concentració talla l'eix d'abscisses determinant el valor de Ct per aquesta concentració (a). També es mostra la línia del senyal llindar (b).

Un cop determinada l'especificitat dels encebadors per a la detecció d'*E.coli* patogen, es fan servir per a la detecció electroquímica del producte amplificat d'*E.coli* 0157:H7, però en aquest cas un d'ells es marca amb biotina i l'altre amb digoxigenina, per tal d'unir l'amplicó resultant a les partícules magnètiques i poder-lo marcar amb el conjugat enzimàtic AntiDIG-HRP.

4.4.5 Sistema electroquímico de PCR quantitativa

4.4.5.1 Amplificació del DNA

L'amplificació del gen *eaeA* d'*E.coli* 0157:H7 es realitza amb els encebadors dissenyats a § 4.4.3 però en aquest cas marcats amb biotina (BIOTINA *eaeA* up) i amb digoxigenina (DIG *eaeA* down) als extrems 5'. La PCR es realitza aturant la reacció d'amplificació a diferents cicles (5, 10, 15, 20, 25 i 30) per a poder mesurar electroquímicament el producte amplificat al llarg del procés. A la Figura 4.20 es

mostra com els encebadors marcats són específics generant una única banda, que coincideix amb la banda de 118 pb del marcador, que és la longitud aproximada del producte que es pretenia obtenir (112 pb). Aquesta banda s'observa a partir de 15 cicles d'amplificació, per 5 i 10 cicles no s'observa cap banda al gel.

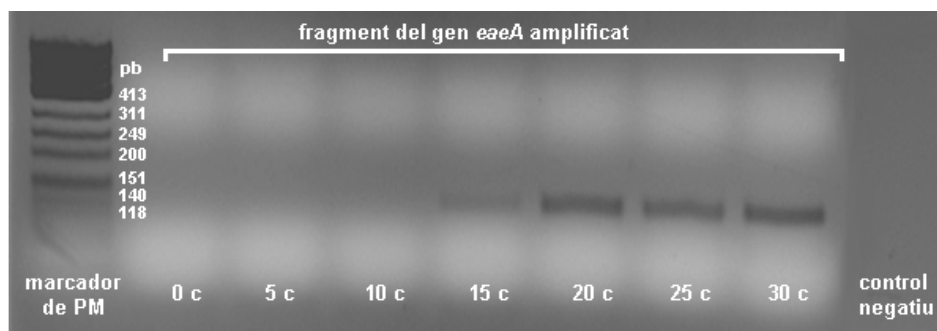


Figura 4.20: Electroforesi del producte d'amplificació del gen *eaeA* parant la PCR a diferents cicles. La concentració del DNA motllo és de 2 ng/ μ l. També es mostra el control negatiu (sense addicionar DNA motllo) i el marcador de pes molecular del fag Φ X174/*Hinfl*.

4.4.5.2 Detecció electroquímica del producte amplificat d'*Escherichia coli* mitjançant m-GEC i Av-GEB

El producte amplificat doblement marcat del gen *eaeA* s'avalua amb els elèctrodes m-GEC i Av-GEB. A la Figura 4.21 es mostren els gràfics obtinguts en la detecció del producte amplificat amb els dos elèctrodes i a diferents cicles d'amplificació. Tal i com es pot observar, el senyal electroquímico proporcionat per les dues estratègies amb m-GEC (A) i Av-GEB (B) augmenta amb el número de cicles fins arribar a un punt en el que el senyal es satura i decreix lleugerament. La disminució del senyal pot ser degut a que el gran nombre de còpies de DNA, unides a les partícules magnètiques o a la superfície activa de l'elèctrode Av-GEB, poden dificultar la transferència electrònica entre l'enzim peroxidasa i l'elèctrode, ja que el mediador soluble està més impedit per arribar al transductor.

Per cada gràfic es calcula el cicle de llindar electroquímico (eCt), que és el primer cicle en el que el senyal electroquímico generat és superior al senyal llindar (en anglès *threshold*), calculat com 10 cops la desviació estàndard del valor mig del senyal de fons. El senyal llindar es mostra als gràfics com la línia discontinua paral·lela a l'eix d'abscisses que talla cada gràfic de l'amplificació al valor d'eCt.

Tal i com es pot observar, després de només 10 cicles (eCt) es pot detectar 2ng/ μ l de DNA motllo inicial per a l'elèctrode m-GEC (A) i 13 cicles per Av-GEB (B). Comparant el sistema electroquímico de PCR quantitativa amb la PCR amb el sistema Taqman (Ct

de 17 cicles) i l'electroforesi de gel (visualització a partir de 15 cicles), els genosensors basats en m-GEC i Av-GEB permeten detectar el producte amplificat en menys cicles d'amplificació. Addicionalment, cal destacar que en el cas de PCR amb el sistema Taqman el volum de reacció és de 20 μl , i en el cas de la detecció electroquímica els volums que es fan servir per a la detecció són més baixos, 2.5 μl per m-GEC i 5 μl per Av-GEB. Respecte les estratègies electroquímiques, els elèctrodes m-GEC detecten el producte amplificat en menys cicles que Av-GEB.

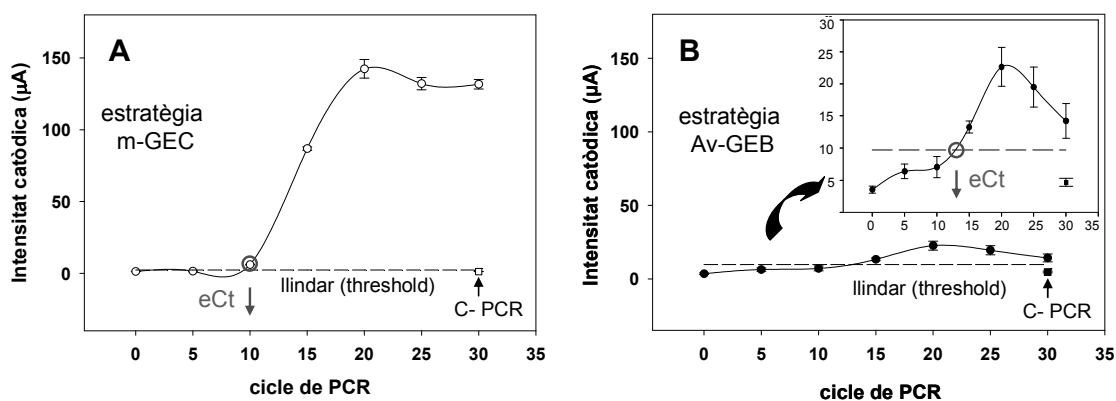


Figura 4.21: Detecció electroquímica de productes de PCR basat en les estratègies amb elèctrodes m-GEC (A) i Av-GEB (B). Quantitat de reactius: 6.2×10^6 partícules magnètiques, 5 ng de DNA motllo original (A) i 10 ng de DNA motllo original (B). En tots els casos es fan servir 60 μg antiDig-HRP. Medi: 0.1 M fosfat, 0.1 M KCl, pH 7.0. Mediador: 4.90 mM hidroquinona. Substrat: 1.81 mM H_2O_2 . E aplicat (respecte Ag/AgCl) = -0.15 V. n = 3. Els resultats es mostren com la mitjana del senyal amb la corresponent desviació estàndard.

El límit de detecció de les dues estratègies s'avalua aturant la PCR a diferents cicles d'amplificació (10, 15 i 20 cicles) fent servir dilucions seriades 1/10 de DNA motllo de 4.5 ng/ μl a 4.5 fg/ μl . A les dues estratègies es van analitzar 5 μl del producte amplificat resultant. La resposta electroquímica es mostra a la Figura 4.22. Com es pot veure el senyal augmenta amb concentracions creixents de DNA motllo. En el cas de l'estratègia m-GEC, s'obtenen límits de detecció de 0.45 ng/ μl , 4.5 pg/ μl i 0.45 pg/ μl per 10, 15 i 20 cicles. Per l'estratègia d'Av-GEB els límits de detecció són de 4.5 ng/ μl , 0.45 ng/ μl i 4.5 pg/ μl per 10, 15 i 20 cicles. Com indicaven els resultats de la Figura 4.21 l'estratègia m-GEC permet detectar concentracions més baixes de producte amplificat.

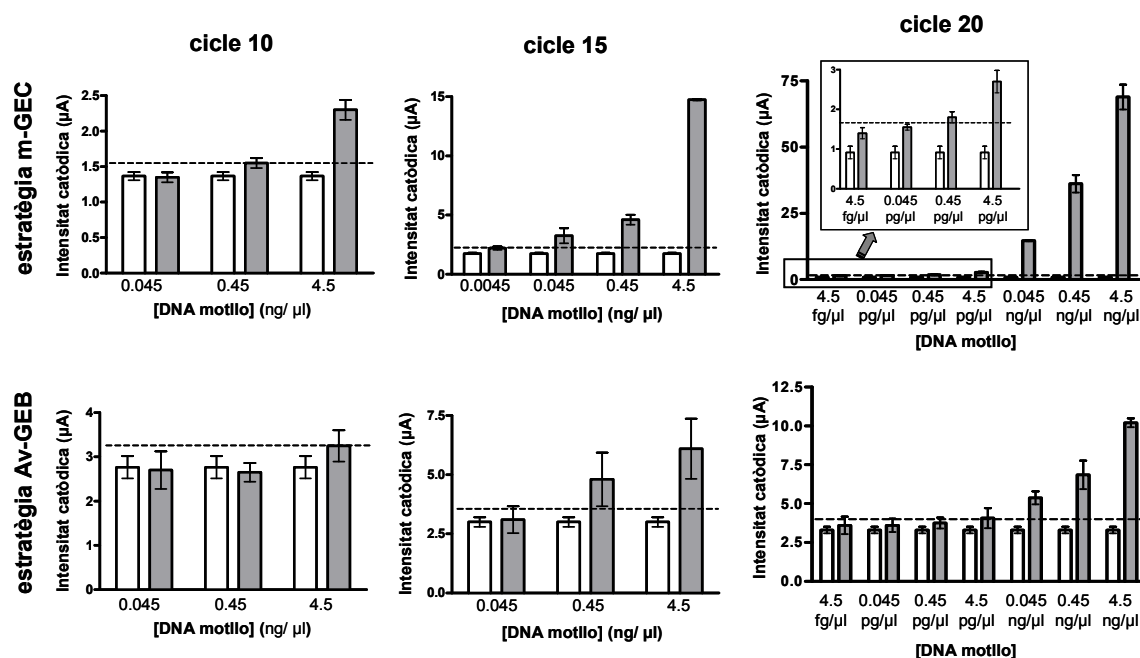


Figura 4.22: Avaluació del LD de les estratègies amb elèctrodes m-GEC i Av-GEB. Es mostra el control negatiu de la PCR (barres en blanc), les concentracions d'amplicó avaluades (barres en gris) i el LD (línia discontinua). Les condicions experimentals com a la figura 4.21. n=3.

Aquests resultats indiquen que els elèctrodes Av-GEB permeten la immobilització superficial de l'amplicó per l'extrem biotinitat, però que l'eficiència de dita immobilització millora al fer servir partícules magnètiques, generant senyals més grans. L'ús de partícules magnètiques també fa disminuir l'adsorció inespecífica de reactius en comparació amb els controls negatius obtinguts amb l'estratègia d'Av-GEB. Per tant, tornen a ser evidents els avantatges de dissenyar estratègies amb la incorporació de partícules magnètiques.

Per l'estratègia basada en partícules magnètiques i m-GEC amb 20 cicles d'amplificació s'aconsegueixen detectar 0.45 pg de DNA original, que equivalen aproximadament a 7×10^3 CFU d'*E.coli*. Tot i que els límits de detecció obtinguts milloren respecte la PCR a temps real i l'electroforesi de gel, no arriben a proporcionar els valors requerits per les agències de seguretat alimentària (absència en 25 g d'aliment), per lo que es podrien fer servir procediments curts de preenriquiment de la mostra per amplificar el nombre de cèl·lules a nivells detectables.

4.5 MAGNETO IMMUNOSENSOR AMPEROMÈTRIC PER A LA DETERMINACIÓ D'ÀCID FÒLIC EN LLET

4.5.1 Optimització de l'immunoassaig

Per tal de dissenyar una estratègia electroquímica amb partícules magnètiques per a la detecció d'àcid fòlic en llet enriquida, s'optimitza el format immunològic amb un assaig ELISA òptic. S'escull un format competitiu ja que l'àcid fòlic és una molècula de pes molecular baix i es difícil trobar dos anticossos capaços d'interaccionar amb epítops diferents de l'antigen. L'assaig competitiu es pot realitzar amb un format competitiu directe o indirecte. Les dues configuracions s'avaluen amb l'ELISA amb detecció òptica realitzant les incubacions en plaques de poliestirè (§ 3.4.6) per a determinar quin proporciona millors resultats en la determinació d'àcid fòlic. Tot i que el format competitiu directe compren una sola etapa (competència del traçador enzimàtic i l'àcid fòlic per l'anticòs específic) el valor de IC50 que s'obté és més elevat que pel format indirecte (Figura 4.23). Els valors de RSD obtinguts són molt baixos, per la concentració IC50 és del 1% pel format directe i del 2% pel format indirecte.

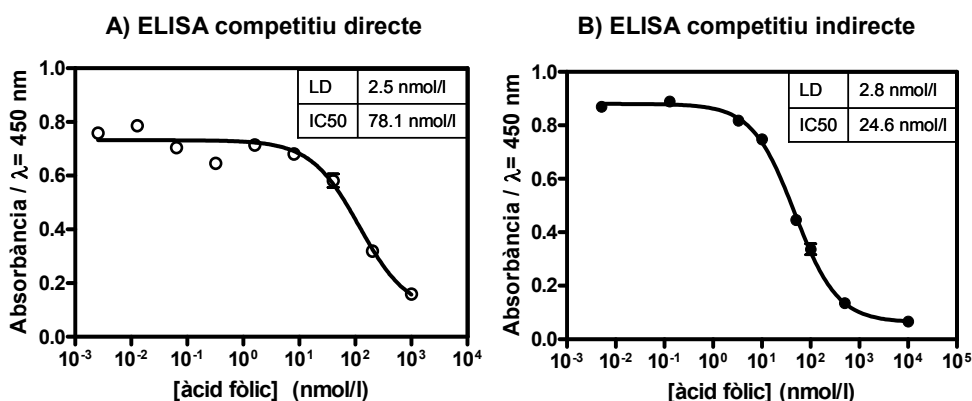


Figura 4.23: Comparació dels gràfics obtinguts amb els formats d'ELISA competitius directe (A) i indirecte (B). Concentració de reactius: 0.2 µg/ml anticòs primari i 0.03 µg/ml AF-HRP (A); 0.035 µg/ml BSA-AF, 1/64000 anticòs primari i 1/6000 AntilgG-HRP (B). n=3. Els resultats es mostren com la mitjana del senyal amb la corresponent desviació estàndard.

Com que el format indirecte presenta millor competència s'escull aquest format i s'optimitzen diferents paràmetres experimentals de l'assaig, com l'efecte de pre-incubació dels reactius (àcid fòlic amb l'anticòs específic), el temps d'incubació a l'etapa de competència i la composició de la solució de l'etapa de competència (concentració Tween 20, força iònica i el pH). Els resultats de l'optimització es mostren al material suplementari de la publicació Lermo et al. (VIII). Aquests resultats indiquen que la millor relació Absorbància màx/IC50 s'obté sense fer pre-incubació, amb 30 min

de temps d'incubació a l'etapa de competència i fent servir la solució PBSTC a l'etapa de competència (10 mM fosfat, 0.14 M NaCl, 0.01 % (v/v) Tween 20, pH 7.5).

4.5.2 Efecte matriu de la llet i Magneto-ELISA

L'efecte matriu de la llet s'avalua amb l'ELISA optimitzat a § 4.5.1, comparant la corba obtinguda en PBSTC i la realitzada en llet. Tal i com es pot observar a la Figura 4.24, quan es realitza l'assaig competitiu en llet hi ha un efecte matriu important. Aquest efecte no s'aconsegueix reduir diluint la mostra o centrifugant-la a 35 °C (A, B). En canvi, en el cas de precipitar les proteïnes de la llet amb el tampó de Mcllvaine, s'aconsegueix reduir bona part de l'efecte matriu de la mostra (C). Malgrat que el tampó de Mcllvaine simplifica la matriu, quan aquest s'avalua amb llets que contenen concentració coneguda d'àcid fòlic s'obtenen valors de recuperació molt baixos (5 %), per tant aquest pretractament resulta incompatible amb la detecció de l'àcid fòlic.

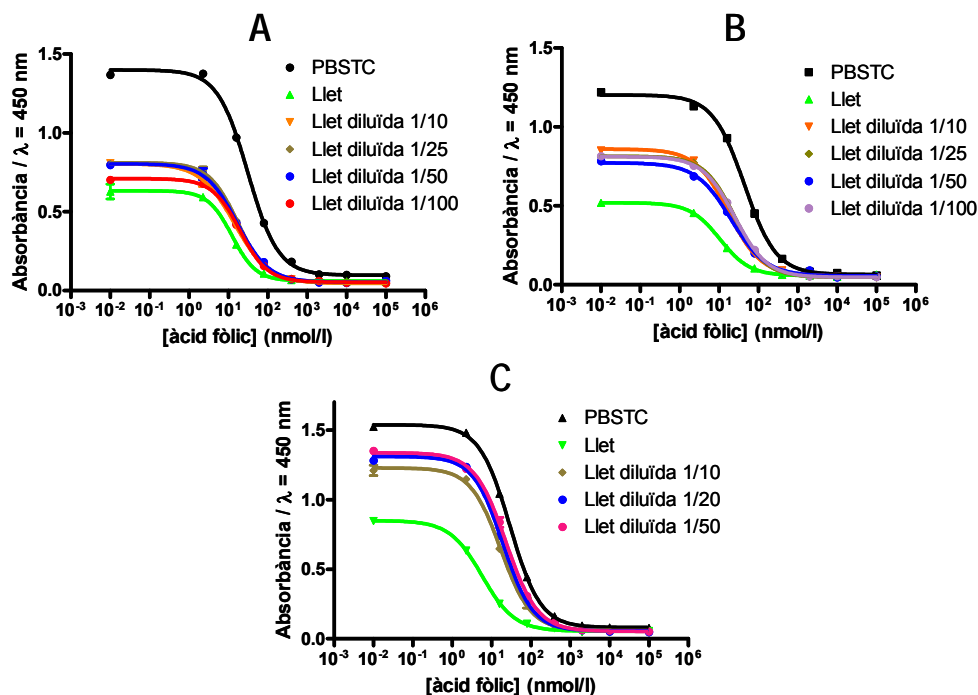


Figura 4.24: Comparació de diferents tractament per a l'eliminació de l'efecte matriu de la llet amb dilució (A), centrifugació a 35 °C (B), i addició de tampó de Mcllvaine (C). Les condicions experimentals com a la figura 4.23 B. n=3.

Les partícules magnètiques poden millorar la immobilització dels bioreactius, l'eficiència de les reaccions biològiques i la minimització d'adsorcions inespecífiques tal i com es va veure a § 4.3.4.2 i 4.4.5.2. Per tant, es decideix incorporar partícules magnètiques a l'assaig ELISA en el format indirecte optimitzat a § 4.5.1. Es fan servir

partícules magnètiques recobertes de grups tosil i es modifiquen amb el conjugat BSA-AF. La modificació es realitza segons el protocol descrit al material suplementari de la publicació Lermo et al. (VIII). L'eficiència de la unió s'avalua realitzant un test de Bradford i s'obté que el percentatge de conjugat unit és del 60 %.

El magneto-ELISA descrit a § 3.4.8 es realitza en una corba d'àcid fòlic preparada en PBSTC i en llet diluïda deu cops. Com es mostra a la Figura 4.25 (A), l'efecte matriu es minimitza amb l'ús de partícules magnètiques però tot i així el senyal decreix quan l'etapa de competència es realitza en llet (diluïda deu cops) respecte la corba en PBSTC. Es decideix realitzar la corba en una solució de llet referència en comptes de fer servir PBST. La solució de llet referència es prepara mesclant tres llets comercials desnatades i diluint-la 10 cops. La Figura 4.25 (B) mostra l'assaig realitzat amb llet de referència i el compara amb les corbes obtingudes amb les tres llets comercials. Tot i que no es pot eliminar l'efecte matriu, totes les corbes presenten un comportament molt similar. Per tant, els següents assajos es realitzaran en solució de llet de referència.

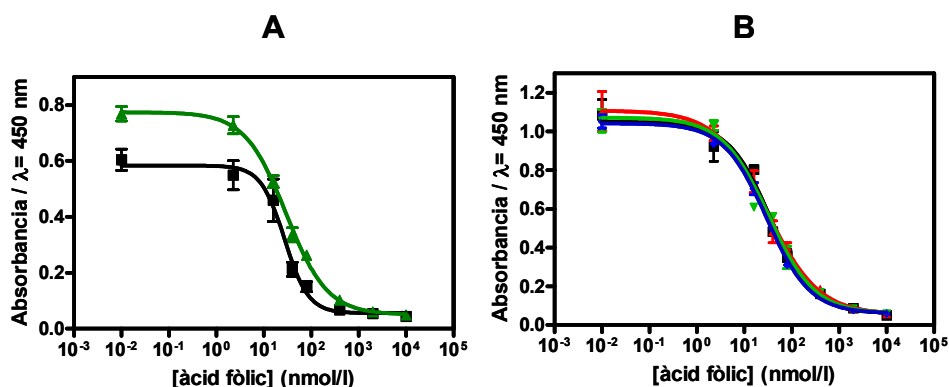


Figura 4.25: Immunoassaig basat en el magneto-ELISA competitiu indirecte per la determinació d'àcid fòlic. A: Resultats obtinguts en PBSTC (▲) i solució de llet referència (■). B: Resultats obtinguts en solució de referència i tres llets comercials desnatades, totes diluïdes 1/10 en PBSTC. Concentració de reactius: 0.050 mg/ml partícules magnètiques i 1/32000 anticòs primari (A); 0.075 mg/ml partícules magnètiques i 1/16000 anticòs primari (B). En tots els casos 1/6000 AntilgG-HRP. n=3

4.5.3 Magneto immunoassaig electroquímic

L'assaig competitiu indirecte amb partícules magnètiques es va mesurar electroquímicament amb els magneto elèctrodes tal i com es descriu a § 3.4.9. A la Figura 4.26 es comparen les corbes de competència obtingudes amb el magneto-ELISA òptic (A) i l'immunoassaig magnètic electroquímic (B) realitzats en llet referència diluïda 1/10. L'assaig electroquímic proporciona una bona resposta (IC50 de 46.6 nM i LD de 13.1 nM) i amb valors comparables respecte l'assaig òptic (IC50 de 36.3 nM i

LD 4.2 nM). El valor de RSD per la concentració IC50 és del 2% per l'assaig electroquímic i del 3% per l'òptic. El rang lineal obtingut per l'assaig electroquímic va de 21.1 a 129.3 nM i és suficient per a la detecció d'àcid fòlic en llets comercials enriquides, ja que la concentració d'àcid fòlic en aquestes mostres és propera a 680 nM (300 ppb).

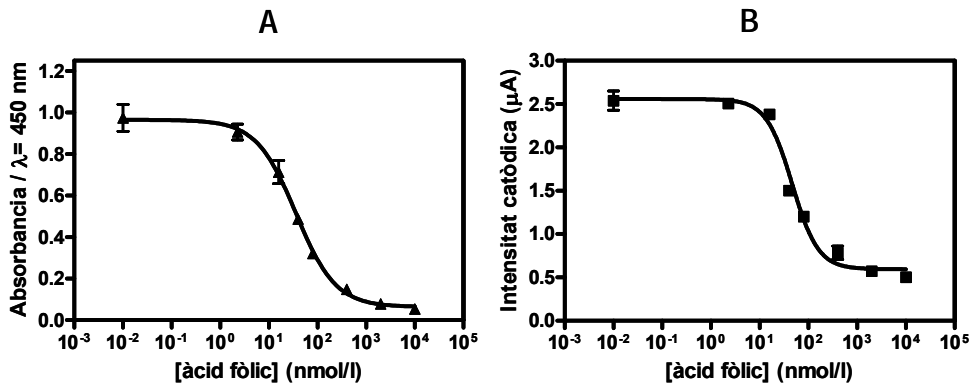


Figura 4.26: Comparació de les corbes obtingudes amb els formats competitius indirectes basat en el magneto-ELISA òptic (A) i el magneto immunoassaig electroquímic (B) en llet de referència. Concentració de reactius: 0.075 mg/ml partícules magnètiques i 1/16000 anticòs primari (A); 0.1 mg/ml partícules magnètiques i 1/16000 anticòs primari (B). En tots els casos 1/6000 AntilgG-HRP. Medi: 0.1 M fosfat, 0.1 M KCl, pH 7.0. Mediador: 4.90 mM hidroquinona. Substrat: 1.81 mM H₂O₂. E aplicat (respecte Ag/AgCl)= -0.15 V. n=3.

4.5.4 Determinació d'àcid fòlic en mostres cegues i llet enriquida

S'analitzen mostres cegues d'àcid fòlic i llets enriquides amb el magneto-ELISA i el magneto immunoassaig electroquímic. Les mostres cegues simulen llets enriquides amb diferent concentració d'àcid fòlic. La Taula 4.1 mostra els valors de % de recuperació d'àcid fòlic per les dues estratègies (la recuperació és la relació entre la concentració mesurada i la real). Aquests valors s'obtenen a partir de les corbes obtingudes en llet referència diluïda 1/10. Els valors obtinguts indiquen una bona correlació amb els valors reals de concentració a tot el rang de concentracions avaluat, destacant valors de recuperació pròxims al 100 % per a la concentració de 500 nM (220 ppb) en les dues estratègies. Per concentracions superiors es subestima el valor real de concentració.

Taula 4.1: Estudi d'exactitud en mostres cegues pel magneto-ELISA i el magneto immunoassaig electroquímic.

Magneto-ELISA Mostres cegues, diluïdes 1/10 amb tampó PBST_C		
Concentració real (nM)	Concentració trobada(nM)	Recuperació (%)
160	164	103
250	221	88
500	501	100
1250	1103	88
2500	1497	60

Magneto immunoassaig electroquímic Mostres cegues, diluïdes 1/10 amb tampó PBST_C		
Concentració real (nM)	Concentració trobada(nM)	Recuperació (%)
200	224	112
500	475	95
1200	1009	81
2500	1810	72

A la Taula 4.2 es mostren els valors obtinguts per dues llets comercials enriquides que contenen 300 ppb d'àcid fòlic (valor de l'etiqueta). Les dues estratègies proporcionen valors molt propers al valor etiquetat, tot i que els valors obtinguts són lleugerament superiors. Aquest fet podria ser degut a que sovint s'addiciona més concentració d'àcid fòlic a les llets enriquides per assegurar que el producte no proporciona menys concentració que la indicada a l'etiqueta, ja que es produeix una pèrdua de part de l'àcid fòlic addicionat durant el procés d'escalfament de la llet [8,10,11].

Taula 4.2: Determinació d'àcid fòlic en llets comercials enriquides mitjançant el magneto-ELISA i el magneto immunoassaig electroquímic.

Llets comercials enriquides	Concentració etiquetada (ppb)	Concentració trobada	
		Magneto ELISA (ppb)	Estratègia electroquímica (ppb)
LLET ENRIQUIDA N° 1	300	333	321
LLET ENRIQUIDA N° 2	300	511	380

El magneto immunoassaig electroquímic desenvolupat es podria fer servir com a mètode ràpid de detecció d'àcid fòlic en aliments enriquits, per tal de controlar que el contingut d'àcid fòlic correspon al marcat a l'etiqueta del producte. El centre de control de malalties i prevenció dels Estats Units (CDC, de l'anglès *Center for Disease Control and Prevention*) recomana una dosi diària d'àcid fòlic de 400 µg per dia [8], especialment indicat en dones embarassades i infants; mentre que l'Institut de Medicina dels Estats Units (IOM, de l'anglès *Institute of Medicine*) estableix el valor

límit en 1000 µg per dia [9]. Valors superiors podrien intervenir emmascarant malalties com l'anèmia o interferir en teràpies anticonvulsives o del tractament del càncer. Aquests efectes secundaris tenen importància majoritàriament en gent gran [10].

4.6 BIBLIOGRAFIA

- [1] Ghosh, S.S., Musso, G.F. Covalent attachment of oligonucleotides to solid supports. *Nucleic Acids Research*, 12 (1987) 5353-5372.
- [2] Kremsky, J.N., Wooters, J.L., Dougherty, J.P., Meyers, R. E., Collins, M., Brown, E. L. Immobilization of DNA via oligonucleotides containing an aldehyde or carboxylic acid Group at the 5' terminus. *Nucleic Acids Research*, 15 (1987) 2891-2909.
- [3] Van Ness, J., Kalbfleisch, S., Petne, C.R., Reed, M.W., Tabone, J.C., Vermeulen, N.M.J. A versatile solid support system for oligodeoxynucleotide probe-based hybridization assays. *Nucleic Acids Research*, 19 (1991) 3345-3350.
- [4] Pividori, M.I. Nuevos genosensores amperométricos. Diseño y construcción. Tesis doctoral. Bellaterra, Universitat Autònoma de Barcelona, 2002.
- [5] Meinkoth, J., Wahl, G. Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Analytical Biochemistry*, 138 (1984) 267-284.
- [6] Kricka, L.J. *Nonisotopic DNA probe techniques*, 1992. Academic Press, San Diego.
- [7] Zacco, E. Diseño de nuevos materiales de afinidad universal. Aplicación en sensores. Tesis doctoral. Bellaterra, Universitat Autònoma de Barcelona (2006).
- [8] Prieto, P.,S., Grande, C.B., Falcón, S.G., Gándara, J.S. Screening for folic acid content in vitamin-fortified beverages. *Food control*, 17 (2006) 900-904.
- [9] Mulligan, J.E., Greene, G. W., Caldwell, M. Sources of folate and serum folate levels in older adults. *Journal of the American Dietetic Association*, 107 (2007) 495-499.
- [10] Sweeney, M. R., McPartlin, J., Weir, D.G., Scott, J.M. Measurements of sub-nanomolar concentrations of unmetabolised folic acid in serum. *Journal of Chromatography B*, 788 (2003) 187-191.
- [11] Gao, Y., Guo, F., Gokavi, S., Chow, A., Sheng, Q., Guo, M. Quantification of water-soluble vitamins in milk-based infant formulae using biosensor-based assays. *Food Chemistry*, 110 (2008) 769-776.

5. CONCLUSIONS GENERALS

5 CONCLUSIONS GENERALS

Diferents agències de control alimentari, tant de la Unió Europea com de la resta del món, han establert programes preventius que recullen la necessitat del desenvolupament i implementació de sistemes de control dirigits cap a la millora de la seguretat i la qualitat dels aliments, tenint en compte totes les etapes que intervenen en la producció d'un aliment, des de la matèria prima fins que arriba al consumidor final. Per aconseguir el compliment d'aquests programes preventius, s'ha establert com a prioritat el desenvolupament de mètodes de detecció, anàlisi i diagnòstic que siguin ràpids, sensibles i automatitzats per un ampli espectre d'agents que amenacen la salut humana. Els biosensors es presenten com els millors candidats per aconseguir aquest nou repte. La necessitat d'anàlisis de diferents components a temps real en àrees cada vegada més diverses, ha promogut en aquests darrers anys que els esforços realitzats en el desenvolupament d'instrumentació analítica es dirigeixin cap a la construcció de dispositius que siguin d'ús simple i de baix cost, tal com són els biosensors. Els biosensors constitueixen un camp multidisciplinari de I+D i un mercat molt atractiu. Originàriament la investigació en aquest camp provenia principalment del sector clínic i biomèdic, però actualment els biosensors no són patrimoni exclusiu de la investigació biomèdica. La indústria alimentària demanda mètodes ràpids per a estimar la identitat, la caducitat, la deterioració o la contaminació dels aliments. A la indústria en general, i a l'alimentària en particular, li és necessari controlar de manera fidel paràmetres analítics en matrius molt complexes.

En aquest context, al present treball s'han abordat tres aspectes crítics dels dispositius biosensors que convergeixen cap a la simplificació metodològica: la immobilització orientada del biomaterial, la marcadó i la transducció del senyal analític.

Aprofitant les característiques electroquímiques millorades del material compòsit de grafit-epoxi, altament emprat al nostre grup d'investigació, s'han construït nous transductors amperomètrics modificats biològicament amb la proteïna avidina (Av-GEB). Els elèctrodes Av-GEB constitueixen una plataforma universal per a la immobilització orientada de material biològic i biorreceptors biotinilats. Els elèctrodes

Av-GEB construïts han mostrat un comportament electroquímic similar als compòsits de grafit-epoxi (GEC) i s'ha obtingut una bona reproductibilitat entre elèctrodes preparats amb un mateix lot de compòsit. La utilitat d'aquest material s'ha demostrat per a la immobilització de material biològic biotinitat, com productes de PCR marcats. A més, s'han desenvolupat uns nous transductors amb característiques magnètiques i electroquímiques (elèctrodes m-GEC). Els elèctrodes m-GEC permeten el desenvolupament de nous protocols de detecció electroquímica de biomolècules basats en partícules magnètiques, amb els que s'aconsegueix la millora de la sensibilitat i la recuperació d'analits en mostres complexes, així com la simplificació metodològica. Els elèctrodes m-GEC construïts també han mostrat un comportament electroquímic similar als compòsits de grafit-epoxi (GEC) i s'ha obtingut una bona reproductibilitat entre elèctrodes preparats amb un mateix lot de compòsit. Mitjançant aquests transductors, m-GEC i l'ús de partícules magnètiques, s'han desenvolupat diferents estratègies per a la detecció de seqüències sintètiques de DNA provinent de bacteris patògens alimentaris de rellevància, fent servir com a model el bacteri *Salmonella*, basades en la detecció mitjançant l'activitat intrínseca del DNA (sense marcador) i amb marcadors enzimàtics. La detecció directa de seqüències de DNA, amb la immobilització de sondes de captura a partícules magnètiques, és una estratègia simple que ha mostrat una bona especificitat realitzant l'assaig amb seqüències no complementaries. Aquesta estratègia és més ràpida respecte la detecció amb marcadors enzimàtics, ja que simplifica l'assaig al no requerir el pas addicional de marcatge amb l'enzim. En canvi, presenta els inconvenients de ser menys sensible, requerir instrumentació associada complexa i tractament matemàtic per a la obtenció del senyal amb un ordinador i programari adequat. La detecció directa, tot i presentar els inconvenients esmentats, és una estratègia ràpida, de procediment simple i específic, que es podria fer servir en el cas que la quantitat de DNA no fos un factor limitant. L'estratègia amb marcadors enzimàtics amplifica, degut a l'activitat de l'enzim, el senyal obtingut i requereix instrumentació més simple. Aquesta estratègia es realitza en un format sandvitx, en el que la seqüència anàlit es detecta simultàniament amb dues sondes. Aquest format és més selectiu que la hibridació de l'anàlit amb una sonda, i no requereix el marcatge de la seqüència anàlit. El format sandvitx ha mostrat ser més efectiu realitzant la hibridació de les sondes i la seqüència anàlit en un sol pas, i addicionalment té l'avantatge de ser més ràpid que la hibridació seqüencial. La incorporació de partícules magnètiques a l'assaig permet la immobilització de la sonda per un extrem sense la necessitat d'adsorbir-la en el compòsit de grafit-epoxi. Així, la sonda està més orientada pel reconeixement de la seqüència anàlit i s'evita la desorció del material biològic. Addicionalment les partícules

magnètiques simplifiquen l'assaig, redueixen les adsorcions inespecífiques i permeten la determinació en matrius alimentàries complexes. El material biològic es capta amb els magneto elèctrodes construïts, introduint els elèctrodes dins de la solució que conté les partícules, simplificant el procés mitjançant la integració d'etapes analítiques. La detecció de seqüències sintètiques amb partícules magnètiques i marcació enzimàtica ha proporcionat un límit de detecció de 1.2 pmols i ha demostrat una bona selectivitat per a la detecció de polimorfismes d'un sol nucleòtid en condicions estrictes d'hibridació.

En moltes ocasions la quantitat de DNA de la mostra d'interès està per sota del límit de detecció del dispositiu i no es pot realitzar la detecció directa amb genosensors d'hibridació, tal com és el cas de la detecció de bacteris patògens en els aliments, en els que s'ha de garantir l'absència en 25 grams de mostra. En aquestes situacions és necessària l'amplificació del material genètic mitjançant la tècnica d'amplificació sintètica per PCR. La detecció amb partícules magnètiques i marcació enzimàtica s'ha acoblat a la tècnica de PCR per a la detecció del fragment IS200 de *Salmonella*, obtenint un assaig ràpid i molt sensible que permet la detecció de quantitats ínfimes de DNA amplificat de l'ordre de fmols. Per aconseguir l'amplificació específica del producte de PCR cal fer servir encebadors específics del producte amplificat. La selectivitat d'aquest assaig ve proporcionada per tant per l'especificitat del parell d'encebadors. En el cas que la PCR doni lloc a productes amplificats no específics (diferents al DNA original) es podria millorar la selectivitat d'aquesta estratègia amb la incorporació d'una sonda d'hibridació únicament complementària al fragment específic amplificat. En aquest context i per tal d'aconseguir la simplificació metodològica i la integració de procediments, s'ha dissenyat un sistema d'amplificació per PCR fent servir encebadors marcats amb biotina i digoxigenina. En aquest procediment s'aconsegueix al mateix temps l'amplificació del material genètic i la marcació del producte amplificat, incrementant la sensibilitat de l'assaig i la immobilització orientada del producte amplificat en el transductor electroquímic. També s'ha desenvolupat una nova estratègia d'amplificació de PCR basada en encebadors magnètics, en la que l'amplificació té lloc directament a la superfície de les partícules magnètiques. Aquesta estratègia simplifica el protocol de detecció del producte amplificat per PCR, i podria ser emprat per a la detecció en continu de la mostra amplificada amb un sistema de detecció electroquímic acoblat a l'equip de PCR.

Els biocompòsits modificats amb la proteïna avidina (Av-GEB) presenten característiques electroquímiques millorades amb l'avantatge de que el propi transductor actua com a reservori de biomolècules. La superfície del biosensor es renova fàcilment i es resolen alguns dels problemes més importants en el disseny de

biosensors, com l'estabilitat de l'element de bioreconeixement i la renovació del material biològic. Aquests elèctrodes juntament amb els magneto elèctrodes s'han fet servir per a la detecció de productes d'amplificació de PCR del gen *eaeA* dels bacteris *Escherichia coli* patogen. Les dues estratègies han permès la detecció del producte amplificat en menys cicles de PCR que la tècnica habitual de detecció basada en gels d'electroforesi. En comparació amb la tècnica d'amplificació i detecció per fluorescència dels productes de PCR a temps real amb sistema de sonda Taqman, els genosensors són capaços de detectar seqüències de DNA a menys cicles d'amplificació i a més resulten menys costosos i complexos. Els elèctrodes Av-GEB permeten la detecció de 4.5 ng/ μ l de DNA original a la mostra amb tan sols 10 cicles d'amplificació, i els m-GEC són encara més sensibles detectant 0.45 ng/ μ l de DNA pel mateix nombre de cicles, observant per aquests últims menys adsorcions inespecífiques. Aquestes estratègies acoblades a la PCR proporcionen una anàlisi ràpida (4 hores) respecte altres metodologies tradicionals basades en el cultiu microbiològic (de 3 a 5 dies). Malgrat que els límits de detecció del procediment de PCR amb doble marcació i amb detecció electroquímica milloren respecte altres procediments, no arriben a garantir l'absència de bacteris patògens en 25 g de mostra, per lo que caldria acoblar-los a procediments curts de preenriquiment de la mostra o a procediments d'immunoseparació magnètica dels bacteris patògens. En el darrer cas a més de preconcentrar els bacteris patògens de mostres complexes, es pot eliminar possibles inhibidors de la PCR i evitar l'ús de procediments d'extracció de DNA, normalment complexos i amb baix rendiment.

A l'últim bloc de la present tesi s'ha desenvolupat un magneto immunoassaig electroquímico per a la detecció d'additius alimentaris, fent servir l'àcid fòlic com a model. Com a estratègia general, l'hapté, en aquest cas l'àcid fòlic, s'ha aconseguit immobilitzar a partícules magnètiques recobertes de grups químics tosils, formant un enllaç covalent amb la molècula de naturalesa haptènica i orientant-la cap al medi de reacció per aconseguir una competència millorada amb l'analit de la mostra. El format competitiu (directe o indirecte) s'ha optimitzat amb un sistema ELISA amb detecció òptica, proporcionant millors paràmetres el format competitiu indirecte (immobilització del conjugat BSA-àcid fòlic). Mitjançant la modificació de les partícules magnètiques i l'estratègia de detecció basada en elèctrodes m-GEC, s'ha aconseguit quantificar l'àcid fòlic en mostres cegues de llet enriquida, obtenint valors de recuperació propers al 100%. També s'ha aconseguit quantificar el contingut d'àcid fòlic en mostres reals de llet enriquida, obtenint valors molt propers als indicats a la composició dels productes. L'efecte matriu de la mostra s'ha resolt realitzant la corba de competència en llet de referència diluïda 10 cops. Els avantatges proporcionats per les partícules

magnètiques i la sensibilitat electroquímica del transductor grafit-epoxi es combinen per a l'obtenció d'un dispositiu sensible per a l'anàlisi immunològica de mostres complexes, capaç de ser acoblat en sistemes d'anàlisi en continu. Els immunosensors desenvolupats permeten una anàlisi més ràpida que el mètode tradicional de detecció d'àcid fòlic basat en cultius microbiològics i és menys complexa que les tècniques clàssiques instrumentals com l'HPLC.

Els nous genosensors i immunosensors electroquímics desenvolupats presenten característiques millorades per a la seva aplicació al camp de la seguretat alimentària. Aquests dispositius presenten els avantatges de ser ràpids, econòmics, robustos i sensibles, es poden construir en diferents configuracions i són fàcils de fer servir, sent viable la seva implementació en *kits* per a l'anàlisi descentralitzat. Deguda a la orientació del element de biorreconeixement s'han afavorit les reaccions biològiques en els transductors. També es poden aplicar en diverses situacions analítiques, immobilitzant el receptor biològic adient al biocompòsit d'afinitat universal o a les partícules magnètiques, en camps d'anàlisi tan variats com la medicina, la biotecnologia, la biologia molecular, mesures mediambientals, i tal i com s'ha avaluat en aquesta tesi, a la indústria alimentària per a l'anàlisi ràpid, tant quantitatiu com qualitatiu, als punts crítics de control de la cadena de producció.

PUBLICACIONES

Genomagnetic assay based on label-free electrochemical detection using magneto-composite electrodes

Sensors and Actuators B, 114 (2006) 591-598

Arzum Erdem, M. Isabel Pividori, Anabel Lermo, Alessandra Bonanni, Manel del Valle, Salvador Alegret

Genomagnetic assay based on label-free electrochemical detection using magneto-composite electrodes

Arzum Erdem^{a,b,*}, M. Isabel Pividori^c, Anabel Lermo^b, Alessandra Bonanni^b,
Manel del Valle^b, Salvador Alegret^{b,**}

^a Ege University, Faculty of Pharmacy, Analytical Chemistry Department, 35100 Bornova, Izmir, Turkey

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

^c Department of Analytical Chemistry, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Catalonia, Spain

Received 10 March 2005; received in revised form 16 May 2005; accepted 23 May 2005

Available online 10 August 2005

Abstract

A very sensitive genomagnetic assay based on a label-free electrochemical detection of the DNA target by using graphite-epoxy composite (GEC) and magneto-GEC electrodes as electrochemical transducers has been developed.

The assay is based on the capture of DNA target on streptavidin magnetic beads by its hybridization with biotinylated inosine-substituted probe and its electrochemical detection achieved by the measurement of the signal coming from the guanine oxidation of the DNA target.

The genomagnetic assay involves the following steps: the immobilization of biotinylated inosine-substituted capture probe onto streptavidin coated magnetic beads following by hybridization with its target DNA or in the presence of non-complementary (NC) DNA. Two different genomagnetic strategies have been developed for the selective electrochemical detection of DNA target. Firstly, an alkaline treatment was performed in order to dissociate DNA hybrids from the magnetic beads, followed by the voltammetric measurement of guanine oxidation signal using GEC electrode as an electrochemical transducer. In order to simplify the genomagnetic procedure, in the second strategy the magnetic separation was directly achieved by using a novel magneto-electrochemical transducer based on GEC electrode containing a small magnet (m-GEC).

The genomagnetic assay based on label-free electrochemical detection was developed for the specific detection of a sequence related with *Salmonella* spp. with a target concentration of 20 µg/mL in 20 min of hybridization time. The main features related with these genomagnetic assays, such as detection limit and the reproducibility, are discussed and compared with other genomagnetic assays.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Magnetic beads; DNA hybridization; Graphite-epoxy composite; Magneto-GEC electrode; Guanine oxidation signal; *Salmonella* spp

1. Introduction

The development of novel and sensitive assays for DNA hybridization and detection has become an increasingly important research field [1]. The design and fabrication of DNA-modified surfaces and materials which are

reproducible, stable and selective to complementary DNA sequences are crucial in the development of emerging analytical tools, such as DNA chips or simple diagnostic devices, for detecting few DNA sequences, such as electrochemical genosensors [2–6]. These devices have been extensively used for the fast, cost-effective and simple diagnosis of inherited or infectious diseases [7–10] but also for the early determination of infectious agents in various environments [9]. These devices can be exploited for monitoring the sequence-specific hybridization event directly [10–12] or by electrochemical DNA indicators, such as metal coordination complexes, which are able to bind with the nitrogenous bases of DNA

* Corresponding author. Tel.: +90 232 388 0110x5131; fax: +90 232 388 5258.

** Corresponding author. Tel.: +34 93 581 2118; fax: +34 93 581 2379.

E-mail addresses: erdema@pharm.ege.edu.tr (A. Erdem), Salvador.Alegret@uab.es (S. Alegret).

[13–18]. The use of inosine-modified probes and the appearance of guanine signal upon hybridization with the target have opened a new range of analytical possibilities in electrochemical genosensing. This strategy eliminated the external labels and shortened the assay time. The chemical mechanism of the oxidation of guanine was reported in detail [19]. Guanine showed an enhanced reactivity over the other four physiological bases, including reactions with one-electron oxidants. This fact is apparent in the one-electron potentials, which are 1.34 V (against the normal hydrogen electrode) for guanosine, 1.79 V for adenosine and much higher for the pyrimidines [19].

Lately, this strategy has been extensively used for development of DNA sensor technology because of the advantages coming from the label-free DNA detection.

Recent advances in the development of new materials have brought unique opportunities to other sub disciplines, such as chemistry or molecular biology [20–25]. One of the most promising materials, which have been developed, is biologically modified-magnetic beads [26] based on the concept of magnetic bioseparations. The biomaterial, specific cells, proteins or DNA, can be selectively bound to the magnetic beads and then separated from its biological matrix by using a magnetic field [27]. The magnetic beads are commercially available with a wide variety of surface functional groups or biological molecules, material properties and sizes [27]. They can bring novel capabilities to bioaffinity assays and sensors [28,29].

Bioanalysis has benefited from the use of magnetic beads in electrochemical immunosensors [30] or fluorescence DNA hybridization approaches [31]. The magnetic beads have been also used in novel electrochemical genosensing protocols [32,33]. These approaches using magnetic beads for detection of DNA hybridization have been combined with different strategies for the electrochemical detection [34–44], such as label-free genosensing [34,37,44] or different external labels, such as enzymes [35,38], electrochemical indicators [36] or metal tags, e.g. gold or silver nanoparticles [39–41] and using different electrochemical techniques, such as differential pulse voltammetry (DPV), potentiometric stripping analysis (PSA) or square wave voltammetry (SWV). Rigid conducting graphite-polymer composites and biocomposites have been extensively used in our laboratories for electrochemical biosensing [45,46]. In addition to ease of preparation, GECs present numerous advantages over other traditional carbon-based materials: higher sensitivity, robustness and rigidity [46]. The ideal transducing properties of graphite-epoxy composites (GECs) [47] and biocomposites (GEB) [48] has been demonstrated for electrochemical genosensing based on enzyme labeling. Moreover, GEC has an uneven surface where DNA can be adsorbed using simple adsorption procedures avoiding the use of procedures based on previous activation/modification of the surface transducer and subsequent immobilization, which are tedious, expensive and time-consuming without any loss in sensitivity or selectivity [49]. The mechanical properties of GEC permit the design of

genosensors in different configurations and the regeneration of the surface by a simple polishing procedure.

Additionally, the utility of GEC as a transducer for label-free hybridization genosensing has been illustrated for the specific detection of a sequence related with *Salmonella* spp. [12,50–52]. Traditional cultural procedures for isolating and identifying *Salmonella* spp. in foods require 3–4 days to provide presumptive results and an additional 1–2 days for further biochemical confirmation. Accelerated *Salmonella* spp. detection procedures would allow the food industry to reduce warehousing costs and permit increased testing of both food ingredients and final products. Insertion sequence IS200 is a transposable element of some 700 bp [50], being present in more than 90% of the pathogenic or food poisoning isolates of *Salmonella* spp. [51,52]. IS200 has been used as a suitable sequence to identify isolates of *Salmonella* with relatively high accuracy [53–56].

In a previous study [12], we performed an electrochemical approach using GEC electrodes for the detection of the specific sequence related with *Salmonella* spp. by using the oxidation signal of guanine without any modifications in the native bases or any external labeling as first time in the literature.

In this study, a novel label-free genomagnetic assay for the electrochemical detection of a specific sequence for *Salmonella* spp. has been presented. This sensitive genomagnetic assay is based on a label-free electrochemical detection of the DNA target by using graphite-epoxy composite and magneto-GEC (m-GEC) electrodes as electrochemical transducers. The assay is performed by the capture and hybridization of DNA target with a biotinylated inosine-substituted probe onto streptavidin-coated magnetic beads and the electrochemical detection based on the signal coming from guanine oxidation of DNA target. The sensitive label-free detection by using GEC or m-GEC electrode as electrochemical transducers is combined with the efficient magnetic separation for improving selectivity in this assay as the first time. The features of these assays are discussed with the advantages and disadvantages in comparison with other genomagnetic assays and with the state-of-the-art.

2. Experimental

2.1. Apparatus

Electrochemical measurements were performed by using differential pulse voltammetry technique with an AUTO-LAB PGSTAT 30 electrochemical analysis system (Eco Chemie, The Netherlands). A three-electrode set-up was used comprising a platinum auxiliary electrode (Crison 52-67 1, Spain), a double junction Ag/AgCl reference electrode (Orion 900200) with 0.1 M KCl as the external reference solution and as a working electrode, GEC and m-GEC electrodes. All potentials were referred against Ag/AgCl reference electrode.

The magnetic separation was performed using a magnetic separator Dynal MPC-S (product no.120.20, Dynal Biotech ASA, Norway).

A scanning electron microscope (SEM) (Hitachi S-570, Tokyo, Japan) is used to evaluate the distribution of the magnetic beads on the electrode surface.

2.2. Chemicals

The synthetic oligonucleotides (the target and its complementary and non-complementary probes) were purchased from TIB-MOLBIOL (Berlin, Germany). Their base sequences are:

Biotinylated inosine-substituted probe (23-mer): 5'-biotin-CCT ACT ICC CTA CIC TTC TCT CC-3';

IS200 target (IS200 23; 23-mer): 5'-GGA GAG AAG CGT AGG GCA GTA GG-3';

IS200 target (IS200 56; 56-mer):5'-GA GAG AAG CGT AGG GCA GTA GGC AGC ATA TTA AGA AAA TTG TGT GAA TGG AAA AA-3';

Non-complementary, NC-1 (23-mer): 5'-AAC TCG ACA CAC TCA TCT TCG GC-3';

Non-complementary, NC-2 (62-mer): 5'-CAC ACC CGA TGG AAC TGT AAA TAT CAC ATA GTT TTC GCG CCC AAA TAC CGA AGA CAA GCG TT-3'.

All DNA stock solutions (100 mg/L) were prepared with sterilized and deionized water and kept frozen. Other all chemicals were in analytical reagent grade and they were supplied from Sigma and Merck. Proactive streptavidin coated beads (Dynalbeads M-280 Streptavidin Prod. No. 112.06) were purchased from Dynal Biotech ASA (Oslo, Norway). All stock solutions and buffer solutions, such as (i) NCB (75 mM sodium citrate buffer solution (pH 7.0) containing 750 mM NaCl) (ii) ABS (0.2 M sodium acetate buffer solution (pH 4.8) containing 20 mM NaCl), (iii) PBS (50 mM phosphate buffer solution (pH 7.4) containing 20 mM NaCl), (iv) TTL (100 mM Tris-HCl (pH 8.0) 0.1% Tween 20, 1 M LiCl) and (v) TT (250 mM Tris-HCl (pH 8.0) and 0.1% Tween 20) were prepared using deionized and autoclaved water.

2.2.1. Construction of GEC and m-GEC electrodes

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 an electrical contact. For preparation of m-GEC electrode, a small cylindrical magnet (3 mm diameter) was placed into the center of this electrode after the addition of a thin layer of composite paste in order to avoid the direct contact between the magnet and the electrical connector. After filling the electrode body gap completely with the soft paste, the electrode was tightly packed. Both kind of electrodes (GEC and m-GEC) made with the composite material were cured at 40 °C for 1 week [12] in order to obtain a rigid composite. Before each use, the surface of both the GEC and m-GEC electrodes

were wetted with double distilled water, and then thoroughly smoothed with abrasive paper and then with alumina paper (polishing strips 301044-001, Orion). In all cases, both transducers, GEC and m-GEC, were anodized at +1.20 V for 1 min in PBS as a pretreatment step.

Before the development of the genomagnetic assay, the effect of different solutions containing 23-mer bases target sequences and the optimum temperature for the adsorption step were studied based on guanine and adenine oxidation signals. For this purpose, 60 µg/mL of IS200 23 sequence was used as following the same procedure reported in previously work published by Erdem et al. [12]. The oxidation signals of guanine and adenine were measured by DPV in ABS by scanning from +0.30 V to +1.20 V at the pulse amplitude of 100 mV and the scan rate of 15 mV/s.

2.2.2. Microscopic characterization of m-GEC modified with magnetic beads by scanning electron microscopy

The SEM technique was used to evaluate the distribution of magnetic beads in different concentrations on the surface of m-GEC. The purpose of this study was to evaluate the optimum amount of magnetic beads in order to obtain a monolayer on m-GEC for ensuring the contact of DNA on the surface of electrochemical transducer.

For this purpose, different solutions of magnetic beads were prepared, and 20 µL of each solution was put on the surface of the electrodes. The surfaces of the m-GECs were previously polished and pre-treated with ultrasound for 1 min. The same acceleration voltage (10 kV) but different resolutions (10, 50 and 100 µm) were used in all cases.

2.2.3. DNA probe immobilization and DNA target hybridization on the magnetic beads

The preparation of the probe-modified magnetic beads was based on a previously reported procedure [34] using for every separation or washing steps using a magnetic separator in order to separate the magnetic beads efficiently from the solution, but with the following modifications: 50 µg of streptavidin-coated magnetic beads was transferred into a 1.5 mL centrifuge tube. The magnetic beads were washed with 90 µL TTL buffer and resuspended in 21 µL TTL buffer. Five microgram of biotinylated probe was added and incubated for 15 min at room temperature with gentle mixing. The immobilized probe was then separated and washed twice with 90 µL TT buffer, resuspended in 50 µL hybridization solution (NCB buffer) containing different amounts of IS200 target and non-complementary (NC) DNA sequences. The hybridization reaction was carried out for 20 min at room temperature.

2.2.4. Genomagnetic strategy and electrochemical detection of DNA hybridization using GEC electrode

The beads containing DNA hybrids were then washed twice with 90 µL NCB and resuspended in 25 µL of 0.05 M NaOH solution for the alkaline treatment during 5 min. After the alkaline treatment step, 25 µL of the resulted solution

was transferred into the vial containing 125 μL NCB. The vial was mixed for 1 min. Dry-adsorption on GEC transducer was performed under static conditions with the electrodes at upright position after addition of 20 μL solution containing DNA on the anodized GEC surface of the electrode. The dry-adsorption of DNA was allowed to proceed until dryness, during 45 min at 80 °C.

After adsorption, the GEC electrode was dipped into ABS for 5 s. Then, the electrode was transferred into the electrochemical cell for voltammetric transduction.

2.2.5. Genomagnetic strategy and electrochemical detection of DNA hybridization using m-GEC electrode

When m-GEC electrode was used as electrochemical transducer, the alkaline treatment step is eliminated from the genomagnetic assay. Instead of the alkaline treatment, 20 μL of NCB was added into the vial containing oligomer or hybrid surface-modified beads. The beads were washed twice by using 90 μL NCB. The vial was mixed for 1 min and the hybridized beads conjugates were then washed twice with 90 μL NCB. After the final washing step, the magnetic beads inside the vial were captured by dipping the anodized m-GEC electrode. Immediately the beads take their way straight to the surface of the previously anodized m-GEC electrode due to the presence of the magnet inside of the composite. Dry-adsorption was then performed during 45 min at 80 °C, as previously described for GEC transducer. After 45 min, m-GEC electrode was dipped into ABS for 5 s. Then, the electrode was transferred into the electrochemical cell for voltammetric transduction.

2.2.6. Voltammetric transduction

The oxidation signal of guanine was measured by DPV in ABS by scanning from +0.30 V to +1.20 V at a pulse amplitude of 100 mV and the scan rate of 15 mV/s.

3. Results and discussion

In this study, a genomagnetic assay for the label-free electrochemical detection of a DNA sequence related with *Salmonella* spp. was developed by using GEC or m-GEC electrodes as electrochemical transducer in a target concentration of 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in 20 min of hybridization time.

The overall performance of this genomagnetic assay was strongly dependent on the experimental variables, which affect the hybridization efficiency, such as probe and target concentration, the amount of streptavidin coated magnetic beads and the hybridization time. The influence of these experimental parameters was also studied to obtain an optimum analytical performance [12,34].

SEM images have been used to provide qualitative information about the distribution of different amount of magnetic beads on m-GEC surface.

Fig. 1 shows comparatively the SEM images of m-GEC with different amount (4.5×10^5 , 9.1×10^5 , 1.8×10^4 ,

3.6×10^4 , 7.3×10^3 and 1.5×10^3) of magnetic beads. As can be seen, a number of magnetic beads between the range of 1.8×10^5 and 9.1×10^5 of magnetic beads are close to the value of a monolayer. However, aggregates of magnetic particles can be observed. Lower amount of magnetic beads could produce worse sensitivities for the electrochemical detection of DNA. On the other hand, higher amounts of magnetic beads are not useful, since they are not in close contact with the electrochemical transducer in order to obtain an electrochemical signal related with the immobilized DNA on magnetic beads.

In comparison to previously reported results using GEC electrodes without magnetic separation [12], other experimental conditions using GEC and m-GEC electrodes were also optimized here in order to obtain the optimum buffer solution for adsorption and the optimum temperature. Two different procedures for adsorption (wet- and dry-adsorption) were performed: (i) dry-adsorption and (ii) wet-adsorption, at 80 and 42 °C, respectively. While dry-adsorption relies on leaving DNA to dry on the GEC or m-GEC surface, wet-adsorption relies on leaving DNA to interact with the carbonaceous surface through physical forces in the presence of water.

The optimal buffer composition for the wet-adsorption at 42 °C on GEC was firstly optimized by using three different media: (i) deionized and autoclaved water, (ii) ABS and (iii) PBS were used as buffers containing 23-mer bases target sequence at 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration level. Wet-adsorption at 42 °C with the electrodes was then performed by adding 20 μL of DNA solution prepared in different buffer composition onto the GEC electrodes at upright position. The most reproducible results related to guanine and adenine oxidation signals were obtained with PBS following by wet-adsorption at 42 °C (results not shown).

In order to optimize the experimental conditions for dry-adsorption at 80 °C, the hybridization buffer study was performed by using m-GEC and comparing the results obtained with PBS and those obtained with NCB. Guanine and adenine signals were found as 2.3 and 3.4 μA in the presence of PBS buffer; and 4.2 and 7.0 μA in the presence of NCB, respectively. Due to the higher sensitivity and more reproducible results obtained with NCB, the optimum buffer was chosen as NCB for dry-adsorption step in DNA hybridization on the magnetic beads.

After the wet-adsorption at 42 °C and the dry-adsorption at 80 °C of 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration level of IS200 23 DNA target in NCB onto m-GEC electrode, the guanine and adenine oxidation signals were also obtained sensitively. Guanine and adenine signals were found as 2.5 and 10.0 μA at 42 °C; and 4.0 and 7.4 μA at 80 °C, respectively. Due to the higher sensitivity with dry-adsorption at 80 °C by using NCB, it was chosen as the optimum conditions and used for further experiments.

The reported genomagnetic assay involves these following steps: (1) the immobilization of biotinylated inosine substituted capture probe onto streptavidin coated magnetic

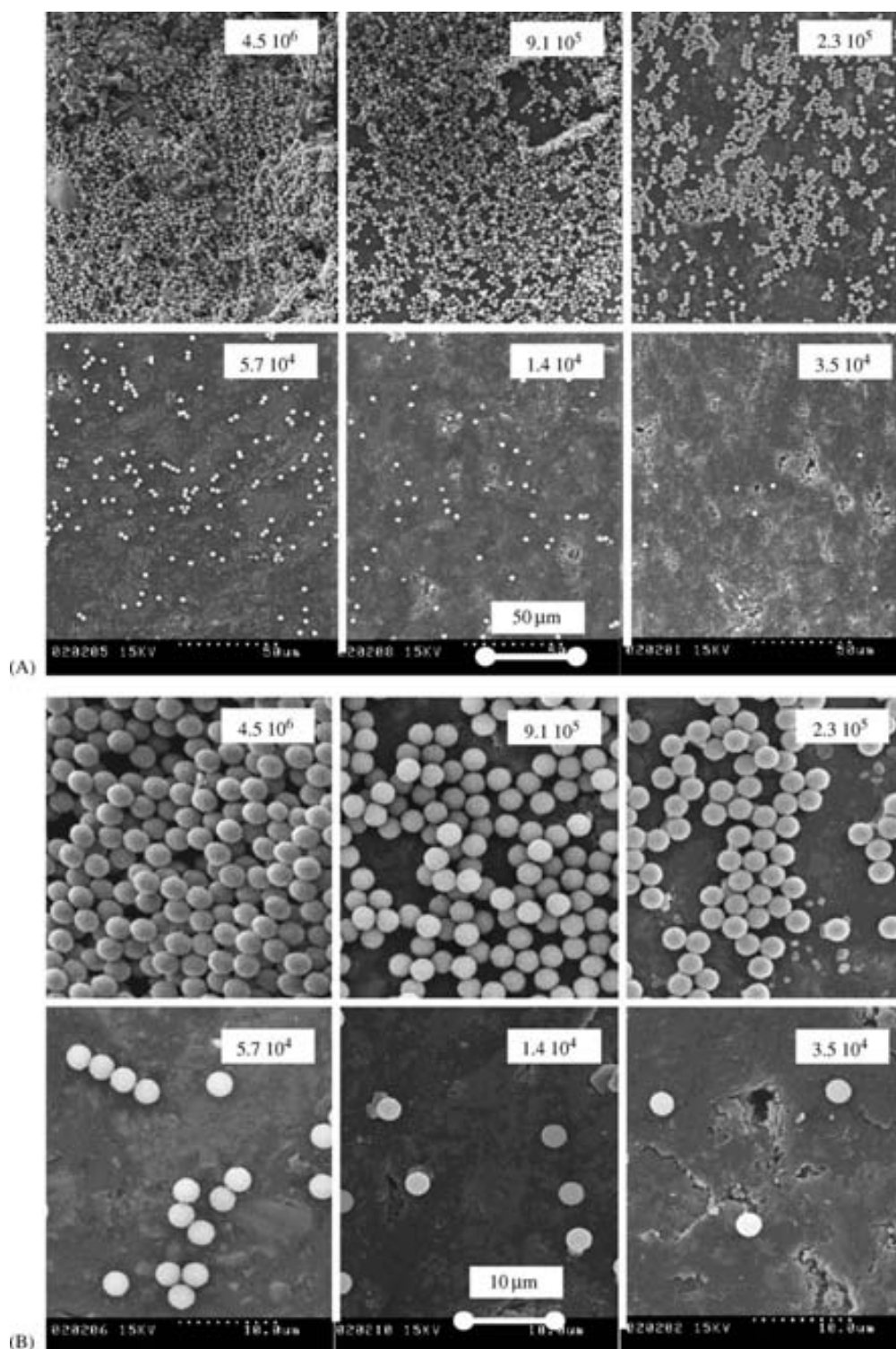


Fig. 1. (A) Scanning electron microphotographs of m-GEC modified with different amounts of streptavidin-coated magnetic beads. In all cases, identical acceleration voltage (10 KV) and resolution 50 μm were used. (B) The conditions are as same as in (A) with chosen resolution 10 μm .

beads, (2) hybridization in the presence of target and/or non-complementary (NC) and (3a) after alkaline treatment to magnetic beads in order to dissociate of DNA hybrids from magnetic beads followed by voltammetric measurement using GEC electrode or (3b) without alkaline treatment by

using m-GEC electrode as a magnetic separator and electrochemical transducer.

The appearance of guanine oxidation signals (observed at +0.55 V) coming from the target, both for IS200 23 and IS200 56 after hybridization with its complementary inosine

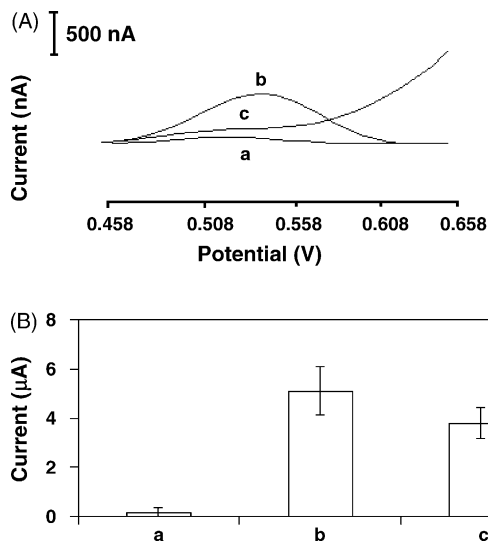


Fig. 2. (A) Differential pulse voltammograms for the oxidation signals of guanine obtained by using alkaline treatment after hybridization in the presence of (a) only inosine-substituted probe, (b) 20 $\mu\text{g/mL}$ target sequence, IS200 23, (c) only blank sample without any DNA. (B) Histograms for the magnitude of guanine oxidation signals obtained after hybridization in the presence of (a) only inosine-substituted probe, (b) 20 $\mu\text{g/mL}$ target sequence, IS200 23, (c) 20 $\mu\text{g/mL}$ target sequence, IS200 56. After dry-adsorption onto GEC electrode at 80 °C during 45 min and a washing step, DPV measurements in ABS was performed by scanning between +0.30 V and +1.20 V.

substituted probe was used as analytical signal. In comparison to previously reported results using GEC electrode but without any magnetic separation [4], in this study much more sensitive label-free assay was performed as the first time in combination with efficient magnetic separation by using GEC or m-GEC electrode. The guanine oxidation signals sensitively obtained in the presence of hybridization with 23-mer and 56-mer bases target sequences by using alkaline treatment and GEC electrode were shown in Fig. 2.

It is also possible to develop a sensitive genomagnetic assay to avoid the alkaline treatment by using m-GEC electrode. The results were presented in Fig. 3. Despite a good reproducibility it was not observed, this genomagnetic assay

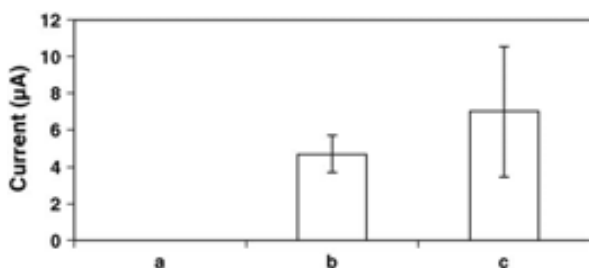


Fig. 3. Histograms for the magnitude of guanine oxidation signals obtained by using m-GEC electrode after hybridization in the presence of (a) only inosine-substituted probe, (b) 20 mg/L target sequence, IS200 23, and (c) 20 mg/L target sequence, IS200 56. Without using any alkali treatment, dry adsorption of oligo-modified beads onto m-GEC electrode was performed at 80 °C during 45 min. Other conditions as described in Fig. 2.

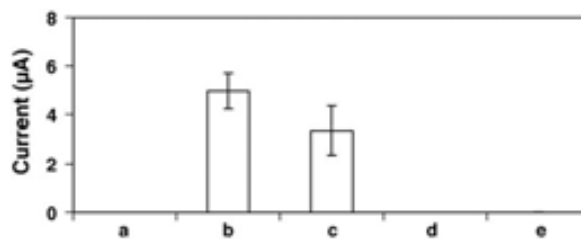


Fig. 4. Histograms for the magnitude of guanine oxidation signals obtained by using GEC electrode after hybridization in the presence of (a) only inosine-substituted probe, (b) 20 $\mu\text{g/mL}$ of target sequence, IS200 23, (c) 20 $\mu\text{g/mL}$ of target sequence, IS200 56, (d) 20 $\mu\text{g/mL}$ of NC-1, and (e) 20 $\mu\text{g/mL}$ of NC-2. Other conditions as in Fig. 2.

combined with m-GEC electrode could be a promising strategy for DNA chip technology after future improvements.

Fig. 4 shows the results of selectivity of this genomagnetic assay by using GEC electrode as electrochemical transducer. In the presence of any of NC-1 and NC-2 oligonucleotides, no guanine signal was observed. These results demonstrated that fully non-complementary DNA did not interfere, because non-complementary DNA could be easily removed by the efficient magnetic separation.

Three subsequent experiments for genomagnetic of DNA hybridization upon 20 $\mu\text{g/mL}$ concentration of target (23-mer bases, IS200 23) gave reproducible results as a mean guanine signal of 4.8 μA and a R.S.D. value of 10.15% ($n = 3$).

The detection limit (DL) estimated from $S/N = 3$, corresponds to 9.68 fmol/mL target (56-mer bases, IS200 56) concentration in the 20 μL samples using GEC electrode with dry-adsorption at 80 °C. In comparison to the detection limits obtained with other genomagnetic assay developed by using pencil graphite electrode or carbon paste electrode, the DL was much lower than those previously reported ones [34,35].

4. Conclusion

A very sensitive genomagnetic assay has been developed for the detection of *Salmonella* spp. by sequence-specific DNA hybridization based on the readout coming from guanine oxidation in presence of target sequence and using GEC and m-GEC electrodes as electrochemical transducers. The reported label-free electrochemical genomagnetic procedure provides much sensitive, rapid and cheaper detection than the assays previously reported [11–18,31,34,35]. This enhanced sensitivity of the graphite-epoxy composite respect to other electrochemical transducer and selectivity conferred by the magnetic separation could be applied for the detection of PCR amplicons coming from real samples. Future work will be focused on the development of a procedure for PCR products combined with GEC or m-GEC electrode in order to detect *Salmonella* spp., mainly for food industry applications.

Acknowledgements

This work has been supported by the Turkish Academy of Sciences in the framework of the Young Scientist Award Program (KAE/TUBA-GEBIP/2001-2-8). A.E. acknowledges the financial support from The Scientific and Technical Research Council of Turkey (TUBITAK) (Project No. TBAG-2233). Financial support from Ministry of Education and Science (MEC), Madrid (Project BIO2004-02776) is also acknowledged. M.I.P. acknowledges the financial support from Juan de la Cierva Program from MEC Madrid.

References

- [1] T. Strother, R.J. Hamers, L.M. Smith, Covalent attachment of oligodeoxyribonucleotides to amine-modified Si(001) surfaces, *Nucl. Acids Res.* 28 (2000) 3535–3541.
- [2] J. Wang, Survey and summary: from DNA biosensors to gene chips, *Nucl. Acids Res.* 28 (2000) 3011–3016.
- [3] E. Palecek, M. Fojta, Detecting DNA hybridization and damage, *Anal. Chem.* 75 (2001) 75A–83A.
- [4] E. Palecek, Past, present and future of nucleic acids electrochemistry, *Talanta* 56 (2002) 809–819.
- [5] M.I. Pividori, A. Merkoci, S. Alegret, Electrochemical genosensor design: immobilisation of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods, *Biosens. Bioelectron.* 15 (2000) 291–303.
- [6] A. Erdem, M. Ozsoz, Electrochemical DNA biosensors based on DNA–drug interactions, *Electroanalysis* 14 (2002) 965–974.
- [7] J. Wang, X. Cai, G. Rivas, H. Shiraishi, P.A.M. Farias, N. Dontha, DNA electrochemical biosensor for the detection of short DNA sequences related to the human immunodeficiency virus, *Anal. Chem.* 68 (1996) 2629–2634.
- [8] K.M. Millan, A. Saraulo, S.R. Mikkelsen, Voltammetric DNA biosensor for cystic fibrosis based on a modified carbon paste electrode, *Anal. Chem.* 66 (1994) 2943–2948.
- [9] J. Wang, Toward genoelectronics: electrochemical biosensing of DNA hybridization, *Chem. Eur. J.* 6 (1999) 1681–1685.
- [10] M.E. Napier, C.R. Loomis, M.F. Sistare, J. Kim, A.E. Eckhardt, H.H. Thorp, Probing biomolecule recognition with electron transfer: electrochemical sensors for DNA hybridization, *Bioconj. Chem.* 8 (1997) 906–913.
- [11] D. Ozkan, A. Erdem, P. Kara, K. Kerman, B. Meric, J. Hassmann, M. Ozsoz, The allele-specific genotype detection of Factor V Leiden mutation from PCR amplicons based on label-free electrochemical genosensor, *Anal. Chem.* 74 (2002) 5931–5936.
- [12] A. Erdem, M. Isabel Pividori, M. del Valle, S. Alegret, Rigid carbon composites: a new transducing material for label-free electrochemical genosensing, *J. Electroanal. Chem.* 567 (2004) 29–37.
- [13] J. Wang, G. Rivas, X. Cai, N. Dontha, H. Shiraishi, D. Luo, F.S. Valera, Sequence-specific electrochemical biosensing of *M. tuberculosis* DNA, *Anal. Chim. Acta* 337 (1997) 41–48.
- [14] A. Erdem, K. Kerman, B. Meric, U.S. Akarca, M. Ozsoz, DNA electrochemical biosensor for the detection of short DNA sequences related to the hepatitis B virus, *Electroanalysis* 11 (1999) 586–588.
- [15] A. Erdem, K. Kerman, B. Meric, U.S. Akarca, M. Ozsoz, Novel hybridization indicator methylene blue for the electrochemical detection of short DNA sequences related to the hepatitis B virus, *Anal. Chim. Acta* 422 (2000) 139–149.
- [16] A. Erdem, K. Kerman, B. Meric, D. Ozkan, P. Kara, M. Ozsoz, Electrochemical DNA biosensor for the detection of short DNA sequences related to *Microcystis* spp., *Turk. J. Chem.* 26 (2002) 851–862.
- [17] F. Yan, A. Erdem, B. Meric, K. Kerman, M. Ozsoz, O.A. Sadik, Electrochemical DNA biosensor for the detection of specific gene related to *Microcystis* species, *Electrochem. Commun.* 3 (2001) 224–228.
- [18] D. Ozkan, A. Erdem, P. Kara, K. Kerman, J.J. Gooding, P.E. Nielsen, M. Ozsoz, Electrochemical detection of hybridization using peptide nucleic acids and methylene blue on self-assembled monolayer modified gold electrodes, *Electrochem. Commun.* 4 (2002) 796–802.
- [19] S. Steenken, S.V. Jovanovic, How easily oxidizable is DNA? One-electron reduction potentials of adenosine and guanosine radicals in aqueous solution, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 617–618.
- [20] J.J. Storhoff, C.A. Mirkin, Programmed materials synthesis with DNA, *Chem. Rev.* 99 (1999) 1849–1862.
- [21] A.N. Shipway, E. Katz, I. Wilner, Nanoparticle Arrays on surfaces for electronic, optical, and sensor applications, *Chem. Phys. Chem.* 1 (2000) 18–52.
- [22] S. Zhang, G. Wright, Y. Yang, Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction, *Biosens. Bioelectron.* 15 (2000) 273–282.
- [23] H. Berney, J. West, E. Haeefele, J. Alderman, W. Lane, J.K. Collins, A DNA diagnostic biosensor: development, characterisation and performance, *Sens. Actuators, B: Chem.* 68 (2000) 100–108.
- [24] J. Wang, G. Liu, A. Merkoçi, Electrochemical coding technology for simultaneous detection of multiple DNA targets, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 3214–3215.
- [25] M. Ozsoz, A. Erdem, K. Kerman, D. Ozkan, B. Tugrul, N. Topcuoglu, H. Ekren, M. Taylan, Electrochemical genosensor based on colloidal gold nanoparticles for the detection of Factor V Leiden mutation using disposable pencil graphite electrodes, *Anal. Chem.* 75 (2003) 2181–2187.
- [26] B.I. Haukanes, C. Kvam, Application of magnetic beads in bioassays, *Biotechnology* 11 (1993) 60–63.
- [27] MCB 1200 MixSep Technology, <http://www.sigris.com/mcb-technology.html>.
- [28] K. Larsson, K. Kriz, D. Kriz, Magnetic transducers in biosensors and bioassays, *Analisis* 27 (1999) 617–621.
- [29] S. Solé, A. Merkoci, S. Alegret, New materials for electrochemical sensing III. Beads, *Trends Anal. Chem.* 20 (2001) 102–110.
- [30] A.G. Gehring, J.D. Brewster, P.L. Irwin, S.I. Tu, L.J. Van Houten, 1-Naphthyl phosphate as an enzymatic substrate for enzyme-linked immunomagnetic electrochemistry, *J. Electroanal. Chem.* 469 (1999) 27–33.
- [31] M. Dequaire, C. Degrand, B. Limoges, An immunomagnetic electrochemical sensor based on a perfluorosulfonate-coated screen-printed electrode for the determination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2571–2577.
- [32] E. Palecek, F. Jelen, Electrochemistry of nucleic acids and development of DNA sensors, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 32 (3) (2002) 261–270.
- [33] J. Wang, A. Erdem, An overview of magnetic beads used in electrochemical DNA biosensors, in: Y.G. Gogotsi, I.V. Uvarova (Eds.), *NATO-ARW Book, Nanostructured Materials and Coatings for Biomedical and Sensor Applications*, 4–8 August 2002, Kiev, Ukraine, Kluwer Academic Publication, 2003, pp. 307–314.
- [34] J. Wang, A.-N. Kawde, A. Erdem, M. Salazar, Magnetic bead-based label-free electrochemical detection of DNA hybridization, *Analyst* 126 (2001) 2020–2024.
- [35] J. Wang, D. Xu, A. Erdem, R. Polsky, M. Salazar, Genomagnetic electrochemical assays of DNA hybridization, *Talanta* 56 (2002) 931–938.
- [36] E. Palecek, S. Billova, L. Havran, R. Kizek, A. Miculkova, F. Jelen, DNA hybridization at microbeads with cathodic stripping voltammetric detection, *Talanta* 56 (2002) 919–930.
- [37] J. Wang, A.-N. Kawde, Magnetic-field stimulated DNA oxidation, *Electrochem. Commun.* 4 (2002) 349–352.

- [38] E. Palecek, R. Kizek, L. Havran, S. Billova, M. Fojta, Electrochemical enzyme-linked immunoassay in a DNA hybridization sensor, *Anal. Chim. Acta* 469 (2002) 73–83.
- [39] J. Wang, D. Xu, R. Polsky, Magnetically-induced solid-state electrochemical detection of DNA hybridization, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 4208–4209.
- [40] J. Wang, L. Guodong, R. Polsky, A. Merkoci, Electrochemical stripping detection of DNA hybridization based on cadmium sulfide nanoparticle tags, *Electrochem. Commun.* 4 (2002) 722–726.
- [41] J. Wang, L. Guodong, A. Merkoci, Particle-based detection of DNA hybridization using electrochemical stripping measurements of an iron tracer, *Anal. Chim. Acta* 482 (2003) 149–155.
- [42] J. Wang, Nanoparticle-based electrochemical DNA detection, *Anal. Chim. Acta* 500 (2003) 247–257.
- [43] J. Wang, A. Erdem, Genomagnetic electrochemical biosensors, in: E. Buzaneva, P. Scharff (Eds.), *NATO-ARW Proceedings: Frontiers of Multifunctional Integrated Nanosystems*, 12–16 July 2003, Ilmenau, Germany, Kluwer Academic Publication, July 2004, pp. 431–438.
- [44] J. Wang, G.-U. Flechsig, A. Erdem, O. Korbut, P. Grundler, Label-free DNA hybridization based on coupling of a heated carbon paste electrode with magnetic separations, *Electroanalysis* 16 (11) (2004) 928–931.
- [45] F. Céspedes, E. Martínez-Fàbregas, S. Alegret, New materials for electrochemical sensing. I. Rigid conducting composites, *Trends Anal. Chem.* 15 (1996) 296–304.
- [46] S. Alegret, Rigid carbon-polymer biocomposites for electrochemical sensing, *Analyst* 121 (1996) 1751–1758.
- [47] M.I. Pividori, A. Merkoçi, J. Barbé, S. Alegret, PCR-genosensor rapid test for detecting *Salmonella*, *Electroanalysis* 15 (2003) 1815–1823.
- [48] E. Williams, M.I. Pividori, A. Merkoçi, R.J. Forster, S. Alegret, Rapid electrochemical genosensor assay using a streptavidin carbon-polymer biocomposite electrode, *Biosens. Bioelectron.* 19 (2003) 165–175.
- [49] M.I. Pividori, S. Alegret, Graphite-epoxy platforms for electrochemical genosensing, *Anal. Lett.* 36 (2003) 1669–1695.
- [50] S. Lam, J.R. Roth, IS200, *Salmonella*-specific insertion sequence, *Cell* 34 (1983) 951–960.
- [51] I. Gibert, J. Barbé, J. Casadesús, Distribution of insertion sequence IS200 in *Salmonella* and *Shigella*, *J. Gen. Microbiol.* 136 (1990) 2555–2560.
- [52] I. Gibert, K. Carroll, D.R. Hillyard, J. Barbé, J. Casadesús, IS200 is not a member of the IS600 family of insertion sequences, *Nucl. Acids Res.* 19 (1991) 1343.
- [53] Y. Millemann, M.C. Lesage, E. Chaslus-Dancla, J.P. Lafont, Value of plasmid profiling, ribotyping, and detection of IS200 for tracing avian isolates of *Salmonella typhimurium* and *S. enteritidis*, *J. Clin. Microbiol.* 33 (1995) 173–179.
- [54] A.P. Burnens, J. Stanley, I. Sechter, J. Nicolet, Evolutionary origin of a monophasic *Salmonella* serovar, 9,12:1v:-, revealed by IS200 profiles and restriction fragment polymorphisms of the *fljB* gene, *J. Clin. Microbiol.* 34 (1996) 1641–1645.
- [55] F. Navarro, T. Llovet, M.A. Echeita, P. Coll, A. Aladueña, M.A. Usera, G. Prats, Molecular typing of *Salmonella enterica* serovar typhi, *J. Clin. Microbiol.* 34 (1996) 2831–2834.
- [56] E. Calva, L.G. Ordoñez, M. Fernández Mora, F.J. Santana, M. Bobadilla, J.L. Puente, Distinctive IS200 insertion between *gyrA*

and *rscC* genes in *Salmonella typhi*, *J. Clin. Microbiol.* 35 (1997) 3048–3053.

Biographies

Arzum Erdem is an Associate Professor at the Analytical Chemistry Department in the Faculty of Pharmacy of Ege University in Turkey. She received her Ph.D. in Analytical Chemistry from Ege University in 2000. Dr. Erdem was awarded by the Turkish Academy of Sciences (TUBA) as one of the highly skilled young scientists selected in 2001. She has initiated many international collaborative research on development and applications of electrochemical (bio)sensors based on drug, enzyme and also DNA. Her recent research is centred on the development of novel assays by using different nanomaterials designed for electrochemical sensing of DNA hybridization, and also the specific interactions between drugs and DNA.

María Isabel Pividori is an associated researcher at the Department of Analytical Chemistry, University of Barcelona, Spain. She received her Ph.D. in Chemistry from the Autonomous University of Barcelona in 2002. She has large experience in the design of DNA biosensors, which was the topic of her Ph.D. studies, first in Spain. She takes part in Spanish and international research projects about biosensor design and development, new methods for rapid DNA analysis, and analytical bioinstrumentation, based on composite biomaterials.

Anabel Lermo obtained a Master of Science in chemistry from the Autonomous University of Barcelona in 2003, where she started her Ph.D. studies in the topic of DNA electrochemical biosensors.

Alessandra Bonanni obtained a Master of Science in chemistry from the University of Rome “La Sapienza”, where she started postgraduate work with Professor Campanella in the field of Analytical Chemistry and Biosensors. In 2003, she joined to the Sensors and Biosensors Group at the Autonomous University of Barcelona, where she has started a Ph.D. in the topic of DNA sensors and impedance spectroscopy as the transduction principle.

Manuel del Valle received his Ph.D. in chemistry in 1992 from the Autonomous University of Barcelona, and he got a position of Associate Professor in analytical chemistry in 1997 at the same university. He is a member of the Sensors & Biosensors Group where he is a specialist for the instrumentation and electrochemical sensors. He has initiated there the research lines of sensor arrays and electronic tongues. Other interests of his work are the use of impedance measurements for sensor development, biosensors and the design of automated flow systems.

Salvador Alegret is a Professor of Analytical Chemistry at Autonomous University of Barcelona, Spain, and the head of the “Sensors & Biosensors” research group, which was founded in 1983 with more than 300 publications in the most spread specialized scientific journals, 300 presentations in international conferences, 4 patents, 20 thesis and more than 60 private and public financed projects. The research interests of Professor Alegret include the development of new transducer and chemical and biological recognition systems for electrochemical sensing devices and the development of integrated analytical systems for environmental, industry and biomedical monitoring.

Rapid Electrochemical DNA Biosensing Strategy for the Detection of Food Pathogens Based on Enzyme-DNA-Magnetic Bead Conjugate

Afinidad, 63 (2006) 13-18

M. Isabel Pividori, Anabel Lermo, Santiago Hernández, Jordi Barbé, Salvador Alegret, Susana Campoy

Article premiat amb la menció de millor treball de recerca “8th European A-IQS Award on Enzyme Technology” atorgat per l’Institut Químic de Sarrià

AFINIDAD

REVISTA DE QUÍMICA TEÓRICA Y APLICADA
EDITADA POR LA ASOCIACIÓN DE QUÍMICOS E INGENIEROS
DEL INSTITUTO QUÍMICO DE SARRIÀ

Rapid Electrochemical DNA Biosensing Strategy for the Detection of Food Pathogens Based on Enzyme-DNA-Magnetic Bead Conjugate

M. Isabel Pividori^{*1}, Anabel Lermo¹, Santiago Hernández³, Jordi Barbé², Salvador Alegret¹ and
Susana Campoy⁴

⁽¹⁾ Grup de Sensors i Biosensors, Departament de Química, Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra,
Catalonia, Spain

⁽²⁾ Unitat de Microbiologia, Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra,
Catalonia, Spain

⁽³⁾ Departamento de Química Analítica, Universidad de Barcelona. 08028 Barcelona, Catalonia, Spain

⁽⁴⁾ Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Catalonia, Spain

*Diseño de un nuevo biosensor electroquímico de DNA para la detección rápida de patógenos alimentarios basados
en un conjugado enzima-DNA-partículas magnéticas*

*Disseny d'un nou biosensor electroquímico de DNA per a la detecció ràpida de patògens alimentaris basat
en un conjugat enzim-DNA-partícules magnètiques*

Recibido: 7 de noviembre de 2005; aceptado: 21 de diciembre de 2005

Rapid Electrochemical DNA Biosensing Strategy for the Detection of Food Pathogens Based on Enzyme-DNA-Magnetic Bead Conjugate

M. Isabel Pividori¹, Anabel Lermo¹, Santiago Hernández³, Jordi Barbé², Salvador Alegret¹ and Susana Campoy⁴

⁽¹⁾ Grup de Sensors i Biosensors, Departament de Química, Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra, Catalonia, Spain

⁽²⁾ Unitat de Microbiologia, Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra, Catalonia, Spain

⁽³⁾ Departamento de Química Analítica, Universidad de Barcelona. 08028 Barcelona, Catalonia, Spain

⁽⁴⁾ Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Catalonia, Spain

Diseño de un nuevo biosensor electroquímico de DNA para la detección rápida de patógenos alimentarios basados en un conjugado enzima-DNA-partículas magnéticas

Disseny d'un nou biosensor electroquímic de DNA per a la detecció ràpida de patògens alimentaris basat en un conjugat enzim-DNA-partícules magnètiques

Recibido: 7 de noviembre de 2005; aceptado: 21 de diciembre de 2005

RESUMEN

El diseño de nuevas estrategias de detección del DNA basadas en su hibridación es en la actualidad un campo de investigación de importancia creciente tanto para el control de calidad como para la seguridad en la industria alimentaria. Con este objeto, se pueden utilizar marcadores enzimáticos para la detección electroquímica sensible de la hibridación del DNA. En este trabajo se describe un nuevo ensayo genomagnético sensible y selectivo, basado en una marcación enzimática del DNA y la posterior detección electroquímica utilizando un nuevo electrodo magnético. El DNA analito se une selectivamente mediante hibridación a una sonda de captura biotinilada, y posteriormente se inmoviliza el DNA dúplex a partículas magnéticas biotiniladas. Así se consigue posteriormente la separación del DNA analito de la matriz biológica compleja que lo contiene, mediante el electrodo magnético. La detección sensible del DNA se consigue finalmente mediante la marcación con la enzima HRP. La nueva metodología demostró ser útil para la detección rápida y sensible de *Salmonella* spp. Las principales características de esta nueva estrategia de detección de DNA se comparan con las metodologías de análisis clásico de DNA.

Palabras claves: Avidina. Biosensor de DNA. Genosensor electroquímico. Marcación enzimática. Partículas magnéticas. *Salmonella* spp.

SUMMARY

The development of novel and sensitive strategies for DNA hybridization and detection has become increasingly

important in different fields, such as food quality and safety control in food industry. For this purpose, enzyme markers can be used as sensitive electrochemical reporters for DNA hybridization. A sensitive, selective and rapid genomagnetic assay -based on the enzymatic labelling with electrochemical detection of DNA- by using a novel magneto electrode has been developed. The DNA target is selectively bound by its hybridization with the biotinylated capture probe on streptavidin magnetic beads, and then separated from its biological complex matrix by using the magneto electrode. The sensitive DNA electrochemical detection is finally achieved by the enzyme marker HRP. The novel methodology is also shown to be useful for the rapid and sensitive detection of *Salmonella* spp. The main features of this approach are compared with classical DNA analysis.

Key words: Avidin. DNA biosensor. Enzyme-label electrochemical genosensing. Magnetic beads. *Salmonella* spp.

RESUM

El desenvolupament de noves estratègies basades en la hibridació i detecció de DNA té actualment una importància creixent en diferents àmbits com ara el control de la

* Corresponding author:
e-mail: Isabel.Pividori@uab.es;
Fax: +34 93 581 2379;
Tel: +34 93 581 2118

seguretat i qualitat de productes en la indústria alimentària. En aquest sentit, diferents enzims poden ser utilitzats com a marcadors electroquímics per a la determinació de la hibridació de DNA. En aquest treball es descriu un nou assaig genomagnètic sensible, selectiu i ràpid, basat en un marcatge enzimàtic amb detecció electroquímica de DNA que utilitza un nou elèctrode magnètic. En aquest cas, el DNA que es pretén detectar, s'uneix de forma selectiva, per hibridació, a una sonda de captura biotinilada que es troba immobilitzada sobre partícules magnètiques que contenen estreptavidina. Posteriorment i mitjançant la utilització d'un elèctrode magnètic, el DNA problema pot ser separat de la matriu biològica complexa que el conté. Finalment, la detecció electroquímica del DNA es porta a terme mitjançant el marcador enzimàtic HRP. Aquesta nova estratègia pot ser utilitzada com a nou sistema ràpid i sensible de detecció de *Salmonella* spp. En el present treball també es comparen les característiques principals d'aquest mètode amb les que presenten els assaigs clàssics d'anàlisis de DNA.

Paraules clau: Avidina. Biosensor de DNA. Genosensor electroquímic marcat enzimàticament. Partícules magnètiques. *Salmonella* spp.

INTRODUCTION

The development of new methodologies with the advantages of rapid response, sensitivity and ease of multiplexing is now a challenge in the development of new biochemical diagnostic tools. Electrochemical DNA biosensors can meet these demands, offering considerable promise for obtaining sequence-specific information in a faster, simpler and cheaper manner compared to traditional hybridization assays. Such devices possess great potential for decentralized testing, especially in food industry applications.

DNA biosensors are devices combining a biological recognition agent (DNA probe), with a transducer. The former provides selectivity while the latter provides sensitivity and the conversion of the recognition event (hybridization) to a measurable electronic signal. A typical DNA hybridization sensor involves a conversion of the hybridization event into useful electrical signal. The DNA recognition event for electrochemical genosensing is based mostly on electroactive indicators (Erdem *et al.*, 2001), metal nanoparticles or quantum dots (Wang *et al.*, 2001), or the DNA oxidation signal coming from the guanine base (Paleček, 1958; Fojta and Paleček, 1997; Jelen *et al.*, 2002). Enzyme labelling has been transfer from non-isotopic DNA classical methods to electrochemical genosensing. The enzyme labelling relies on the reaction between a biotinylated or digoxigenin modified DNA probe with the streptavidin or anti DIG enzyme conjugate, respectively. Higher sensitivity and specificity have been reported for the enzyme labelling method compared with the other reported methods (Alfonta *et al.*, 2001; Paleček *et al.*, 2002).

Salmonella spp is one of the most frequently occurring foodborne pathogens affecting the microbial safety of food. The fact that a very low number of *Salmonella* cells can be infectious emphasizes the need for stringent food safety measures. Traditional methods for isolating and identifying *Salmonella* spp in foods relies on a multi-step process involving: pre-enrichment, selective enrichment in both selective and differential media, biochemical testing and serological confirmation. These cultural techniques for detection of *Salmonella* spp require 3-4 days to provide presumptive results and an additional 1-2 days for further biochemical confirmation (Tietjen and Fung, 1995).

Accelerated *Salmonella* spp detection procedures would allow the food industry to reduce warehousing costs and permit increased testing of both food ingredients and final products. A rapid test for food microbiology may be defined as a test that takes 4 to 12 h to complete (Tietjen and Fung, 1995). Various rapid methods for detecting the bacterial genome have been developed. These strategies require the amplification of a predetermined segment of the targeted organism by the polymerase chain reaction (PCR) and the detection of the resulting amplified DNA fragment by either optical or colorimetric methods, reducing the time of the assay and providing results to genetic specificity. Southern blotting and probe hybridization or the direct identification of the amplicon by its size in gel electrophoresis is the current method usually used for this task.

A novel method for the rapid determination of *Salmonella* based on the electrochemical DNA magneto biosensor is reported for the first time. The electrochemical detection of the DNA is based on an enzyme-DNA-magnetic bead conjugate. In this novel procedure, instead of the direct modification of the biosensor surface, the biological reactions (as immobilization, hybridization and enzymatic labelling) as well as the washing steps can be successfully performed on magnetic beads (Figure 1, A). After the modifications, the magnetic beads can be easily captured by magnetic forces onto the surface of a novel magneto sensor (m-GEC, graphite-epoxy composite electrodes holding a small magnet inside) (Figure 1, B). Once immobilized on m-GEC, the DNA on the magnetic beads can be electrochemically revealed based on an enzymatic labelling (Figure 1, C). The procedure for electrochemical DNA biosensing based on enzyme labelling and magnetic beads is demonstrated for the rapid detection of a PCR-amplified IS200 element specific for *Salmonella* spp (Lam and Roth, 1983; Gibert *et al.*, 1990; Schiaffino *et al.*, 1996). The advantages of this novel strategy for electrochemical DNA biosensing based on enzyme labelling and magnetic bioseparation is discussed and compared with the current state of the art in DNA analysis.

MATERIALS AND METHODS

Equipment

Amperometric measurements were performed with a LC-4C Amperometric Controller (BAS Bioanalytical System, USA). A three-electrode set-up was used comprising a platinum auxiliary electrode (Crison 52-67 1, Spain), a double junction Ag/AgCl reference electrode (Orion 900200) with 0.1 M KCl as the external reference solution, and a working electrode (the m-GEC electrodes). Temperature-controlled incubations were done in an Eppendorf Thermomixer 5436. The magnetic separation was performed using a magnetic separator Dynal MPC-S (product no.120.20, Dynal Biotech ASA, Norway). A scanning electron microscope (Hitachi S-570, Tokyo, Japan) is used to study the distribution of the magnetic beads on the electrode surface.

Chemicals And Reagents

Composite electrodes were prepared using 50 µm particle size graphite powder (BDH, UK) and epoxy resin Epotek H77 resin and hardener (both from Epoxy Technology, USA). The magnetic beads modified with streptavidin (Dynabeads M-280 Streptavidin, Prod.No.112.05) were purchased from Dynal Biotech ASA (Oslo, Norway). The hybridization solution was 5 x SSC. The marker used for the enzymatic labelling (antidigoxigenin horseradish peroxidase, anti-Dig-HRP) was purchased from Roche Biochemicals Diagnostics (Germany).

All oligonucleotide stock solutions were prepared with sterilized and deionized water and stored at a temperature of -20 °C until required. All oligomer sequences were obtained from TIB-MOLBIOL (Germany).

For the detection of *Salmonella* spp based on the specific IS200 element (Lam and Roth, 1983; Gibert *et al.*, 1990; Schiaffino *et al.*, 1996), the oligomer sequences were i) target unique to the IS200 element in *Salmonella* spp (IS200 target 62 mer): 5' CAC ACC CGA TGG AAC TGT AAA TAT CAC ATA GTT TTC GCG CCC AAA TAC CGA AGA CAA GCG TT 3'; ii) biotinylated capture probe: 5' GTG ATA TTT ACA GTT CCA TCG GG-biotin 3'; iii) digoxigenin probe: 5' DIG-CTT GTC TTC GGT ATT TGG GCG CG 3'.

Two primers, 23 and 21 nucleotides long, were designed for PCR amplification of IS200 sequence (Gene Bank accession AF 025380), in order to achieved an amplicon doubly-labelled with biotin and digoxigenin respectively.

The primer sequences were:

Biotinylated IS200 up: 5' bio- ATG GGG GAC GAA AAG AGC TTA GC 3', whose 5' end is 194 bp from IS200 5' end, and DIG-IS200 down: 5' DIG- CTC CAG AAG CAT GTG AAT ATG 3', whose 5' end is 394 bp from IS200 5' end.

The amplification of DNA carrying an IS200 element can be expected to yield a doubly-labelled fragment of 201 bp. Expand High Fidelity^{PLUS} PCR System (Roche) was used for performing the PCR, containing the Taq DNA polymerase, the deoxynucleotides triphosphate, and MgCl₂ in a buffer solution.

Bovine serum albumin (BSA) was purchased from BDH (UK); Tween 20 and hydroquinone from Sigma; and hydrogen peroxide came from Merck (Germany). All other reagents as ethidium bromide, agarose, proteinase K were of the highest available grade. Aqueous solutions were prepared with double distilled water. The solutions, and their composition, were: Standard saline citrate (20 X SSC) (3.0 M NaCl, 0.3 M trisodium citrate, pH 7.0); Tris Buffer (0.1 M Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.5), blocking Tris buffer (2 % w/v BSA, 0.1 % w/v Tween 20 i 5 mM EDTA, in 0.1 M Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.5).

DNA Amplification and Double Labelling of the IS200 element specific for *Salmonella*

The PCR was performed in a 100 µl of reaction mixture containing PCR template (200 ng of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC14028 purified DNA) using the Expand High Fidelity^{PLUS} PCR System (Roche). Each reaction contains 200 µM of each deoxynucleotide triphosphate (dATP, dGTP, dCTP, and dTTP), 0.5 µM of each labelled primer (Biotinylated IS200 up and DIG-IS200 down) and 5 U of polymerase. The reaction was carried out in the supplied buffer containing 1.5 mM MgCl₂. The amplification mixtures were exposed to an initial denaturation at 95 °C for 2 min followed by 30 cycles of 95 °C for 30 s,

53 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s, and a last step of 7 min at 72 °C. The amplification included a blank as a control, which contained all reagents except the target DNA. The amplification (and doubly-labelled) products were analyzed by electrophoresis in 3 % agarose gels in buffer 0.4 M tris-acetate, 1 mM EDTA pH 8.0, containing 0.5 µg/mL ethidium bromide, and a DNA size marker phi174/Hinfl. The DNA bands in the gels were visualized by UV transillumination and they were photographed. As the primers were labelled with biotin and digoxigenin, the amplicon was expected to be labelled by both biotin and digoxigenin in each extreme, respectively.

Construction of the Magneto Graphite-epoxy composite (m-GEC) transducer

Graphite powder and epoxy resin in a 1:4 (w/w) ratio was thoroughly hand mixed to ensure the uniform dispersion of the graphite powder throughout the polymer. In both cases, the resulting paste was placed in a PVC cylindrical sleeve body (6 mm id), which has an electrical contact to a depth of 3 mm. A small magnet (3 mm i.d.) was placed into the centre of this electrode after the addition of a thin layer of GEC paste in order to avoid the direct contact between the magnet and the electrical connector (Figure 1). After filling the electrode body gap completely with the soft paste, the electrode was tightly packed. The composite material was cured at 40 °C for one week.

In all incidences, prior to each use the surface of the electrode was wet with doubly distilled water and then polished, firstly with abrasive paper and then with alumina paper to give a smooth mirror finish with a fresh renewable surface. The reproducibility of the construction of the sensors based on GEC and the polishing procedure have been previously reported by our group (Pividori *et al.*, 2001).

Modification of the streptavidin magnetic particles

The protocol consisted in a previous modification of the magnetic particles (Figure 1, A), performed under controlled temperature and gently shaking. After each step, including the enzymatic labelling step, a magnetic separator was used in order to separate the magnetic beads from the solution. Suitable washing steps were performed after each biological modification -such as immobilization, hybridization and enzymatic labelling steps- to avoid the undesirable non-specific adsorption phenomena. After the final washing steps, the magnetic beads were captured by dipping the electrode inside the reaction tube (Figure 1, B). After the electrochemical detection based on the enzymatic activity of the marker (Figure 1, C), the surface of the m-GEC electrode can be easily renewed to performed repetitive measurements by merely polishing the surface and repeating the assay.

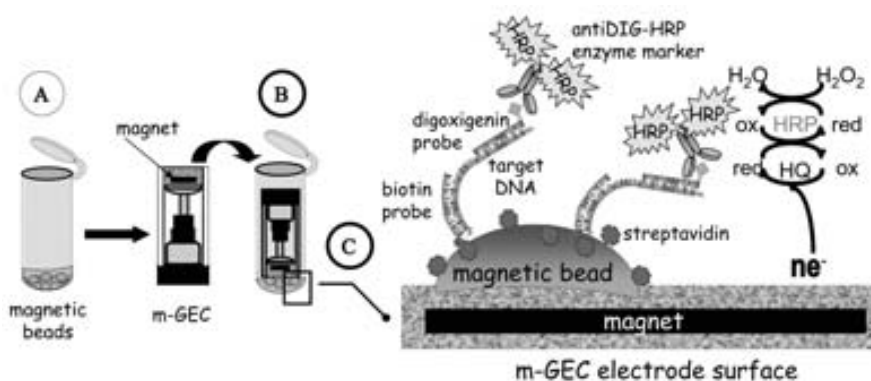


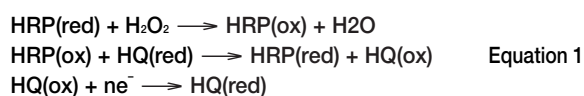
Figure 1. A) The modification of the magnetic beads occurs in solution (hybridization of DNA, immobilization, and enzyme labelling). B) The capture of the modified-magnetic beads on the magneto sensor (m-GEC) is produced by the magnetic affinity for the magnet inside the sensor body. C) Schematic representation of the electrochemical detection based on the enzymatic labelling of the magnetic beads on the modified m-GEC electrode surface.

Electrochemical DNA sequence specific detection Based On m-GEC and enzyme labelling

A capture format -in which the immobilization of the biotinylated probe together with the hybridization was performed in a one step procedure- was carried out. The DNA is immobilized on the streptavidin-magnetic beads by a single-point immobilization procedure based on streptavidin/biotin interaction (Figure 1, C). Biotinylated DNA can be firmly attached on streptavidin modified magnetic beads in that way.

The protocol consists briefly on the following steps: i) One step *immobilization/hybridization* procedure in which the biotin labelled capture probe is immobilize on the streptavidin magnetic beads, while the hybridization with the target and with a second complementary probe -in this case labelled with digoxigenin- is occurring at the same time; ii) *Enzymatic labelling* using as enzyme label the antibody anti-Dig-HRP; iii) *Magnetic capture of the modified magnetic particles*; iv) *Amperometric determination* based on the enzyme activity by adding H₂O₂ and using hydroquinone as a mediator.

During the 'One step immobilization/hybridization procedure', the target unique to the IS200 element for the *Salmonella* spp (IS200 target 62 mer), together with the biotinylated capture probe (205 pmols) and the digoxigenin probe (225 pmols) were added to 1.6 x 10⁶ streptavidin magnetic beads. The immobilization/hybridization in one step was performed in 5 X SSC solution at a final volume of 140 µl for 30 min at 42° C. Two washing steps were performed for 10 min at 42° C in 140 µl of 5 X SSC solution. After that, the 'Enzymatic labelling step' was performed using as enzyme label the antibody anti-Dig-HRP (60 µg) in blocking Tris buffer at a final volume of 140 µl for 30 min at 42° C. Two washing steps were performed for 10 min at 42° C in 140 µl of Tris buffer. After the final washing steps, the modified-magnetic beads were captured by dipping the electrode inside the reaction tube. The 'Amperometric determination' is based on the activity of the HRP enzyme of the marker. The amount of enzyme-labelled antibody bound to the Dig-DNA duplex was determined using the following electrochemical detection procedure (Figure 1, C). Chronoamperometric experiments were performed at a potential of -0.100 V vs. Ag/AgCl electrode. This potential was chosen from cyclic voltammetry experiments (results not shown). For the enzymatic activity determinations, the m-GEC electrode modified with the HRP-labelled-DNA magnetic particles was immersed in a hydroquinone electrolyte solution (phosphate buffer 0.1 M, KCl 0.1 M, pH 7.0, hydroquinone 1.81 mM). Subsequently, H₂O₂ (the HRP substrate) was added to a final concentration of 4.90 mM, which corresponds to the H₂O₂ concentration capable to saturate the whole enzyme amount employed in the labelling procedure. At Figure 1, C and Equation (1) are represented the reactions that occur at the m-GEC sensors surface polarized at -0.100 V (vs. Ag/AgCl) upon H₂O₂ addition in the presence of hydroquinone. After addition of the substrate, the current was registered after a steady state had been reached maximizing the catalytic activity of the enzyme horseradish peroxidase. The electrode response is defined as the difference in current before and after the addition of H₂O₂.



Evaluation Of Non-Specific Adsorption

As in other kind of classical DNA analysis methods, it is important to control and evaluate the background adsorp-

tion. Non-specific adsorption assays evaluate all the adsorption processes producing analytical signals, except hybridization between the DNA target and its complementary DNA sequence (probe). The evaluation of the non-specific adsorption was performed by adding all reagents except the DNA target.

Rapid Electrochemical Verification of PCR Amplification of *Salmonella* Based On m-GEC and enzyme labelling

The protocol consists briefly on the following steps: i) *DNA amplification and double labelling of Salmonella IS200 insertion sequence*; ii) *Immobilization of the doubly-labelled amplicon* in which the biotin extreme of the ds-DNA amplicon was immobilize on the streptavidin magnetic beads; iii) *Enzymatic labelling* using as enzyme label the antibody anti-Dig-HRP able to bond the other labelled extreme of the ds-DNA amplicon ; iv) *Magnetic capture of the modified magnetic particles*; v) *Amperometric determination* based on the enzyme activity by adding H₂O₂ and using hydroquinone as a mediator.

After the DNA Amplification and Double Labelling of the IS200 element specific for *Salmonella* spp, a solution of the amplified product coming directly from the PCR was prepared in 5 X SSC. The *Immobilization of the doubly-labelled amplicon* was achieved by adding the amplicon to 6.2 x 10⁶ streptavidin magnetic beads. The immobilization was performed in 5 X SSC solution at a final volume of 140 µl for 30 min at 42° C. All the experimental conditions for the following steps were performed as previously explained for the 'Electrochemical DNA sequence specific detection Based On m-GEC and enzyme labelling'. The non-specific adsorption evaluation was performed by processing the negative control coming from the PCR amplification, in which all the reagents were added except for the DNA *Salmonella* template in the PCR mixture.

RESULTS AND DISCUSSION

Recent advances in the development of new materials have brought unique opportunities to the design of new analytical strategies. One of the most promising materials which have been developed is biological modified-magnetic beads (Haukanes and Kvam, 1993) based on the concept of magnetic bioseparations. The biomaterial -specific cells, proteins or DNA- can be selectively bound to the magnetic beads and then separated from its biological matrix by using a magnetic field. In this work we use streptavidin-modified magnetic beads for the effective immobilization based on the avidin-biotin affinity reaction. The avidin-biotin reaction as an immobilization strategy for biomolecule 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).

A novel magneto electrode based on graphite-epoxy composite (m-GEC) as a transducing material has been design. The novel genomagnetic assay based on enzyme labelling to achieve the electrochemical detection is first demonstrated for the sequence specific detection of the IS200 element related with *Salmonella* in a capture format, as shown in Figure 1. The DNA sequence detection is based on its hybridization in a sandwich format with i) a biotinylated capture probe to achieve the immobilization on the streptavidin-modified magnetic bead and ii) a digoxigenin signalling probe to achieve the electrochemical detection,

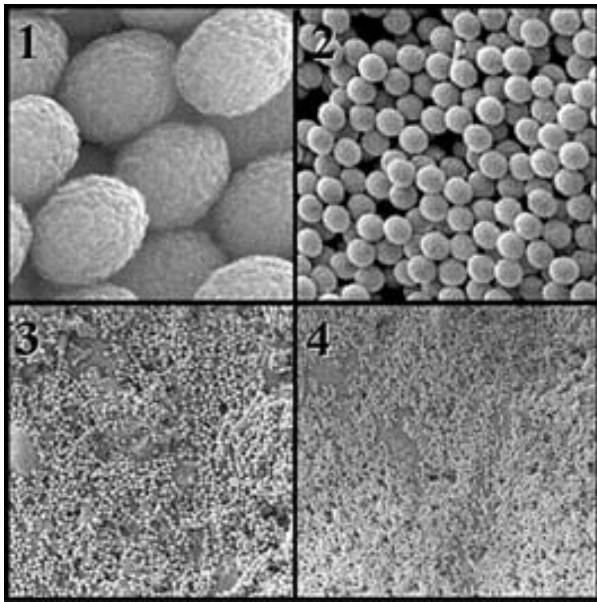


Figure 2. Scanning electron microphotographs showing the captured magnetic beads on the surface of m-GEC magneto sensor. Resolution: 2 μm (1), 10 μm (2), 50 μm (3) and 100 μm (4). Acceleration voltage: 10 kV. Number of magnetic beads: 6.2×10^6 .

after the proper reaction with the antiDIG-HRP enzymatic conjugate. After that, the modified-magnetic beads were captured by dipping the electrode inside the reaction tube. Figure 2 shows the distribution by Scanning Electron Microscopy (SEM) of the modified magnetic beads on the surface of the m-GEC electrode.

The enzyme is the electrochemical reporter to detect that the hybridization event has been successfully performed. Figure 3 shows the results for the detection of a IS200 element specific for *Salmonella* in one-step capture format by using the magneto DNA biosensor based on m-GEC with enzymatic labelling. As can be seen, a higher signal-to-non-specific adsorption is obtained in a large range of concentrations. Figure 3 also shows that the electrochemical signal is related with the amount of the DNA target. A similar strategy can be used for the electrochemical verification of PCR amplicon for the rapid detection of *Salmonella* spp, based on m-GEC and enzyme labelling. In this case, during PCR, the amplicon is doubly-labelled with both biotin -to achieve its immobilization on the streptavidin magnetic beads- and digoxigenin -to perform the electrochemical detection based on the enzyme conjugate antiDIG-HRP-. The agarose gel electrophoresis indicates that under the PCR conditions used in this work the double labelled set amplified exclusively the IS200 insertion sequence, producing only the expected 201 bp fragment as illustrated in Figure 4. These results confirm that the IS200 element from which this primer set was derived is a suitable candidate for the specific detection of *Salmonella* spp in real samples. Figure 4 shows that the electrochemical method based on m-GEC and enzyme labelling provides a highly sensitive strategy for the rapid verification and quantification of the PCR amplicon. However, this strategy provides no information about the size of the amplified product. Amplification products of incorrect size can be produced during PCR amplification. However, such problems are commonly avoided by the careful design of the set primers and of the PCR amplification conditions. Moreover, this strategy can be easily coupled to a second hybridization signalling probe, as demonstrated with the results shown in Figure 3, in order to ensure the specificity of the amplified product.

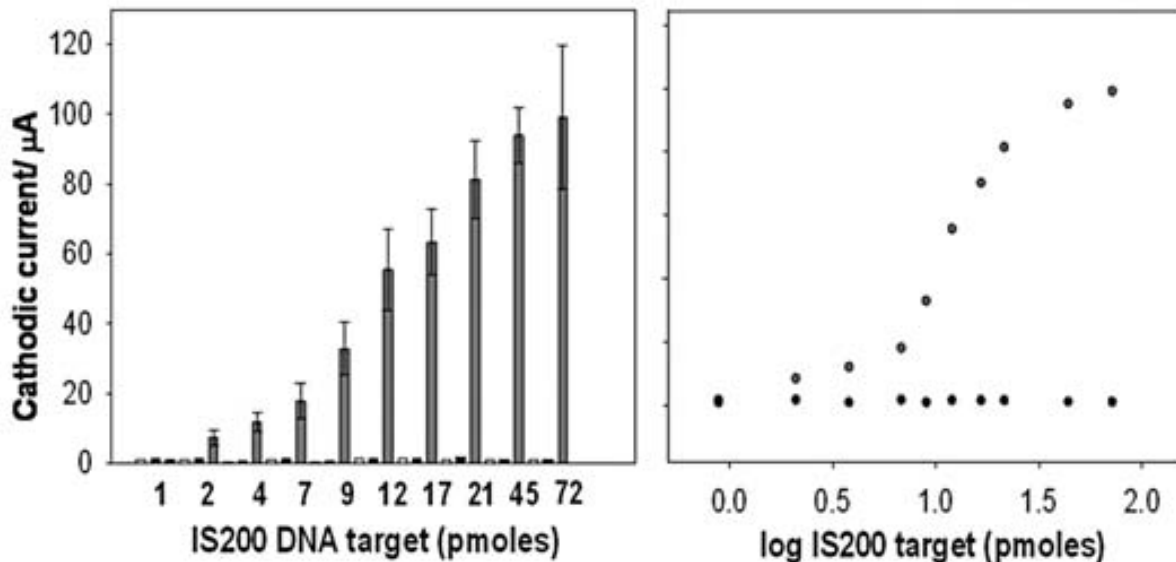


Figure 3. Left, Electrochemical DNA sequence specific detection with increasing amounts of IS200 sequence specific of *Salmonella* based on m-GEC and enzyme labelling and, right, logarithm of the IS200 DNA target concentration, in both cases plotted against the electrochemical signal. Black bars and dots show the total non-specific adsorption contribution (omitting the addition of the DNA target) while white bars show the non-specific adsorption of the enzyme conjugate (omitting the addition of the DNA target and digoxigenin probe). Gray bars and dots show the increasing amount of DNA IS200 target specific for *Salmonella*. In all cases, 205 pmols biotinylated probe, 225 pmols digoxigenin probe, 60 μg AntiDig-HRP and 1.6×10^6 magnetic beads were used. Medium: phosphate buffer 0.1 M, KCl 0.1 M, pH 7.0. Mediator: hydroquinone 1.81 mM. Substrate: H_2O_2 4.90 mM. Applied potential= -0.1 V (vs. Ag/AgCl). n=3.

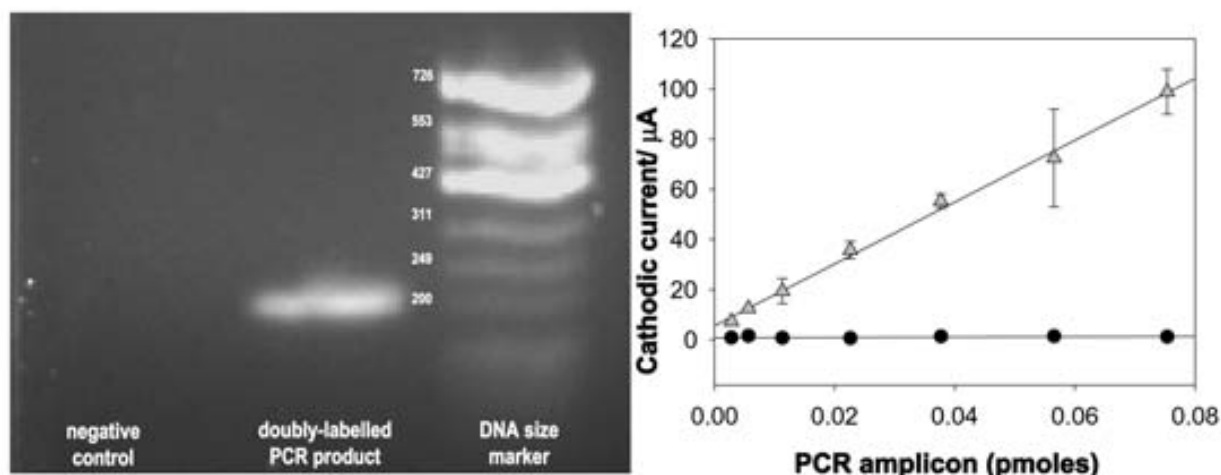


Figure 4. *Left.* Agarose gel electrophoresis of doubly-labelled PCR product (lane 2) obtained from *Salmonella enterica serovar Typhimurium* ATCC 14028 with the doubly-labelled primer set IS200. Lane 3: Molecular weight marker (Φ X174-Hinf I genome). No band was obtained with sterile water used as a negative PCR control (lane 1). *Right.* Rapid Electrochemical Verification of PCR Amplification of *Salmonella enterica serovar Typhimurium* ATCC 14028 with the doubly-labelled primer set IS200 based on m-GEC and enzyme labelling. Black dots show the total electrochemical signal processing the negative PCR control, while the gray triangles show increasing amount of DNA IS200 doubly-labelled amplicon signal. 60 μ g AntiDig-HRP and 6.2×10^6 magnetic beads were used. Medium: phosphate buffer 0.1 M, KCl 0.1 M, pH 7.0. Mediator: hydroquinone 1.81 mM. Substrate: H_2O_2 4.90 mM. Applied potential = -0.1 V (vs. Ag/AgCl). $n=3$.

CONCLUSIONS

The novel electrochemical genomagnetic strategy using magneto electrodes in connection with magnetic particles and enzyme labelling offer many potential advantages compared to more traditional strategies for detecting DNA. This new strategy takes advantages of working with magnetic particles, such as improved and more effective biological reactions, washing steps and magnetic separation after each step. The reported electrochemical genomagnetic assay provides much sensitive, rapid and cheaper detection than classical DNA assays and by using non-toxic reporters. The sensitivity of the assay can be attributed to the enzyme labelling strategy and the used of the novel m-GEC electrodes. The fabrication of the m-GEC electrodes used in the design of this novel electrochemical DNA biosensing strategy can be easily transferred to industrial scale. The high sensitivity of this new sensor coupled with its compatibility with miniaturization and mass fabrication technologies (screen-printing techniques), make them very attractive as user-friendly devices for quick analyses in industrial applications. The selectivity conferred by the magnetic separation will be used for the detection of PCR amplicons coming from complex real samples. Future work will be focused on the development of a procedure for PCR products combined with m-GEC electrode an enzyme labelling in order to detect *Salmonella* spp for food industry applications in real time.

BIBLIOGRAPHY

Alfonta, L.; A. K. Singh and I. Willner. 2001: «Liposomes labelled with biotin and horseradish peroxidase: a probe for the enhanced amplification of antigen-antibody or oligonucleotide-DNA sensing processes by the precipitation of an insoluble product on electrodes». *Anal. Chem.* 73: 91-102.

Erdem, A., K. Kerman, B. Meric and M. Ozsoz. 2001: «Methylene blue as a novel electrochemical hybridization indicator». *Electroanalysis* 13: 219-223.

Fojta, M. and E. Paleček. 1997: «Supercoiled DNA modified mercury electrode: a highly sensitive tool for the detection of DNA damage». *Anal. Chim. Acta* 342: 1-12.

Gibert, I.; J. Barbé and J. Casadesús. 1990: «Distribution of insertion sequence IS200 in *Salmonella* and *Shigella*». *J. Gen. Microbiol.* 136: 2555-2560.

Haukanes, B. I. and C. Kvam. 1993: «Application of magnetic beads in bioassays». *Biotechnology* 11: 60-63.

Jelen, F.; B. Yosypchuk, A. Kourilová, L. Novotný, and E. Paleček. 2002: «Label-free determination of picogram quantities of DNA by stripping voltammetry with solid copper amalgam mercury in the presence of copper». *Anal. Chem.* 74: 4788-4793.

Jones, M. L. and G. P. Kurzban. 1995: «Noncooperativity of biotin binding to tetrameric streptavidin». *Biochemistry* 34: 11750-11756.

Lam, S. and J. R. Roth. 1983.: IS200. A *Salmonella*-specific insertion sequence. *Cell* 34: 951-960.

Paleček, E. 1958: «Oscillographic polarography of nucleic acids and their building blocks». *Naturwiss* 45: 186-187.

Paleček, E.; R. Kizek, L. Havran, S. Billova and M. Fotja. 2002: «Electrochemical enzyme-linked immunoassay in a DNA hybridization sensor». *Anal. Chim. Acta* 469:73-83.

Pividori, M. I.; A. Merkoçi and S. Alegret. 2001: «Dot-blot amperometric genosensor for detecting a novel determinant of β -lactamase resistance in *Staphylococcus aureus*». *Analyst* 126: 1551-1557.

Schiaffino, A.; C. R. Beuzón, S. Uzzau, G. Leori, P. Cappuccinelli, J. Casadesús and S. Rubino. 1996: «Strain typing with IS200 fingerprints in *Salmonella abortusovis*». *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2375-2380.

Tietjen, M. and D. Y. C. Fung. 1995: «*Salmonellae* and food safety». *Crit. Rev. in Microbiol.* 21: 53-83.

Wang, J.; D. Xu, A.-N. Kawde and R. Polsky. 2001: «Metal Nanoparticle-Based Electrochemical Stripping Potentiometric Detection of DNA Hybridization». *Anal. Chem.* 73: 5576-5581.

In situ DNA amplification with magnetic primers for the electrochemical detection of food pathogens

Biosensors and Bioelectronics, 22 (2007) 2010-2017

A. Lermo, S. Campoy, J. Barbé, S. Hernández, S. Alegret, M.I. Pividori

In situ DNA amplification with magnetic primers for the electrochemical detection of food pathogens

A. Lermo^a, S. Campoy^b, J. Barbé^c, S. Hernández^d, 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 Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Catalonia, Spain

^c Unitat de Microbiologia, Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Catalonia, Spain

^d Departament de Química Analítica, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Catalonia, Spain

Received 23 April 2006; received in revised form 20 August 2006; accepted 25 August 2006

Available online 20 October 2006

Abstract

A sensitive and selective genomagnetic assay for the electrochemical detection of food pathogens based on *in situ* DNA amplification with magnetic primers has been designed. The performance of the genomagnetic assay was firstly demonstrated for a DNA synthetic target by its double-hybridization with both a digoxigenin probe and a biotinylated capture probe, and further binding to streptavidin-modified magnetic beads. The DNA sandwiched target bound on the magnetic beads is then separated by using a magneto electrode based on graphite–epoxy composite. The electrochemical detection is finally achieved by an enzyme marker, anti-digoxigenin horseradish peroxidase (HRP). The novel strategy was used for the rapid and sensitive detection of polymerase chain reaction (PCR) amplified samples. Promising resultants were also achieved for the DNA amplification directly performed on magnetic beads by using a novel magnetic primer, i.e., the up PCR primer bound to magnetic beads. Moreover, the magneto DNA biosensing assay was able to detect changes at single nucleotide polymorphism (SNP) level, when stringent hybridization conditions were used. The reliability of the assay was tested for *Salmonella* spp., the most important pathogen affecting food safety.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Electrochemical DNA biosensor; Magnetic primer; HACCP; Real-time PCR; SNPs; *Salmonella* spp

1. Introduction

Salmonella spp. is one of the most frequently occurring foodborne pathogens affecting food safety. Since food regulatory agencies have established strict control programs in order to avoid food pathogens entering the food supply, official laboratories should be able to process – rapidly and efficiently – a high number of samples. According to these requirements, 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 food pathogens in wide variety of food matrixes, is thus a priority, since traditional cultural methods require at least 3–4 days to provide presumptive results and additional 1–2 days for further biochemical confirmation (Tietjen and Fung, 1995).

In order to achieve the rapid detection of *Salmonella*, several methods mainly based on the bacterial genome as well as the antigenic composition of the cell membrane have been developed (Humphrey and Stephens, 2003). Nucleic acid-based detection has shown to be more specific and sensitive than immunological-based detection. Furthermore, the polymerase chain reaction (PCR) can be easily coupled to enhance the sensitivity of nucleic acid-based assays. Nucleic acid-based detection coupled with PCR has distinct advantages over culture and other standard methods for the detection of microbial pathogens such as specificity, sensitivity, rapidity, accuracy and capacity to detect small amounts of target nucleic acid in a sample. The further amplicon detection can be achieved with electrochemical DNA biosensors (Ye et al., 2003; Kara et al., 2004; Del Giallo et al., 2005), reducing the time of the assay and providing results to genetic specificity. The development of new materials such as magnetic beads has also brought unique opportunities to DNA detection strategies (Haukanes and Kvam, 1993). The DNA – as well as other biomaterial such

* Corresponding author. Tel.: +34 93 581 2118; fax: +34 93 581 2379.

E-mail address: isabel.pividori@uab.es (M.I. Pividori).

as specific cells, antibodies, and enzymes – can be selectively bound to the magnetic beads and then separated from its biological matrix by using a magnetic field. Magnetic beads have been recently used in new strategies for electrochemical DNA genosensing (Wang and Kawde, 2002; Fojta et al., 2003; Palecek et al., 2004; Erdem et al., 2006) and immunosensing (Zacco et al., 2006) with improved sensitivity and selectivity.

In this work, different strategies for the electrochemical genomagnetic detection of DNA based on a graphite–epoxy composite magneto electrode (m-GEC) as electrochemical transducer are reported. Rigid conducting graphite–polymer composites and biocomposites (GECs) have been extensively used in our laboratories for electrochemical biosensing (Alegret, 1996; Pividori and Alegret, 2005), and genosensing (Pividori et al., 2001, 2003) with improved features over other traditional carbon-based materials, such as higher sensitivity, robustness and rigidity.

The novel electrochemical genomagnetic assay for the DNA target detection in a sandwich format performed in one-step relies on its hybridization with a: (i) biotinylated capture probe to achieve the immobilization on the streptavidin-modified magnetic bead and (ii) digoxigenin signaling probe to achieve the further electrochemical detection. The enzymatic labelling is thus achieved in a second step through the DNA probe modified with digoxigenin, by the antiDIG-HRP antibody. The selectivity of this electrochemical assay was studied by using a ‘non-specific’ target with one mismatch for each probe in order to detect single-point mutations related to SNPs (single nucleotide polymorphisms) (Miyahara et al., 2002; Tolley et al., 2003; Kerman et al., 2004). The utility of this novel electrochemical genomagnetic assay was also illustrated for the specific detection of an amplified sequence – by PCR – related to *Salmonella* spp. The amplicon was obtained from the IS200 insertion sequence (Lam and Roth, 1983), a transposable element of some 700 bp, being present in more than 90% of the pathogenic or food-poisoning isolates of *Salmonella* spp. (Gibert et al., 1990).

Several formats for the detection of the amplicon – all of them based on the electrochemical magneto biosensing assay – were developed in this work. The rapid electrochemical verification of the amplicon coming from the *Salmonella* genome was performed by double-labelling the amplicon during PCR with a set of two labelled PCR primers—one of them with biotin and the other one with digoxigenin. During PCR, not only the amplification of the *Salmonella* genome was achieved, but also the double-labelling of the amplicon ends with: (i) the biotinylated capture primer to achieve the immobilization on the streptavidin-modified magnetic bead and (ii) the digoxigenin signalling primer to achieved the electrochemical detection. Beside this double-labelling PCR strategy, a single labelling PCR strategy with a further confirmation of the amplicon by its hybridization was achieved by performing the PCR with the biotin primer and a further hybridization step with a digoxigenin probe.

Moreover, a PCR reactor for real-time electrochemical detection was also developed. In this case the amplification and double-labelling was directly performed on the streptavidin

magnetic beads by using magnetic primers. The features of this new approach are compared with classical DNA analysis and other genosensing strategies.

2. Experimental

2.1. Instrumentation

The instrumentation (i.e. the amperometric controller, the three-electrode set-up, the temperature-controlled incubator, the magnetic separator, the scanning electron microscope) have been detailed described elsewhere (Zacco et al., 2006).

The PCR reaction was carried out in an Eppendorf Mastercycler Personal thermocycler.

2.2. Chemicals and biochemicals

Composite electrodes were prepared using 50 µm particle size graphite powder (BDH, UK) and Epotek H77 epoxy resin and hardener (both from Epoxy Technology, USA). The streptavidin-modified magnetic beads were Dynabeads M-280 Streptavidin Prod. no. 112.05 and were purchased from Dynal Biotech ASA (Oslo, Norway). For the detection of *Salmonella* spp. based on the specific IS200 element (Gene Bank accession AF025380), the oligomer sequences were: (i) target unique to the IS200 element in *Salmonella* spp. (IS200 target, 62 mer): 5' CAC ACC CGA TGG AAC TGT AAA TAT CAC ATA GTT TTC GCG CCC AAA TAC CGA AGA CAA GCG TT 3'; (ii) biotinylated capture probe: 5' GTG ATA TTT ACA GTT CCA TCG GG-biotin 3'; (iii) digoxigenin probe: 5' DIG-CTT GTC TTC GGT ATT TGG GCG CG 3'. The specificity of the assay was shown with a IS200 sequence with one mismatched base for each probe, designed in order to be in the centre of the hybridized sequence, as follows: 5' CAC ACC CGA TGG AAC TTT AAA TAT CAC ATA GTT TTC GCG CCC AAA TAA CGA AGA CAA GCG TT 3'.

Two primers, 23 and 21 nucleotides long, were designed for PCR amplification of IS200 sequence, in order to achieved: (i) an amplicon doubly labelled with biotin and digoxigenin at 5' and 3' ends, respectively, using a biotinylated and digoxigenin primer; (ii) an amplicon single-labelled with biotin using the biotinylated primer and a ‘usual’ primer—i.e. without any modification.

The primer sequences were: Biotinylated IS200 up: 5' bio-ATG GGG GAC GAA AAG AGC TTA GC 3', whose 5' end is 194 bp from IS200 5' end, DIG-IS200 down: 5' DIG-CTC CAG AAG CAT GTG AAT ATG 3' and IS200 down: 5' CTC CAG AAG CAT GTG AAT ATG 3', whose 5' ends are 394 bp from IS200 5' end.

The synthetic sequences were all purchased from TIB-MOLBIOL (Berlin, Germany).

The Expand High Fidelity PCR System Kit (Roche Molecular Biochemicals) was used for performing the PCR.

All other reagents as were of the highest available grade. AntiDigoxigenin-POD Fab fragments, Cat. No. 1207733, used as enzyme label was purchased from Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germany).

Aqueous solutions were: standard saline citrate (20× SSC) (3.0 M NaCl, 0.3 M trisodium citrate, pH 7.0); hybridization solution 5× SSC (with or without the addition of 0.5% w/v SDS and 50% v/v formamide); Tris Buffer (0.1 M Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.5); blocking Tris buffer (2% w/v BSA, 0.1% w/v Tween 20 and 5 mM EDTA, in 0.1 M Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.5).

2.3. DNA amplification of the IS200 element specific for *Salmonella*. The different strategies

Amplification and double labelling. The PCR was performed as explained in the Supporting information section, containing each labelled primer (Biotinylated IS200 up and DIG-IS200 down). As the primers were labelled with biotin and digoxigenin, the amplicon was expected to be labelled by both biotin and digoxigenin in each extreme, respectively (Fig. 1B).

Amplification and single labelling. The PCR was performed in identical conditions as explained for ‘Amplification and double labelling’, but in this case, instead of the DIG-IS200 down primer, the IS200 down primer without any modification was used in order to obtain the single-labelled biotinylated amplicon.

PCR reactor: Amplification with magnetic primers. The magnetic primers were prepared by full covering of streptavidin-modified magnetic beads with the biotinylated IS200 up primer (Fig. 1C). The immobilization of 50 pmol biotinylated IS200 up primer was performed on variable quantities of magnetic beads (6.4×10^6 , 3.2×10^6 , 1.6×10^6 , 0.7×10^6 and 0.3×10^6). The amount of magnetic beads able to bind 50 pmol of ‘biotinylated IS200-up primer’, as described by the manufacturer, is 1.6×10^7 streptavidin-modified magnetic beads. The magnetic primers were prepared in a final volume of 140 μ l MilliQ water at 42 °C for 15 min with gentle stirring. A separation step was then performed by applying an external magnet in order to

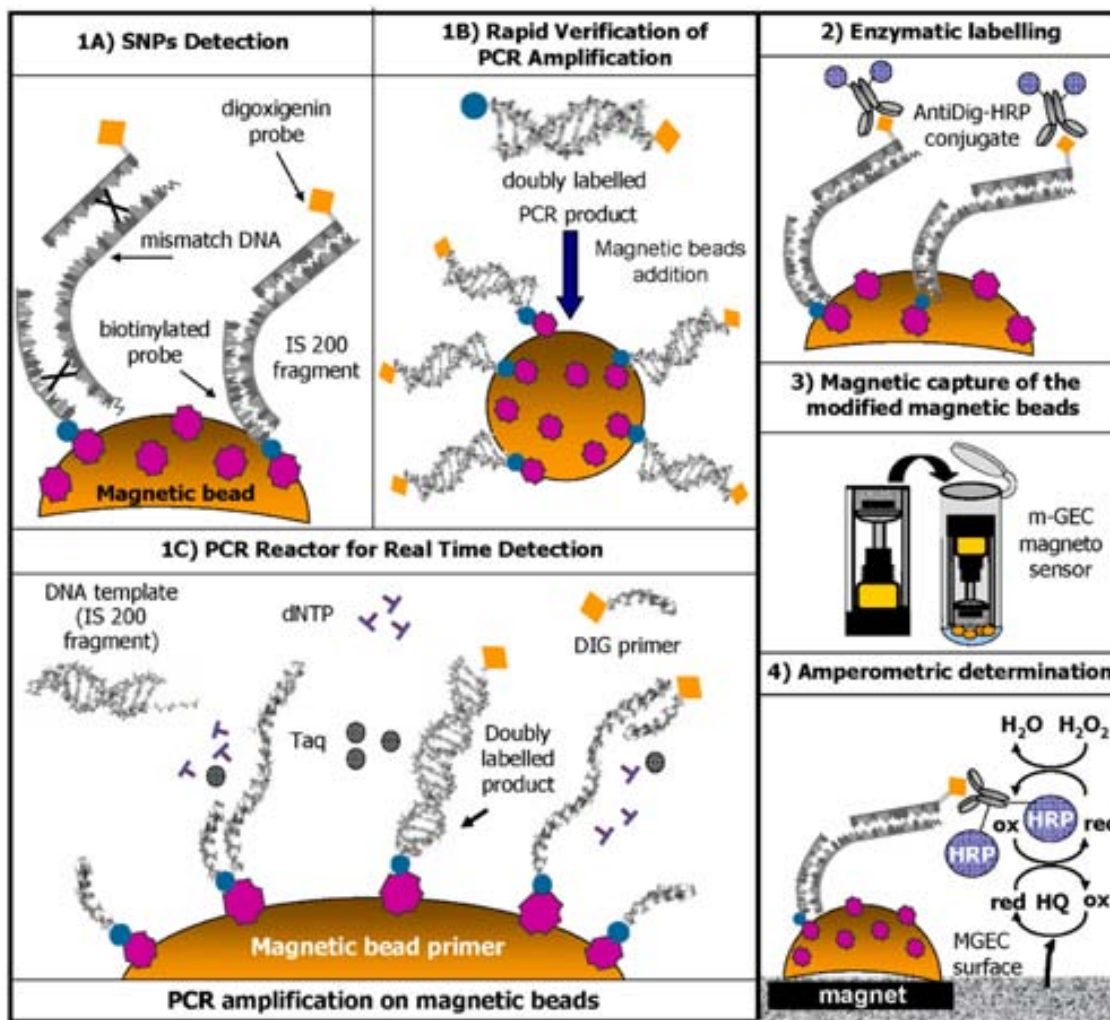


Fig. 1. Schematic representation of the electrochemical strategy for the detection of *Salmonella* spp. (A) One-step procedure based on immobilization of the biotinylated probe onto magnetic beads and hybridization with the ssDNA target, (B) rapid verification of PCR amplification based on the doubly labelled PCR product detection and (C) real-time PCR reactor based on PCR amplification with magnetic primers on streptavidin-modified magnetic beads. Enzymatic labelling (2), magnetic capture of the modified magnetic beads by the magneto electrode (m-GEC) (3), and chronoamperometric determination (4), are common steps for all of these strategies (A–C).

recover the full-covered magnetic beads (the magnetic primer) from the supernatant containing the excess of biotinylated IS200 up primer. Washing steps with 140 μ l MiliQ water for 10 min at 42 °C were then performed twice. After that, the different amounts of magnetic primer were introduced into PCR amplification as the IS200 up primer reagent. The PCR reaction was performed as explained in the [Supporting information](#) section. The amplicon was expected to be doubly labelled with magnetic beads attached to the biotinylated end ([Fig. 1C](#)).

The non-specific amplification reaction was performed – if any – by processing as negative control the PCR reaction performed with all the reagents except the DNA *Salmonella* template in the PCR mixture. Those blank controls were used in order to evaluate the non-specific adsorption in the electrochemical magneto biosensing assay.

2.4. Construction of the magneto graphite–epoxy composite (m-GEC) transducer and SEM characterization

The construction of the Magneto Graphite–epoxy composite (m-GEC) transducer is explained in detail in the [Supporting Information](#) section. The scanning electron microscopy (SEM) technique was used to evaluate the distribution of the magnetic beads on the surface of the m-GEC. The SEM was performed as explained in the [Supporting information](#) section.

2.5. Electrochemical DNA sequence-specific detection based on m-GEC and enzyme labelling

The protocol consists briefly of the following steps ([Fig. 1A](#)). (i) *One-step immobilization/hybridization procedure* in which the biotin-labelled capture probe is immobilized on the streptavidin magnetic beads, while the hybridization with the target and with a second complementary probe – in this case labelled with digoxigenin – is occurring at the same time; (ii) enzymatic labelling using as enzyme label the antibody anti-Dig-HRP; (iii) magnetic capture of the modified magnetic beads; (iv) amperometric determination based on the enzyme activity by adding H_2O_2 and using hydroquinone as a mediator ([Fig. 1](#), steps 1A, 2, 3 and 4).

The detailed experimental procedure is described in the [Supporting information](#) section. After the final washing steps, the modified magnetic beads were captured by dipping the electrode inside the reaction tube.

The evaluation of the non-specific adsorption was performed by adding all reagents except the DNA target.

2.6. SNPs electrochemical detection based on m-GEC and enzyme labelling

The selectivity of the new electrochemical genomagnetic assay was evaluated by comparing the signal obtained with an interfering probe consisting of the IS200 sequence with one mismatch for each probe ([Fig. 1](#), steps 1A, 2, 3 and 4). In this case, the electrochemical magneto biosensing strategy was performed with both the target and the mismatch target, with 5 \times SSC as hybridization buffer and under stringent conditions in

order to improve selectivity ([Pividori et al., 2001](#); [Hernández-Santos et al., 2004](#)). To achieve this purpose, 50% formamide in the hybridization buffer was used.

2.7. Rapid electrochemical verification of PCR amplification of *Salmonella*

The protocol consists briefly of the following steps: (i) DNA amplification and double-labelling of *Salmonella* IS200 insertion sequence; (ii) immobilization of the doubly labelled amplicon in which the biotin extreme of the ds-DNA amplicon was immobilized on the streptavidin magnetic beads; (iii) enzymatic labelling using as enzyme label the antibody anti-Dig-HRP able to bond the other labelled end of the ds-DNA amplicon; (iv) magnetic capture of the modified magnetic beads; (v) amperometric determination ([Fig. 1](#), steps 1B, 2, 3 and 4).

After the DNA Amplification and Double Labelling of the IS200 element specific for *Salmonella* spp., a dilution of the amplified product coming directly from the PCR was prepared in 5 \times SSC. The Immobilization of the doubly labelled amplicon was achieved by adding the amplicon to 6.2×10^6 streptavidin magnetic beads. The immobilization was performed in 5 \times SSC solution at a final volume of 140 μ l for 30 min at 42 °C. All the experimental conditions for the following steps were performed as detailed explained in the [Supporting information](#) section.

2.8. Specific electrochemical detection of the *Salmonella* PCR amplification product

In this case, the protocol consists briefly of the following steps: (i) DNA amplification and single-labelling of *Salmonella* IS200 insertion sequence; (ii) immobilization of the single-labelled amplicon in which the biotin extreme of the ds-DNA amplicon was immobilized on the streptavidin magnetic beads; (iii) amplicon denaturation by increasing the temperature at 95 °C; (iv) hybridization with a second DIG-IS200 probe; (v) enzymatic labelling using as enzyme label the antibody anti-Dig-HRP able to bond the other labelled extreme of the ds-DNA amplicon; (vi) magnetic capture of the modified magnetic beads; (vii) amperometric determination.

The detailed experimental procedure is described in the [Supporting information](#) section. After the final washing steps, the modified magnetic beads were captured by dipping the electrode inside the reaction tube.

A variation of this protocol was performed by changing the order of the steps. In this case, the protocol was performed as follows: (i) DNA amplification and single-labelling of *Salmonella* IS200 insertion sequence; (ii) amplicon denaturation by increasing the temperature at 95 °C; (iii) hybridization with a second DIG-IS200 probe; (iv) immobilization of the single-labelled amplicon in which the biotin extreme of the ds-DNA amplicon was immobilize on the streptavidin magnetic beads; (v) enzymatic labelling using as enzyme label the antibody anti-Dig-HRP able to bond the other labelled extreme of the ds-DNA amplicon; (vi) magnetic capture of the modified magnetic beads; (vii) amperometric determination.

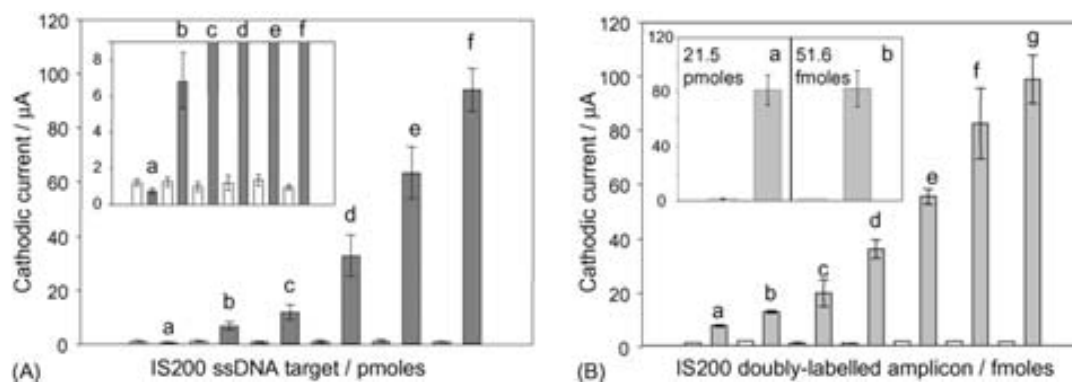


Fig. 2. (A) Electrochemical DNA sequence-specific detection with increasing amounts of IS200 sequence specific of *Salmonella*. Gray bars show the increasing amount of DNA IS200 target specific for *Salmonella* (a: 0.9 pmol; b: 2.1 pmol; c: 3.8 pmol; d: 9.0 pmol; e: 16.6 pmol; f: 45 pmol), while white bars show the corresponding non-specific adsorption. In all cases, 205 pmol biotinylated probe, 225 pmol digoxigenin probe, 60 µg AntiDig-HRP and 1.6×10^6 magnetic beads were used. (B) Rapid electrochemical verification of PCR amplification of *Salmonella enterica serovar Typhimurium* ATCC 14028 with the doubly labelled IS200 primer set. Gray bars show the signal by increasing the amount of IS200 doubly labelled amplicon (from 2.8 to 75.4 fmol), performed with the following dilution of the doubly labelled PCR final product (a: 1/400; b: 1/200; c: 1/100; d: 1/50; e: 1/30; f: 1/20; g: 1/15) simulating an increasing number of PCR cycles while white bars show the total electrochemical signal processing the negative PCR control. The frame within (B), right, shows the electrochemical signal achieved by 51.6 fmol of *Salmonella* amplicon following the rapid electrochemical verification of PCR amplification and, left, by 21.5 pmol of DNA target following the DNA sequence-specific detection. In all cases 60 µg antiDig-HRP and 6.2×10^6 magnetic beads were used. Other experimental details are: phosphate buffer 0.1 mol L^{-1} , KCl 0.1 mol L^{-1} , pH 7.0; mediator, hydroquinone 1.81 mmol L^{-1} ; substrate, H_2O_2 4.90 mmol L^{-1} ; applied potential = -0.1 V (vs. Ag/AgCl). All data are given as average \pm S.D. In all cases, $n = 3$.

2.9. PCR reactor for the real-time electrochemical detection of *Salmonella*

The protocol consists briefly on the following steps: (i) *in situ* DNA amplification and double-labelling of *Salmonella* IS200 insertion sequence on streptavidin-modified magnetic beads by using a magnetic primer; (ii) enzymatic labelling using as enzyme label the antibody anti-Dig-HRP able to bond the other labelled extreme of the ds-DNA amplicon; (iii) magnetic capture of the modified magnetic bead; (iv) amperometric determination (Fig. 1, steps 1C, 2, 3 and 4). The detailed experimental procedure is described in the Supporting information section.

2.10. Amperometric determination

The 'Amperometric determination' is based on the activity of the HRP enzyme of the marker, as previously reported (Pividori et al., 2001, 2003), by using hydroquinone as a mediator and H_2O_2 (the HRP substrate), which was added to a final concentration of 4.90 mmol L^{-1} . Fig. 1, step 4 represents the reactions that occur at the m-GEC sensors surface polarized at -0.100 V (versus Ag/AgCl) upon H_2O_2 addition in the presence of hydroquinone.

3. Results and discussion

The results for SEM characterization of m-GEC modified with the magnetic beads are shown in the Supporting information section.

3.1. Electrochemical DNA sequence-specific detection based on m-GEC and enzyme labelling

The chronoamperometric response of the magneto DNA biosensors with increasing amounts of DNA target (from 0.9 to

45 pmol) is shown in Fig. 2A, while the concentration of biotinylated probe, digoxigenin probe, AntiDig-HRP and magnetic beads remaining constant. The signal clearly increases when increasing the amount of IS200 sequence related to *Salmonella* spp. (gray bars). Moreover, the contribution of the non-specific adsorption was constant and almost negligible (white bars). The non-specific adsorption is mostly related to the adsorption of the enzyme conjugate. The inset in Fig. 2A, shows detailed the limit of detection region. The lowest amount of analyte producing a useful analytical signal was found to be 2.1 pmol.

3.2. SNPs electrochemical detection based on m-GEC and enzyme labelling

The selectivity of the new electrochemical magneto biosensing assay was evaluated by comparing the signal obtained with an interfering probe consisting of the IS200 sequence with one mismatch for each probe. As shown in Fig. 3A, similar results were obtained for the two sequences when using $5 \times \text{SSC}$ as hybridization buffer. When adding 50% (v/v) formamide to the buffer, it was possible to clearly distinguish the two mismatches bases, as shown in Fig. 3B. The mismatch sequence produced an 80% lower analytical signal in comparison with the full matching nucleotide. The use of stringent experimental conditions decreased the analytical signal up to 10 times, obtaining less sensibility with the assay but distinguishing a single-point mutation in DNA.

3.3. Rapid electrochemical verification of PCR amplification of *Salmonella*

The electrochemical magneto biosensing strategy was applied for the rapid detection of PCR amplification of *Salmonella* spp., using a previously amplified doubly labelled

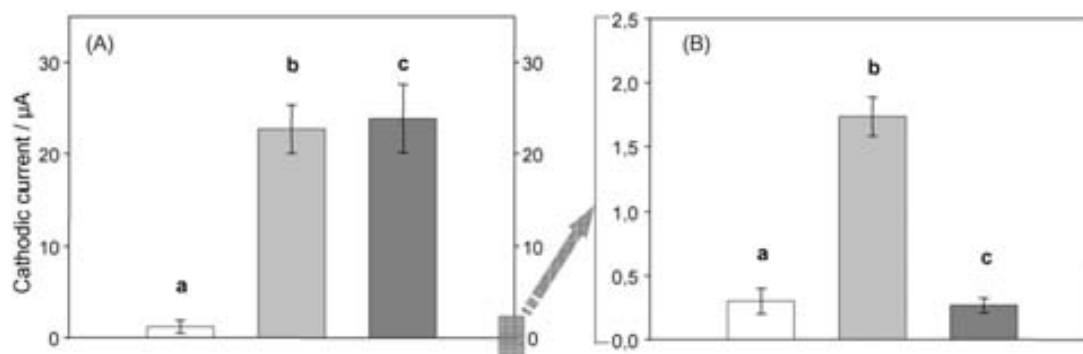


Fig. 3. Selectivity study performed with (A) 5× SSC as hybridization solution and with (B) 50% (v/v) formamide in 5× SSC as hybridization solution. Schematic representation: (a) non-specific adsorption (omitting addition of the DNA target), (b) 22.1 pmol of IS200 DNA target and (c) 22.1 pmol two-bases mismatch IS200 sequence. In all cases: 205 pmol biotinylated probe, 225 pmol digoxigenin probe, 60 μg antiDig-HRP and 1.6×10^6 magnetic beads. Other experimental details as Fig. 2.

PCR product with biotin and digoxigenin in each DNA end.

This primer set amplified exclusively the IS200 insertion sequence, producing only the expected 201 pb fragment according to the agarose gel electrophoresis (shown in the [Supporting information](#) section). The amplicon was immobilized on the streptavidin-modified magnetic beads and then labelled with the antibody AntiDig-HRP by means of the double-labelling with biotin and digoxigenin, respectively. The amperometric response of the doubly labelled product was then evaluated. [Fig. 2B](#) shows the calibration plot obtained with different dilutions of the doubly labelled PCR final product (1/400, 1/200, 1/100, 1/50, 1/30, 1/20 and 1/15) simulating an increasing number of PCR cycles. The plot is represented against the PCR amplicon concentration determined spectrophotometrically at 260 nm. A linear range for the quantification of the PCR amplicon is observed from 2.8 to 75.4 fmol giving a sensitivity of 1315 μA per decade and a regression coefficient of 0.980. The non-specific adsorption, performed with a PCR blank control omitting the addition of *Salmonella* template during the amplification, was negligible for all the evaluated concentration range. This kind of assay is useful when the set of primers for PCR amplifies specifically the sequence of interest. In this case, the PCR reaction produces only the expected 201 pb fragment according to the agarose gel electrophoresis. The amplified product can be rapidly and sensitively detected by this strategy. The inset [Fig. 2B](#), shows comparatively that an amperometric signal of almost 80 μA was obtained with 51.6 fmol of doubly labelled PCR product with the ‘Rapid Electrochemical Verification Strategy’, while the same signal was achieved with 21.5 pmol of IS200 target by the ‘Electrochemical DNA sequence-specific detection based on m-GEC Strategy’. In both cases, R.S.D. of 16% and 14%, respectively, were obtained. The latter is a sandwich format whereon both a biotinylated and digoxigenin probes detected the synthetic DNA target by its double hybridization, as previously explained. The loss in sensitivity up to 1000 times for *Salmonella* by using the sandwich format can be explained because two hybridizations were performed during the assay, with both the biotin and digoxigenin probes whereas higher signals were obtained when no hybridization steps were performed

in PCR amplicon detection. However, regarding the selectivity, the sandwich format is able to detect a single mismatch, as shown in [Fig. 3](#).

3.4. Specific electrochemical detection of the *Salmonella* PCR amplification product

A specific detection of the PCR product was achieved by a further hybridization step with a signalling probe. In this case, the PCR was performed with a set of primer being the ‘up’ primer modified with biotin, in order to obtain a biotinylated amplicon in the 5’ end. The single-labelled and double-stranded amplicon was then submitted to high temperature (95 °C) to produce the double strand denaturalization. After this step, the biotinylated strand of the amplicon remained bonded to the magnetic bead and was able to be hybridized with the digoxigenin-modified signalling probe, as shown in [Fig. 4B\(i\)](#). The corresponding electrochemical signal is shown in [Fig. 4A\(i\)](#), which shows a big signal due to the non-specific adsorption. This higher level of non-specific adsorption was suspected to be produced by a change in the protein conformation of the streptavidin magnetic bead due to the denaturing step at 95 °C, which produce different interactions with the reagents. To confirm that issue, the order of the steps in this assay was changed. Firstly, the single-labelled PCR product was submitted to a denaturalization step, and then to the hybridization with the DIG-IS200 probe in order to avoid the heating of the magnetic beads. Finally the magnetic beads were added in order to attach the amplicon ([Fig. 4B\(ii\)](#)). As can be seen in [Fig. 4A\(ii\)](#), the new assay permits an improved identification between the negative PCR control and the amplified product. The signal-to-non-specific adsorption ratio increase from 1.36 (i) to 4.00 (ii).

This strategy is useful when the set of primers for PCR amplifies not only the sequence of interest but also other non-specific fragments, which are detected by agarose gel electrophoresis as a line with several bands, i.e., several products with different MW. In this case, it is necessary to confirm that the expected fragment was amplified. This confirmation is normally performed by means of a second hybridization in order to determine the internal sequence of the amplicon.

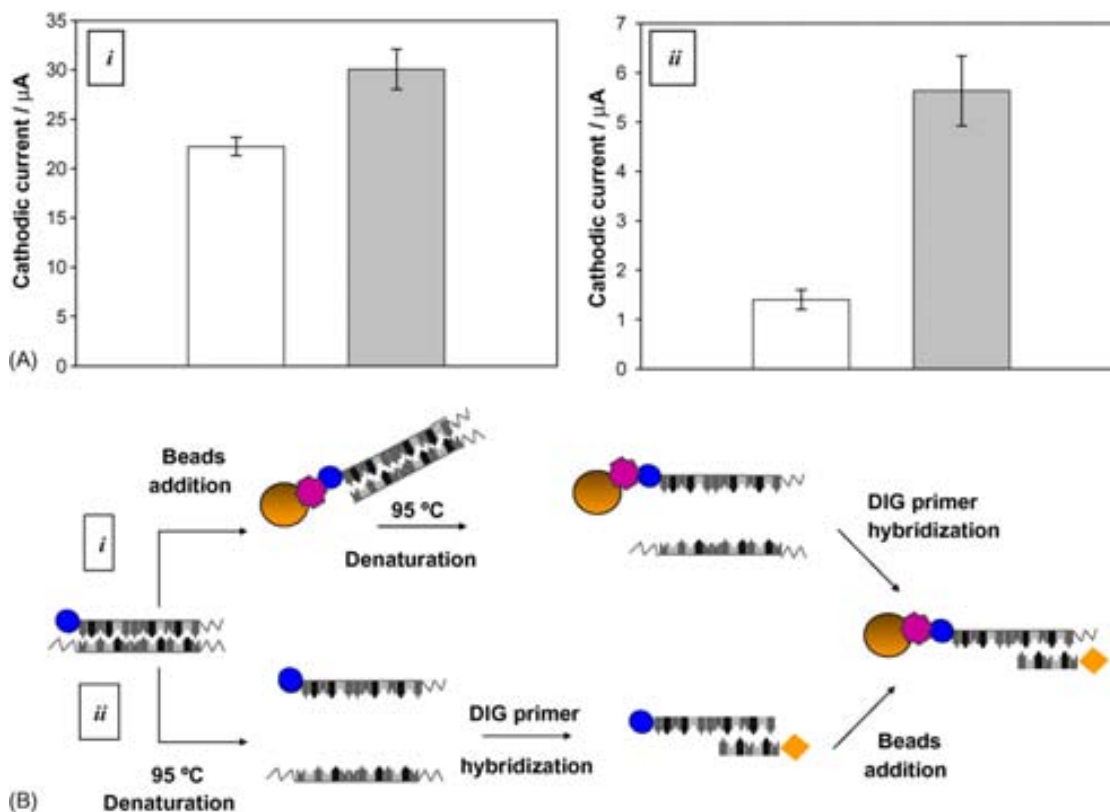


Fig. 4. (A) Specific electrochemical signal based on the single-labelled PCR amplification of *Salmonella enterica serovar Typhimurium ATCC 14028*, performed by: (i) heating magnetic beads during the denaturation step and (ii) addition of magnetic beads after the denaturation step. In both cases white bars show the non-specific signal coming from the negative PCR control, while gray bars show the signal of the single-labelled amplified product hybridized with a second DIG-IS200 probe. 225 pmol digoxigenin probe, 60 μg AntiDig-HRP and 6.2×10^6 magnetic beads were used. Other experimental details as in Fig. 2. (B) Schematic representation of the specific electrochemical detection of the *Salmonella* PCR single-labelled amplification product.

3.5. PCR reactor for the real-time electrochemical detection of *Salmonella*

A novel PCR assay was done by adding the streptavidin-modified magnetic beads fully covered by the biotinylated IS200 up primer (the 'magnetic primer'), to the PCR reaction, as shown in Fig. 1C. A doubly labelled PCR product attached to the magnetic beads was thus achieved by *in situ* amplification of the DNA template on the magnetic beads. Fig. 5 shows the amperometric response achieved by the doubly labelled amplicon on the magnetic beads. Each point of the plot corresponds to different PCR amplification assays, using increasing amount of magnetic beads (2.5, 5.0, 12.0, 25.0 and 49.0 μg), respectively. As can be seen, the enzymatic signal increases with an increment of the amount of magnetic beads. An increasing signal is observed up to 12.0 μg of magnetic beads reaching a plateau with higher amount of magnetic beads. The non-specific adsorption increases linearly with the amount of magnetic beads (Fig. 5, white dots). Nevertheless, there is a clear difference in the electrochemical signal between the PCR amplification of the sample and the negative PCR control (omitting the addition of DNA template). The linear increment in the non-specific adsorption signal with the amount of magnetic beads can be explained by a modification in the structure of the magnetic beads, when submitted to high temperatures during the PCR cycles, as previously explained.

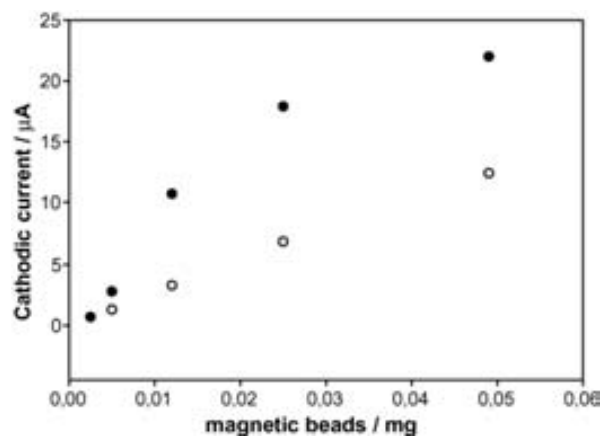


Fig. 5. PCR reactor for the real-time electrochemical detection of *Salmonella enterica serovar Typhimurium ATCC 14028* based on the doubly labelled PCR amplification performed with the magnetic primer. White dots show the non-specific electrochemical signal processing the negative PCR control, while the black dots show the increasing signal of DNA IS200 doubly labelled amplicon onto magnetic beads. Sixty micrograms AntiDig-HRP was used. Other experimental details as Fig. 2.

4. Conclusions

A novel electrochemical genomagnetic strategy for the DNA detection has been developed. The utility of this novel strat-

egy was demonstrated for the detection of a PCR amplicon of the IS200 insertion sequence coming from real samples of *Salmonella* spp. in different PCR formats.

The use of magnetic beads provided improved features regarding sensitivity and selectivity of the assay. Streptavidin-modified magnetic beads easily immobilized the DNA hybrid on the m-GEC transducer, avoiding difficult and time-consuming immobilization procedures as those previously reported. Moreover, the magnetic beads provided an easy way for completely removing the non-specific adsorption.

On the other hand, the magneto biosensing strategy in a sandwich format performed under stringent conditions allowed an efficient way to detect a single mismatch for each probe. Therefore the assay can be used for the easy, cheap and rapid detection of SNPs.

The rapid and very sensitive verification of the PCR amplicon related to *Salmonella* was achieved with 2.8 fmol of amplified product. This strategy can be used for the electrochemical real-time quantification of amplicon since a linear relationship with the amount of amplified product was obtained. This strategy is only useful when a unique and specific band is observed by gel electrophoresis, because of the high specificity of the set of primers being used in the PCR for the amplification of the *Salmonella* genome. On the contrary, if the set of primers amplifies not only the sequence of interest but also other non-specific fragments, it is necessary to confirm the internal sequence of the amplicon by a second hybridization with a digoxigenin signalling probe. In this case, a single labelling with biotin during PCR was performed followed by a further selective hybridization with a digoxigenin signalling probe.

Moreover, magnetic primers were used for *in situ* amplification on magnetic beads of the *Salmonella* genome and the further electrochemical detection of the amplified product. The DNA amplification on magnetic beads by using the magnetic primer with electrochemical detection using m-GEC electrodes results in a rapid, cheap, robust and environmentally friendly device which would allow the detection of pathogenic species on food

samples for *Hazard Analysis Critical Control Point* (HACCP) programs.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bios.2006.08.048.

References

- Alegret, S., 1996. *Analyst* 121, 1751–1758.
- Del Giallo, M.L., Ariksoysal, D.O., Marrazza, G., Mascini, M., Ozsoz, M., 2005. *Anal. Lett.* 38, 2509–2523.
- Erdem, A., Pividori, M.I., Lermo, A., Bonanni, A., del Valle, M., Alegret, S., 2006. *Sens. Actuators B—Chem.* 114, 591–598.
- Fojta, M., Havran, L., Billova, S., Kostecka, P., Masarik, M., Kizek, R., 2003. *Electroanalysis* 15, 431–440.
- Gibert, I., Barbé, J., Casadesús, J., 1990. *J. Gen. Microbiol.* 136, 2555–2560.
- Haukanes, B.I., Kvam, C., 1993. *Biotechnology* 11, 60–63.
- Hernández-Santos, D., Díaz-González, M., González-García, M.B., Costa-García, A., 2004. *Anal. Chem.* 76, 6887–6893.
- Humphrey, T., Stephens, P., 2003. *Salmonella* detection, in encyclopedia of food science and nutrition, 5079–5084.
- Kara, P., Meric, B., Zeytinoglu, A., Ozsoz, M., 2004. *Anal. Chim. Acta* 518, 69–76.
- Kerman, K., Saito, M., Morita, Y., Takamura, Y., Ozsoz, M., Tamiya, E., 2004. *Anal. Chem.* 76, 1877–1884.
- Lam, S., Roth, J.R., 1983. *Cell* 34, 951–960.
- Miyahara, H., Yamashita, K., Kanai, M., Uchida, K., Takagi, M., Kondo, H., Takenaka, S., 2002. *Talanta* 56, 829–835.
- Palecek, E., Masarik, M., Kizek, R., Kuhlmeier, D., Hassmann, J., Schülein, J., 2004. *Anal. Chem.* 76, 5930–5936.
- Pividori, M.I., Merkoçi, A., Alegret, S., 2001. *Analyst* 126, 1551–1557.
- Pividori, M.I., Merkoçi, A., Alegret, S., 2003. *Biosens. Bioelectron.* 19, 473–484.
- Pividori, M.I., Alegret, S., 2005. *Anal. Lett.* 38, 2541–2565.
- Tietjen, M., Fung, D.Y.C., 1995. *Crit. Rev. Microbiol.* 21, 53–83.
- Tolley, S.E., Wang, H.-K., Smith, R.S., Christensen, D.A., Herron, J.N., 2003. *Anal. Biochem.* 315, 223–237.
- Wang, J., Kawde, A.-N., 2002. *Electrochem. Commun.* 4, 349–352.
- Ye, Y.K., Zhao, J.H., Yan, F., Zhu, Y.L., Ju, H.X., 2003. *Biosens. Bioelectron.* 18, 1501–1508.
- Zacco, E., Pividori, M.I., Alegret, S., Galve, R., Marco, M.P., 2006. *Anal. Chem.* 78, 1780–1788.

IN SITU DNA AMPLIFICATION WITH MAGNETIC PRIMERS FOR THE ELECTROCHEMICAL DETECTION OF FOOD PATHOGENS

Supporting information

A. I. Lermo[‡], S. Campoy[§], J. Barbé[#], S. Hernández[‡], S. Alegret[‡], M.I. Pividori^{**}

[‡] Grup de Sensors i Biosensors, Departament de Química, Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra, Catalonia, Spain

[§] Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA), Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Catalonia, Spain.

[#] Unitat de Microbiologia, Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra, Catalonia, Spain

[‡] Departament de Química Analítica, Universitat de Barcelona. 08028 Barcelona, Catalonia, Spain

DNA Amplifications of the IS200 Element Specific for Salmonella

All oligonucleotide stock solutions were prepared with sterilized and bidistilled water and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until required.

The amplification of DNA carrying an IS200 element can be expected to yield a doubly-labelled and single-labelled fragment of 201 bp.

Amplification and Double Labelling

The PCR was performed in a 100 μl of reaction mixture containing PCR template (approximately 200 ng of purified DNA coming from *Salmonella* enterica serovar Typhimurium ATCC 14028). Each reaction contains 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of each deoxynucleotide triphosphate (dATP, dGTP, dCTP, and dTTP), 0.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of each labelled primer (Biotinylated IS200 up and DIG-IS200 down) and 5 U of polymerase. The reaction was carried out in buffer containing 1.5 mmol L^{-1} MgCl_2 . The amplification mixtures were exposed to an initial denaturation step at 95 $^{\circ}\text{C}$ for 2 min followed by 30 cycles of 95 $^{\circ}\text{C}$ for 30 s, 53 $^{\circ}\text{C}$ for 30 s, and 72 $^{\circ}\text{C}$ for 30 s, and a last step of 7 min at 72 $^{\circ}\text{C}$. The amplification included a blank as a control, which contained all

reagents except the target DNA. The amplification (and doubly-labelled) products were analyzed by electrophoresis in 3 % agarose gels in buffer 0.4 M tris-acetate, 1 mM EDTA pH 8.0, containing 0.5 µg/mL ethidium bromide, and a DNA size marker. The DNA bands in the gels were visualized by UV transillumination and they were photographed, producing only the expected 201 pb (Figure i). As the primers were labelled with biotin and digoxigenin, the amplicon was expected to be labelled by both biotin and digoxigenin in each extreme, respectively.

PCR reactor. Amplification with Magnetic Primers

The magnetic primers were prepared by full covering of streptavidin-modified magnetic beads with the biotinylated IS200 up primer (Figure 1, C). The immobilization of 50 pmols biotinylated IS200 up primer was performed on variable quantities of magnetic beads (6.4, 3.2, 1.6, 0.7 and 0.3×10^6). The amount of magnetic beads able to bind 50 pmols of biotinylated IS200 up primer as described by the manufacturer was 1.6×10^7 streptavidin-modified magnetic beads. The magnetic primers were prepared in a final volume of 140 µl MiliQ water at 42° C for 15 min with gentle stirring. A separation step was then performed by applying an external magnet in order to separate the full-covered magnetic beads (the magnetic primer) from the supernatant containing the excess of biotinylated IS200 up primer. This is followed by two washing steps with 140 µl MiliQ water for 10 min at 42 ° C. After that, the different amounts of magnetic primer were introduced into PCR amplification as the IS200 up primer reagent. The reaction was performed in a 50 µl of reaction mixture containing 100 ng of PCR template, 200 µmol L⁻¹ of each deoxynucleotide triphosphate (dATP, dGTP, dCTP, and dTTP), 0.5 µmol L⁻¹ of the DIG-IS200 down primer and 2.5 U of polymerase. Other conditions were the same that previously explained for the '*Amplification and Double Labelling*'. The amplicon was expected to be doubly-labelled with magnetic beads attached to the biotinylated end.

In all the amplifications, the non-specific amplification reaction was performed –if any– by processing as negative control the PCR reaction performed with all the reagents except the DNA Salmonella template in the PCR mixture. Those blank controls were used in order to evaluate the non-specific adsorption in the electrochemical magneto biosensing assay.

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), number of magnetic beads (6.2×10^6) but different resolutions (2, 10, 50, 100 and 500 μm) were used.

Construction of the Magneto Graphite-epoxy Composite (m-GEC) Transducer and SEM Characterization

The steps are schematically explained in *Figure ii*. A metal screw (6 mm d) (ii) was fitted to a female electric connector with a metal end of 2 mm diameter (i). A copper disk with a diameter of 5.9 mm was dipped few seconds in 1:1 HNO_3 in order to remove copper oxide. After dried, it was soldered with Sn wire to the female electric connector end (iii). The female electric connector was set inside the cylindrical PVC tube (iv) (6 mm id, 8 mm od, 18 mm long). A gap with a depth of 3 mm is thus obtained in the end of the body electrode. Meanwhile, the graphite-epoxy composite (GEC) paste was prepared 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. Graphite powder (particle size 50 μm , BDH, UK) and the epoxy resin in a 1:4 (w/w) ratio was then thoroughly hand mixed to ensure the uniform dispersion of the graphite powder throughout the polymer. A thin layer of the resulting paste was firstly placed in the PVC cylindrical sleeve body (6 mm id), which has the electrical contact to a depth of 3 mm to isolate the copper disc (v). A neodymium small magnet (3 mm i.d.) was placed into the center of this electrode (vi). After filling the electrode body gap completely with the soft paste, the electrode was tightly packed (vii). The composite material was cured at 90 °C for three days until the paste become completely rigid.

In all cases, prior to each use the surface of the electrode was wet with doubly distilled water and then polished, 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. The reproducibility of the construction of the sensors based on GEC and the polishing procedure have been previously reported by our group (Pividori et al., 2001).

The m-GEC electrode was able to capture magnetic beads if placed on 2 mL eppendorf tubes (ix, x). The scanning electron microscopy (SEM) technique was used to evaluate the distribution of the magnetic beads on the surface of the m-GEC (xii, & Figure iii).

Electrochemical DNA Sequence-Specific Detection based on m-GEC and Enzyme Labelling

During the 'One step immobilization/hybridization procedure', the target unique to the IS200 element for the *Salmonella* spp (IS200 target 62 mer), together with the biotinylated capture probe (205 pmols) and the digoxigenin probe (225 pmols) were added to 1.6×10^6 streptavidin magnetic beads. The immobilization/hybridization in one step was performed in 5 X SSC solution at a final volume of 140 μ l for 30 min at 42 °C. Two washing steps were then performed with 140 μ l 5 X SSC for 10 min at 42 °C. After that, the 'Enzymatic labelling step' was performed using as enzyme label the antibody anti-Dig-HRP (60 μ g) in blocking Tris buffer at a final volume of 140 μ l for 30 min at 42 °C. Two washing steps were then performed for 10 min at 42 °C in 140 μ l of Tris buffer. After the final washing steps, the modified magnetic beads were captured by dipping the electrode inside the reaction tube.

Rapid Electrochemical Verification of PCR Amplification of Salmonella spp

After the DNA Amplification and Double Labelling of the IS200 element specific for *Salmonella* spp, a dilution of the amplified product coming directly from the PCR was prepared in 5 X SSC. The Immobilization of the doubly-labelled amplicon was achieved by adding the amplicon to 6.2×10^6 streptavidin magnetic beads. The immobilization was performed in 5 X SSC solution at a final volume of 140 μ l for 30 min at 42 °C.

Two washing steps were then performed with 140 μ l 5 X SSC for 10 min at 42 °C. After that, the 'Enzymatic labelling step' was performed using as enzyme label the antibody anti-Dig-HRP (60 μ g) in blocking Tris buffer at a final volume of 140 μ l for 30 min at 42 °C. Two washing steps

were then performed for 10 min at 42 °C in 140 µl of Tris buffer. After the final washing steps, the modified magnetic beads were captured by dipping the electrode inside the reaction tube.

Specific Electrochemical Detection of the Salmonella PCR Amplification Product

A solution in 5 x SSC of the amplified product coming from the PCR was prepared. The Immobilization of the single-labelled amplicon was achieved by adding the amplicon to 6.2×10^6 streptavidin magnetic beads. The immobilization was performed in 5 X SSC solution at a final volume of 140 µl for 30 min at 42 °C. Two washing steps were then performed for 10 min at 42 °C in 140 µl of 5 x SSC solution. Then the denaturation step was performed during 5 min at 95 °C in 140 µl of 5 x SSC. The hybridization with the second probe, in this case modified with digoxigenin –the DIG-IS200 signaling probe– was made by incubating the sensor with the primer (225 pmoles) for 15 min at 42 °C. Two washing steps were then performed with 140 µl 5 X SSC for 10 min at 42 °C. After that, the ‘Enzymatic labelling step’ was performed using as enzyme label the antibody anti-Dig–HRP (60 µg) in blocking Tris buffer at a final volume of 140 µl for 30 min at 42 °C. Two washing steps were then performed for 10 min at 42 °C in 140 µl of Tris buffer. After the final washing steps, the modified magnetic beads were captured by dipping the electrode inside the reaction tube.

PCR Reactor for the Real-Time Electrochemical Detection of Salmonella

After the DNA Amplification on the magnetic beads, a solution in 5 X SSC of the amplified product coming directly from the PCR was prepared. Two washing steps were then performed for 10 min at 42 °C in 140 µl of 5 X SSC solution. After that, the ‘Enzymatic labelling step’ was performed using as enzyme label the antibody anti-Dig–HRP (60 µg) in blocking Tris buffer at a final volume of 140 µl for 30 min at 42 °C. Two washing steps were then performed for 10 min at 42 °C in 140 µl of Tris buffer. After the final washing steps, the modified magnetic beads were captured by dipping the electrode inside the reaction tube.

Results and discussion

SEM Characterization of m-GEC modified with the Magnetic Beads

The magnetic beads distribution on the surface of m-GEC magneto sensor was observed with scanning electron microscopy. Figure iii (A to E) shows an irregular disposition of the magnetic beads on the electrode. As can be seen in the picture taken with the lower resolution (0.5 mm) (Figure iii, E) 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 are followed by bare areas where the GEC transducer can be clearly observed. Figure iii (A to D) are taken from the thick areas where the magnetic beads form aggregates on the smooth surface of the electrode. This distribution of the 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. The formation of the aggregates and multilayer of magnetic beads on the m-GEC electrodes are not detrimental for the sensitivity of the assay since bare areas exist all over the m-GEC transducer. A uniform 2 μm size of the magnetic beads is also observed in the Figure iii, A.

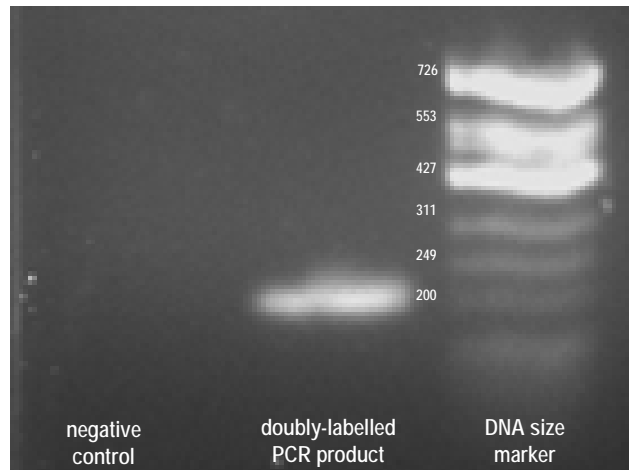


Figure i. Agarose gel electrophoresis of doubly-labeled PCR product (lane 2) obtained from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 with the doubly-labeled primer set IS200. Lane 3: Molecular weight marker (Φ X174-Hinf I genome). No band was obtained with sterile water used as a negative PCR control (lane 1).

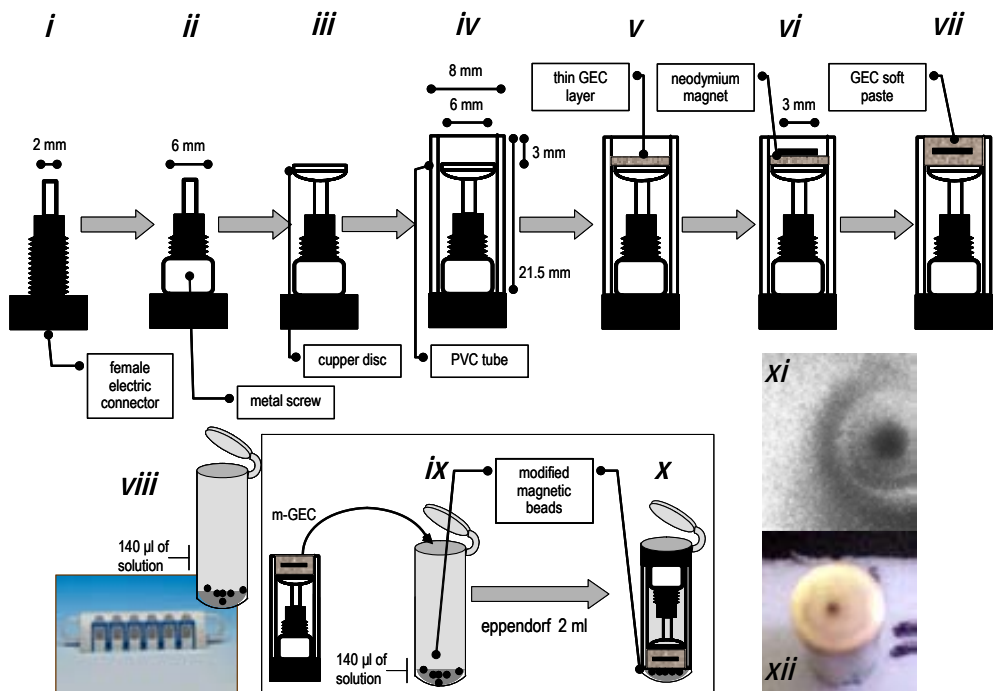


Figure ii. Schematic representation of the construction of m-GEC (steps i to vii) and manipulation of the m-GEC electrodes, comprising the immobilization of DNA on magnetic beads (viii) following by capturing the modified beads on m-GEC electrode (ix and x). Scanning electron microphotographs showing the captured magnetic beads on the surface of m-GEC magneto sensor (500 μ m, 15 kV) and a photograph showing the aspect of the sensor with the immobilized beads are also shown (xi and xii, respectively) (Number of magnetic beads: 6.2×10^6).

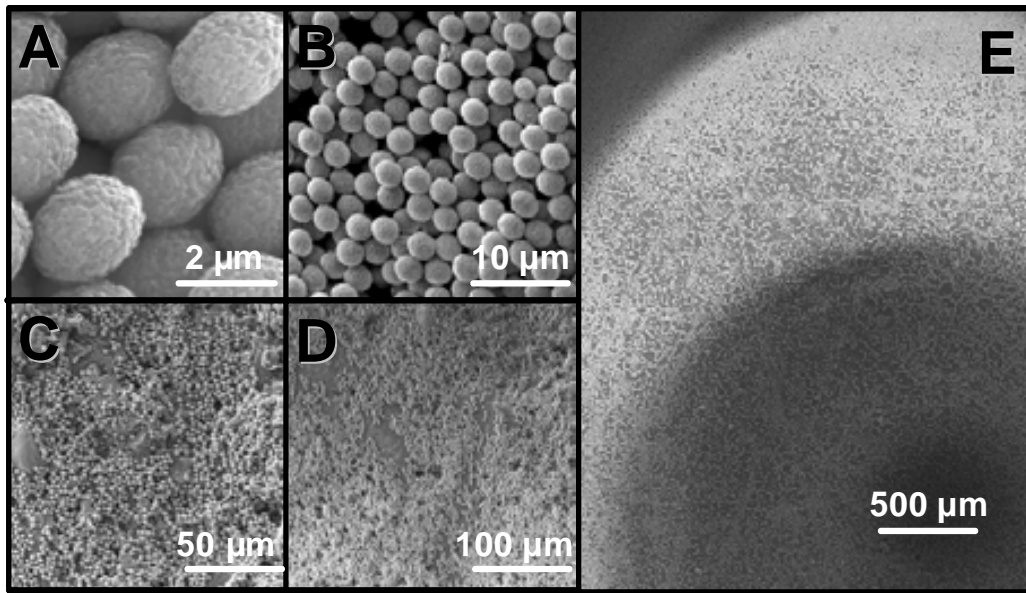


Figure iii. Scanning electron microphotographs showing the captured magnetic beads on the surface of m-GEC magneto sensor. Resolution: 2 μm (A), 10 μm (B), 50 μm (C), 100 μm (D) and 500 μm (E). Acceleration voltage: 15 kV. Number of magnetic beads: 6.2×10^6 .

Procedure 31. Rapid electrochemical verification of PCR amplification of *Salmonella spp.* based on m-GEC electrodes

Comprehensive Analytical Chemistry, 49 (2007) e221-e226

María Isabel Pividori, Anabel Lermo, Susana Campoy, Jordi Barbé, Salvador Alegret

Rapid electrochemical verification of PCR amplification of *Salmonella* spp. based on m-GEC electrodes

María Isabel Pividori, Anabel Lermo, Susana Campoy, Jordi Barbé and Salvador Alegret

31.1 OBJECTIVES

(a) To perform a PCR amplification of the IS200 insertion sequence of *Salmonella* spp. with double labeling of the amplicon by using labeled primer. (b) To construct a magneto graphite–epoxy composite (m-GEC) electrode. (c) To quantify the double-labeling amplification products of *Salmonella* spp. by using an electrochemical strategy based on magnetic beads and m-GEC electrode.

31.2 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.), 21.5 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 0.1 M 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 studying the distribution of the magnetic beads on the m-GEC electrode surface.

31.3 CHEMICALS AND BIOCHEMICALS

Magnetic beads modified with streptavidin (Dynabeads M-280 Streptavidin, Prod. No. 112.05, Dynal Biotech ASA, Oslo, Norway). AntiDigoxigenin-POD Fab fragments Cat. No. 1120773910, (Roche Biochemicals Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Hydroquinone (Sigma), hydrogen peroxide (Merck, Germany).

Primer sequences (TIB-MOLBIOL, Germany): Biotinylated IS200 up: 5' bio- ATG GGG GAC GAA AAG AGC TTA GC 3', whose 5' end is 194 bp from IS200 5' end, DIG-IS200 down: 5' DIG- CTC CAG AAG CAT GTG AAT ATG 3', whose 5' end is 394 bp from IS200 5' end.

Expand High Fidelity PCR System Kit (Roche Molecular Biochemicals).

Standard saline citrate (20 × SSC) (3.0 M NaCl, 0.3 M trisodium citrate, pH 7.0); Tris Buffer (0.1 M Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.5); blocking Tris buffer (2% w/v BSA, 0.1% w/v Tween 20 i 5 mM EDTA, in 0.1 M Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.5).

Supporting electrolyte (0.1 M phosphate buffer, 0.1 M KCl, pH 7.0)

31.4 CONSTRUCTION OF THE m-GEC ELECTRODE

The steps are schematically explained in Fig. 31.1.

- (1) To a female electric connector with a metal end of 2 mm diameter (i), fit a metal screw (6 mm diameter) (ii).
- (2) In the meantime, clean a copper disk with a diameter of 5.9 mm by dipping it for few seconds in 1:1 HNO₃ (to remove copper oxide), rinse it well with bidistilled water, dry it with towel paper, and solder it to the female electric connector end with Sn wire (iii).
- (3) Using a hammer, set the female electric connector inside a cylindrical PVC tube (iv) (6 mm i.d., 8 mm o.d., 21.5 mm long). A gap with a depth of 3 mm is thus obtained at the end of the body electrode.
- (4) Meanwhile, prepare the graphite–epoxy composite (GEC) 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. Mix the soft resulting paste thoroughly again until it becomes homogenous (approximately for 30 min) [1].

Rapid electrochemical verification of PCR amplification of *Salmonella* spp.

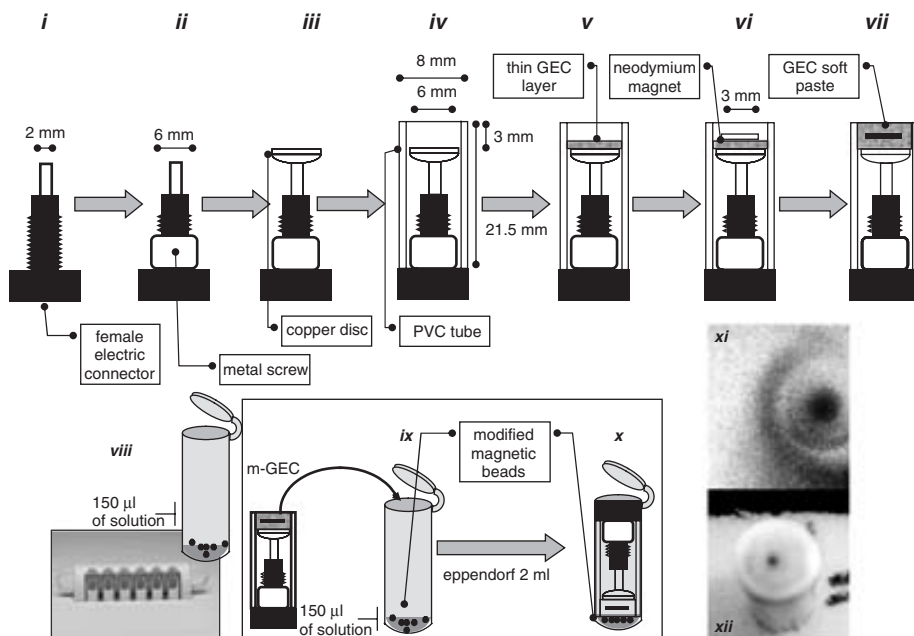


Fig. 31.1. Schematic representation of the construction of m-GEC (steps i to vii) and manipulation of the m-GEC electrodes, comprising the immobilization of DNA on magnetic beads (viii) following by capturing the modified beads on m-GEC electrode (ix and x). Scanning electron microphotographs showing the captured magnetic beads on the surface of m-GEC magneto sensor ($500\ \mu\text{m}$, $15\ \text{kV}$) and a photograph showing the aspect of the sensor with the immobilized beads are also shown (xi and xii, respectively) (Number of magnetic beads: 6.2×10^6).

- (5) Firstly, place a thin layer of the resulting soft paste in the PVC cylindrical sleeve body, which has the electrical contact to a depth of 3 mm to isolate the copper disc (v).
- (6) Put inside, and centered, the 3 mm diameter neodymium magnet (vi).
- (7) Fill the electrode body gap completely with the soft GEC paste and pack the electrode tightly (vii).
- (8) Cure the electrode at 90°C for 3 days until the paste become completely rigid.
- (9) Polish the surface of the m-GEC electrode prior to each use first 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 can be stored in a dried place at room temperature.

31.5 AMPLIFICATION OF THE SALMONELLA GENOME

- *DNA extraction.* Centrifugate 1.5 mL of an overnight culture of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 on Luria-Bertani (LB) solid or liquid medium and resuspend in 576 μL Mili-Q water. Incubate the samples for 1 h at 37°C with proteinase K (20 μg μL^{-1}) and SDS 10% p/v (pH 7.2). Extract twice with phenol–chloroform–isoamyl alcohol (25:24:1) and collect DNA by precipitation with isopropanol. Resuspend it in 100 μL Mili-Q water [2].
- *PCR reaction.* Perform the PCR according to the kit manufacturer, in a 100 μL of reaction mixture containing PCR template (approximately 200 ng of purified DNA), 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of each deoxynucleotide triphosphate (dATP, dGTP, dCTP and dTTP), 0.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of each labeled primer (Biotinylated IS200 up and DIG-IS200 down) and 5 U of Taq polymerase, and in buffer containing 1.5 mmol L^{-1} MgCl_2 . The PCR cycling parameters are an initial denaturation at 95°C for 2 min followed by 30 cycles of 95°C for 30 s, 53°C for 30 s, 72°C for 30 s and a last step of 7 min at 72°C. Include a blank as a control, containing all reagents except the target DNA. As a control, perform a gel electrophoresis in 3% agarose gel in buffer 0.4 M tris-acetate, 1 mM EDTA pH 8.0, containing 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ethidium bromide, and a DNA size marker and visualize the gel by UV transillumination. The genosensor can be used only if a unique band is observed by electrophoresis, as shown in Fig. 31.2.

31.6 RAPID ELECTROCHEMICAL VERIFICATION OF PCR AMPLIFICATION OF SALMONELLA SPP

- Dilute the amplified product coming directly from the PCR in 5 \times SSC (a linear range is obtained from 1/400 to 1/15) in 2 mL eppendorf tubes, in 140 μL as a final volume (Fig. 31.3).
- *Immobilization of the doubly labeled amplicon on the magnetic beads.* Add a volume containing 6.2×10^6 streptavidin magnetic beads and perform the incubation for 30 min at 42°C in an Eppendorf Thermomixer with gentle shaking.
- Put the tubes on the magnetic separator until the solution becomes clear, and eliminate the supernatant.
- After that, perform a washing step of the magnetic beads with 140 μL 5 \times SSC for 10 min at 42°C. Repeat it again, eliminating the supernatant.

Rapid electrochemical verification of PCR amplification of *Salmonella* spp.

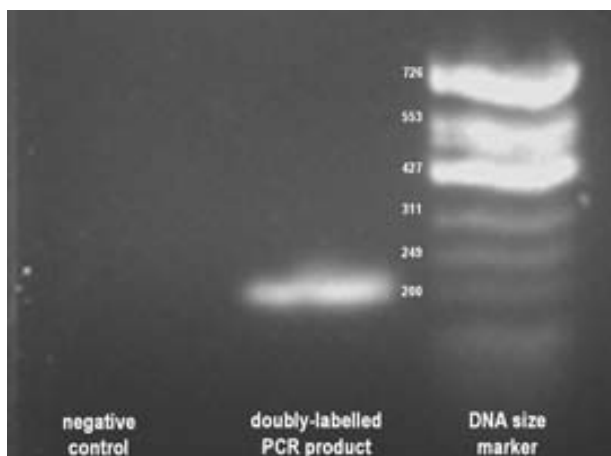


Fig. 31.2. Agarose gel electrophoresis of doubly labeled PCR product (lane 2) obtained from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 with the doubly labeled primer set IS200. Lane 3: Molecular weight marker (Φ X174-Hinf I genome). No band was obtained with sterile water used as a negative PCR control (lane 1).

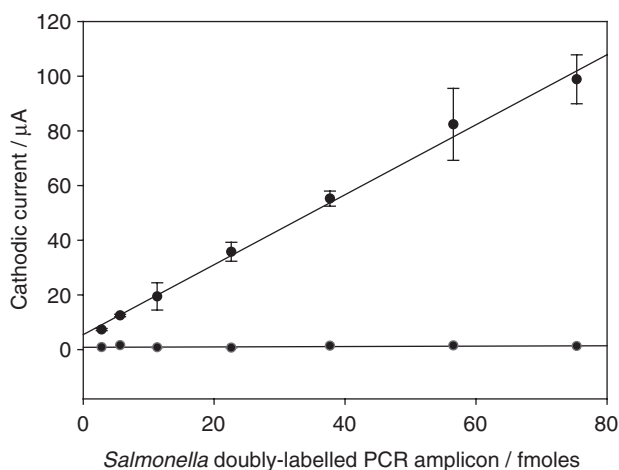


Fig. 31.3. Rapid electrochemical verification of PCR amplification of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 with the doubly labeled primer set IS200, showing an increasing amount of IS200 doubly labeled amplicon (from 2.8 to 75.4 fmol). The negative PCR control is also shown. 60 μ g AntiDig-HRP and 6.2×10^6 magnetic beads were used. Other experimental details are: medium, phosphate buffer 0.1 mol L⁻¹, KCl 0.1 mol L⁻¹, pH 7.0; mediator, hydroquinone 1.81 mmol L⁻¹; substrate, H₂O₂ 4.90 mmol L⁻¹; applied potential = -0.1 V (vs. Ag/AgCl). All data are given as average \pm SD, $n = 3$.

- *Enzymatic labeling step.* Add 140 μL of anti-Dig-HRP (60 μg) in blocking Tris buffer. Perform an incubation step for 30 min at 42°C with gentle shaking.
- Put the tubes on the magnetic separator until the solution becomes clear, and eliminate the supernatant [3].
- Perform a washing step of the magnetic beads with 140 μL Tris buffer for 10 min at 42°C. Repeat it again. Resuspend the magnetic beads in 140 μL Tris buffer.
- 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 m-GEC electrode as working electrode. Set the potential fixed at -0.100 V .
- Immerse the electrodes 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 4.90 mmol L^{-1} with gentle stirring. Register the current when the steady state is reached. Compare with the blank assay signal performed with no template DNA samples. A linear range from 2.8 to 75.4 fmol of doubly labeled amplicon should be observed, producing amperometric signals ranging from 7.3 to 99 μA (out of range of the equipment), respectively, being the negative control approximately 1.5 μA , in all cases, as shown in Fig. 31.3.

REFERENCES

- 1 M.I. Pividori, A. Merkoçi and S. Alegret, Graphite–epoxy composites as a new transducing material for electrochemical genosensing, *Biosens. Bioelectron.*, 19 (2003) 473–484.
- 2 M.I. Pividori, A. Merkoçi, J. Barbé and S. Alegret, PCR-genosensor rapid test for detecting *Salmonella*, *Electroanalysis*, 15 (2003) 1815–1823.
- 3 M.I. Pividori, A. Lermo, S. Hernandez, J. Barbé, S. Alegret and S. Campoy, Rapid electrochemical DNA biosensing strategy for the detection of food pathogens based on enzyme-DNA-magnetic bead conjugate, *Afinidad*, 62 (2006) 13–18.

Procedure 32. In situ DNA amplification of *Salmonella spp.* with magnetic primers for the real-time electrochemical detection based on m-GEC electrodes

Comprehensive Analytical Chemistry, 49 (2007) e227-e231

María Isabel Pividori, Anabel Lermo, Susana Campoy, Jordi Barbé, Salvador Alegret

In situ DNA amplification of *Salmonella* spp. with magnetic primers for the real-time electrochemical detection based on m-GEC electrodes

María Isabel Pividori, Anabel Lermo, Susana Campoy, Jordi Barbé and Salvador. Alegret

32.1 OBJECTIVES

(a) To perform an *in situ* PCR amplification of the IS200 insertion sequence of *Salmonella* spp. with double labeling of the amplicon on magnetic bead primers. (b) To construct a magneto graphite–epoxy composite (m-GEC) electrode. (c) To quantify the double-labeling amplification products growth on magnetic beads by using an electrochemical strategy based on magnetic beads and m-GEC electrodes.

32.2 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.), 21.5 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 0.1 M 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 studying the distribution of the magnetic beads on the m-GEC electrode surface.

32.3 CHEMICALS AND BIOCHEMICALS

Magnetic beads modified with streptavidin (Dynabeads M-280 Streptavidin, Prod. No. 112.05, Dynal Biotech ASA, Oslo, Norway). AntiDigoxigenin-POD Fab fragments Cat. No. 1120773910, (Roche Bi-chemicals Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Hydroquinone (Sigma), hydrogen peroxide (Merck, Germany).

Primer sequences (TIB-MOLBIOL, Germany):

Biotinylated IS200 up: 5' bio-ATG GGG GAC GAA AAG AGC TTA GC 3', whose 5' end is 194 bp from IS200 5' end, DIG-IS200 down: 5' DIG- CTC CAG AAG CAT GTG AAT ATG 3', whose 5' end is 394 bp from IS200 5' end.

Expand High Fidelity PCR System Kit (Roche Molecular Biochemicals).

Standard saline citrate (20 × SSC) (3.0 M NaCl, 0.3 M trisodium citrate, pH 7.0); Tris Buffer (0.1 M Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.5); blocking Tris buffer (2% w/v BSA, 0.1% w/v Tween 20 i 5 mM EDTA, in 0.1 M Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.5).

Supporting electrolyte (0.1 M phosphate buffer, 0.1 M KCl, pH 7.0)

32.4 CONSTRUCTION OF THE m-GEC ELECTRODE

The construction of the m-GEC electrode is explained in Procedure 31. The steps are schematically explained in Fig. 31.1 therein [1].

32.5 *IN SITU* SALMONELLA GENOME AMPLIFICATION WITH MAGNETIC BEAD PRIMERS

DNA extraction. Centrifugate 1.5 mL of an overnight culture of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 on Luria-Bertani (LB) solid or liquid medium and resuspend in 576 μL Milli-Q water. Incubate the samples for 1 h at 37°C with proteinase K (20 μg/μL) and SDS 10% p/v (pH 7.2). Extract twice with phenol–chloroform–isoamyl

alcohol (25:24:1) and collect DNA by precipitation with isopropanol. Resuspend it in 100 μL Milli-Q water [2].

Magnetic bead primers preparation. To a streptavidin-modified magnetic beads (from 0.3 to 6.4×10^6), add 50 pmol biotinylated IS200 up primer (according to the manufacturer, 1.6×10^7 streptavidin-modified magnetic beads able to bind 50 pmol of biotinylated oligonucleotide), and perform the immobilization reaction in 140 μL Milli-Q water at 42°C for 15 min in an Eppendorf Thermomixer with gentle shaking. Put the tubes on the magnetic separator until the solution becomes clear, and eliminate the supernatant in order to separate the full-covered magnetic beads (the magnetic bead primer) from the supernatant containing the excess of biotinylated IS200 up primer. Perform a washing step of the magnetic beads with 140 μL Milli-Q water for 10 min at 42°C. Repeat it again, eliminating the supernatant. The magnetic bead primer is ready to be introduced into PCR amplification as the IS200 up primer reagent [3].

PCR reaction. Perform the PCR according to the kit manufacturer, in a 50 μL of reaction mixture containing PCR template (approximately 100 ng of purified DNA), 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of each deoxynucleotide triphosphate (dATP, dGTP, dCTP and dTTP), 0.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of the labeled primer DIG-IS200 down and 2.5 U of Taq polymerase, and in buffer containing 1.5 mmol L^{-1} MgCl_2 . Add all the reagents to the magnetic bead primer prepared to described above [3].

The PCR cycling parameters are an initial denaturation at 95°C for 2 min followed by 30 cycles of 95°C for 30 s, 53°C for 30 s, and 72°C for 30 s, and a last step of 7 min at 72°C. Include a blank as a control, containing all reagents except the target DNA [2].

32.6 RAPID ELECTROCHEMICAL VERIFICATION OF *IN SITU* PCR AMPLIFICATION OF *SALMONELLA* SPP. WITH MAGNETIC BEAD PRIMERS

- Put the tubes coming from PCR on the magnetic separator until the solution becomes clear, and eliminate the supernatant.
- After that, perform a washing step of the magnetic beads with 140 μL 5 \times SSC for 10 min at 42°C. Repeat it again, eliminating the supernatant.
- *Enzymatic labeling step.* Add 140 μL of anti-Dig-HRP (60 μg) in blocking Tris buffer. Perform an incubation step for 30 min at 42°C with gentle shaking.

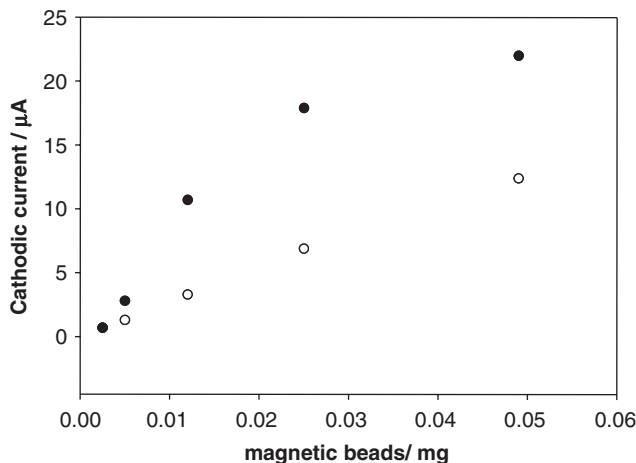


Fig. 32.1. PCR reactor for the real-time electrochemical detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 based on the doubly labeled PCR amplification performed with the magnetic bead primer. White dots show the non-specific electrochemical signal processing the negative PCR control, while the black dots show the increasing signal of DNA IS200 doubly labeled amplicon onto magnetic beads. In all cases, 60 μg AntiDig-HRP were used. Other experimental details are: medium, phosphate buffer 0.1 mol L⁻¹, KCl 0.1 mol L⁻¹, pH 7.0; mediator, hydroquinone 1.81 mmol L⁻¹; substrate, H₂O₂ 4.90 mmol L⁻¹; applied potential = -0.1 V (vs. Ag/AgCl).

- 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 140 μL Tris buffer for 10 min at 42°C. Repeat it again. Resuspend the magnetic beads in 140 μL Tris buffer.
- 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 m-GEC electrode as working electrode. Set the potential fixed at -0.100 V.
- Immerse the electrodes in an electrochemical cell containing 20 mL supporting buffer with 1.81 mmol L⁻¹ hydroquinone. Finally, add H₂O₂ at a final concentration of 4.90 mmol L⁻¹ with gentle stirring. Register the current when the steady state is reached. Compare with the blank assay signal performed with no template DNA samples. As an example, an amperometric signal of approximately 11 μA should be obtained for the sample when using 0.012 mg of magnetic

In situ DNA amplification of *Salmonella* spp. with magnetic primers

beads, while in this conditions the negative control shows a signal of around 3 μ A (Fig. 32.1).

REFERENCES

- 1 M.I. Pividori, A. Merkoçi and S. Alegret, Graphite–epoxy composites as a new transducing material for electrochemical genosensing, *Biosens. Bioelectron.*, 19 (2003) 473–484.
- 2 M.I. Pividori, A. Merkoçi, J. Barbé and S. Alegret., PCR-genosensor rapid test for detecting *Salmonella*, *Electroanalysis*, 15 (2003) 1815–1823.
- 3 A. Lermo, S. Campoy, J. Barbé, S. Hernández, S. Alegret and M.I. Pividori, *In situ* DNA amplification with magnetic primers for the electrochemical detection of food pathogens, *Biosens. and Bioelectron.*, 22 (2007) 2010–2017.

Bioaffinity platforms based on carbon-polymer biocomposites for electrochemical biosensing

Thin Solid Films, 516 (2007) 284-292

M.I. Pividori, A. Lermo, E. Zacco, S. Hernández, S. Fabiano, S. Alegret

Bioaffinity platforms based on carbon-polymer biocomposites for electrochemical biosensing

M.I. Pividori^{a,*}, A. Lermo^a, E. Zacco^a, S. Hernández^b, S. Fabiano^b, S. Alegret^a

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

^b Cátedra de Química Analítica I. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, 3000, Santa Fe, Argentina

Available online 15 June 2007

Abstract

Rigid conducting biocomposites are interesting transducing materials for the construction of electrochemical immunosensors, genosensors and enzymosensors, particularly if the material is modified with universal affinity biomolecules. Examples of these ‘universal affinity biocomposites’ for electrochemical biosensing are reviewed, in which the common base material is a graphite–epoxy composite. The first approach relies on strept(avidin)–graphite–epoxy biocomposite transducer, as a universal immobilization platform whereon biotinylated biomolecules, such as DNAs, enzymes or antibodies can be captured by means of strept(avidin)–biotin reaction. The second approach is based on Protein A–graphite–epoxy biocomposite. Protein A is able to bind the Fc region of antibodies serving as generic affinity matrix for immuno-immobilization on the transducer. Biocomposite electrodes offer many potential advantages compared to more traditional electrodes based on a surface-modified conducting phase. The capability of integrating various materials into a single one is their main advantage, besides the improved electrochemical properties. These materials can just be prepared through ‘dry chemistry’ using procedures that can be easily transferred to mass fabrication of thick film devices. The different properties of these materials are discussed. Analytical response as well as other parameters such as the easiness in preparation, robustness, sensitivity, surface regeneration, costs, and transfer to mass production of these different approaches is also considered.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Graphite–epoxy biocomposite; Protein A; Avidin; Atrazine; DNA; Electrochemical biosensing; Immunoassay

1. Introduction

The fabrication of reproducible, stable, and selective biologically modified surfaces is the subject of increasing research efforts owing to the potential application in the field of biochips and bioreactors. Moreover, the deposition of biological macromolecules with controlled spatial resolution without any loss in their activity is an important feature to be considered in the fabrication of biosensing devices [1,2]. The most exciting transducers for electrochemical biosensing are based on carbonaceous materials: carbon paste [3], glassy carbon [4] and pyrolytic graphite [5] are the most popular choices for the construction of electrodes.

1.1. Carbon-based materials for electrochemical biosensing

There is a rich diversity of structural forms of solid carbon because it can exist as any of several allotropes. Moreover, engineered carbons are the product of the carbonization process of a carbon-containing material, conducted in an oxygen-free atmosphere. Depending on the starting precursor material (hydrocarbon gases, petroleum derived products, coals, polymers, biomass), the product of a carbonization process will have different properties, including the adsorption capability.

Traditional engineered carbons can take many forms, such as coke, graphite, carbon and graphite fiber, carbon monoliths, glassy carbon (GC), carbon black, carbon film, and diamond-like film. More recently, a promising new carbon-based material—carbon nanotubes—has been developed using the vapor deposition technique.

Engineered carbons have found intensive use as adsorbents because of their porous and highly developed internal surface areas as well as their complex chemical structures.

* Corresponding author. Tel.: +34 93 581 4937; fax: +34 93 581 2379.

E-mail address: Isabel.Pividori@uab.es (M.I. Pividori).

As such, the majority of organic molecules and biomolecules can be easily adsorbed on carbon-based material. Adsorption processes can be driven in both liquid and gaseous media by physical forces. The porous structure and the chemical nature of the carbon surface are significantly related to its crystalline constitution. The crystal structure of graphite consists of parallel layers of condensed, regular hexagonal rings. The in-plane C–C distance is intermediate between the Csp^3-Csp^3 and the $Csp^2=Csp^2$ bond lengths.

The pore structure and surface area of carbon-based materials determine their physical characteristics, while the chemical structure of the surface affects interactions with polar and nonpolar molecules due to the presence of chemically reactive functional groups. Active sites—edges, dislocations, and discontinuities—determine the reactivity of the carbon surface. Graphitic materials have at least two distinct types of surface sites, namely, the basal-plane and edge-plane sites [6]. It is generally considered that the active sites for electrochemical reactions are associated with the edge-plane sites, while the basal plane is mostly inactive.

Heteroatoms (usually oxygen) play an important role in the chemical nature of the carbon ‘active’ surface [7]. The adsorption process is thus strongly dependent on the type, quantity, and bonding of these functional groups in the structure. The electrochemical oxidation pretreatment was found to improve the electrochemical behavior by introducing more active edge sites on the treated carbon surface. The effect of oxidation on the chemical composition is related to the increased concentration of strong and weak acidic groups found upon electrochemical oxidation of the graphite surface [8]. A model of a fragment of oxidized carbon surface illustrating the general chemical character of the oxidized carbon surface is shown in Fig. 1 [9].

Among the different carbonaceous materials, GC and pyrolytic graphite (PG) and the graphite-powder-based composites such as carbon paste (CP) are the most popular choices as electrochemical transducer materials. GC is made by heating a high molecular weight carbonaceous polymer to 600–800 °C. Most of the noncarbon elements are volatilized, but the backbone is not degraded. Regions of hexagonal sp^2 carbon are formed during this treatment, but they are unable to form extensive graphitic domains without breaking the original polymer chain. GC is impermeable to liquid, so porosity is not an issue [10]. Pretreated GC has been obtained by (1) polishing and/or ultrasonication, (2) chemical oxidation or (3) electro-

chemical anodization treatments [11]. These surface treatments have been extensively used to improve the electrochemical performance of GC [12]. Suggested reasons for activation have been the removal of contaminants from the surface, and the increase in the surface area due to the roughening of the surface or the exposure of fresh carbon edges, microparticles and defects that may be sites for electron transfer.

While some of these factors are related to improvements in the electrochemical performance, others are related to both electrochemical and physical features. As an example, the increment in the surface roughness can cause enhancement of the heterogeneous electron transfer rates as the effective area for electron transfer is greater than the geometric area, but can also improve the physisorption of a given molecule.

GC is well known for the exhibition of a wide range of functional groups, including carboxylic acids, quinones/hydroquinone, phenols, peroxides, aldehydes, ethers, esters, ketones, and alcohols. The activation method most commonly used relies on the electrochemical activation to obtain anodized GC (GC_{ox}).

PG is made by the pyrolysis of light hydrocarbons onto a hot (800 °C) stage, often followed by heat treatment to higher temperatures. Highly oriented PG (HOPG) is made from PG by pressure annealing in a hot press at 3000 °C and several kilobars. HOPG has a smooth, shiny basal surface, while PG is mottled and dull. The dominant structural property of PG and HOPG is the long-range order of the graphitic layers and the remarkable anisotropy and hydrophobic behavior. HOPG is single-crystal graphite with edge planes and cleavage surfaces (basal plane) that serve as the oriented surface for electrochemical studies. An important advantage of HOPG compared with other carbonaceous materials is the possibility to perform studies by means of high resolution techniques—even down to the atomic level—by scanning probe microscopy, such as atomic force microscopy (AFM). The rough and complex surface of GC is not suitable for AFM surface characterization.

For AFM studies, an atomically flat substrate is required to clearly resolve the molecular adsorbed layer. GC presents a root-mean-square (rms) roughness of 2.10 nm while HOPG surface presents an rms roughness of less than 0.06 nm (both calculated from AFM images in air) [13]. This fact has stimulated the use of HOPG instead of other carbonaceous materials such as GC or CP [14]. Fullerenes (C60) have a structure similar to that of truncated icosahedron, made out of five- and six-member rings of sp^2 carbons. Higher fullerenes are also made of five- and six-member

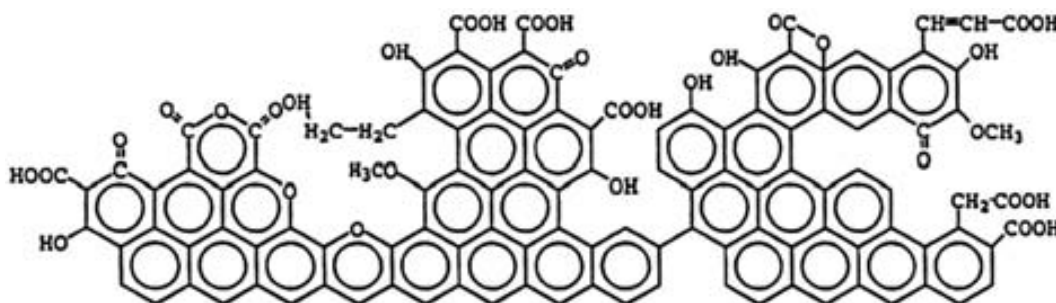


Fig. 1. Hypothetical fragment of an oxidized carbon surface. The figure was taken from [9] with permission from the authors.

carbon rings. In late 1991, the first synthesis and characterization of carbon nanotubes (CNTs) was reported [15]. CNTs are attractive carbonaceous materials with well defined nanoscale geometry. They have a closed topology and tubular structure that are typically several nanometers in diameter and many micrometers in length. CNTs are produced as single-wall Carbon Nanotubes (SWCNTs) and multi-wall carbon nanotubes (MWCNTs). SWCNTs are made out of a single graphite sheet rolled seamlessly with 1–2 nm in tube diameter. MWCNTs are composed of coaxial tubules, each formed with a rolled graphite sheet, with diameters ranging from 2 to 50 nm. The concentric single-walled cylinders are held together by relatively weak Van der Waals forces with an interlayer spacing of 0.34 nm. CNTs aggregate easily, forming bundles of tens to hundreds of nanotubes in parallel and in contact with each other [16]. It has been shown that while amorphous carbon can be attacked from any direction, CNTs can be oxidized only from the ends. When treated with concentrated oxidizing acid, the ends and surfaces of carbon nanotubes become covered with oxygen-containing groups such as carboxyl groups and ether groups. As graphite is considered to be hydrophobic, CNTs and fullerenes are found to have a low solubility in water. The presence of hydrophilic groups (e.g., –OH and –COOH) in the interior of the CNT could play an important role in its properties. Compared with SWCNTs, the much cheaper MWCNTs produced by the CVD method are known to have more defects and can provide more sites for the immobilization of biomolecules. CNTs present a larger surface area and outstanding charge-transport characteristics and might therefore greatly promote electron transfer reactions which can dramatically improve electrochemical performance compared to that of other carbonaceous materials [17]. The open end of a MWCNT is expected to show a fast electron transfer rate similar to the graphite edge plane electrode while the sidewall is inert like the graphite basal plane. Fast electron transfer rate is demonstrated along the tube axis [18]. CNTs are expected to present a wide electrochemical window, flexible surface chemistry, and biocompatibility, similar to other widely used carbon materials.

1.2. Carbon composite materials

Carbon composites result from the combination of carbon with one or more dissimilar materials. Each individual component maintains its original characteristics while giving the composite distinctive chemical, mechanical and physical properties. The capability of integrating various materials is one of their main advantages. Some components incorporated within the composite result in enhanced sensitivity and selectivity. The best composite compounds will give the resulting material improved chemical, physical and mechanical properties. As such, it is possible to choose between different binders and polymeric matrices in order to obtain a better signal-to-noise ratio, a lower nonspecific adsorption, and improved electrochemical properties (electron transfer rate and electrocatalytic behavior). Powdered carbon is frequently used as the conductive phase in composite electrodes due to its high chemical inertness, wide range of working potentials, low electrical resistance and a crystal structure responsible for low residual currents. A key property of polycrystalline graphite is porosity. Most polycrystalline graphite—

such as powdered carbon—is made by heat treatment of high molecular weight petroleum fractions at high temperatures to perform graphitization. The term ‘graphite’ is used to designate materials that have been subjected to high temperatures, and thus have aligned the sp² planes parallel to each other.

Regarding their mechanical properties carbon composites can thus be classified as rigid composites [19,20] or soft composites—the carbon pastes [21]. The composites are also classified by the arrangement of their particles, which can be either dispersed or grouped randomly in clearly defined conducting zones within the insulating zones.

The inherent electrical properties of the composite depend on the nature of each of the components, their relative quantities and their distribution. The electrical resistance is determined by the connectivity of the conducting particles inside the nonconducting matrix, and therefore the relative amount of each composite component has to be assessed to achieve optimal composition.

Carbon composites show improved electrochemical performances, similar to an array of carbon fibers separated by an insulating matrix and connected in parallel. The signal produced by this macroelectrode formed by a carbon fiber ensemble is the sum of the signals of the individual microelectrodes.

Composite electrodes thus show a higher signal-to-noise (S/N) ratio than the corresponding pure conductors, accompanied by an improved (lower) detection limit, as shown in Fig. 2, when comparing two electrodes with identical geometrical conducting areas. SEM showing the surface and roughness of these materials are shown comparatively in Fig. 3.

Rigid composites are obtained by mixing graphite powder with a nonconducting polymeric matrix, obtaining a soft paste that becomes rigid after a curing step. They could be classified according to the nature of the binder or the polymeric matrix, in epoxy composites, methacrylate composites, or silicone composites. Graphite–epoxy composite (GEC) has been extensively used in our laboratories showing to be suitable for electrochemical sensing due to its unique physical, and electrochemical properties.

Soft composites or CPs are the result of mixing an inert conductor (e.g., graphite powder) with an insulating compound (e.g., paraffin oil, silicone, Nujol, mineral oil). The insulating liquid has a specific viscosity and the paste has a certain consistency. The resulting material is easy to prepare and inexpensive. Compared with other solid materials, CP electrodes have shown some advantages, including wide potential window and low background current.

However, these pastes have limited mechanical and physical stabilities, especially in flow systems. Additionally, the pastes are dissolved by some nonpolar solvents.

1.3. Carbon biocomposite materials

Most biosensor transducers require pretreatment of their surfaces. In some incidences, transducing materials have to be modified [22,23]. This modification process can be tedious, expensive—because it involves many reagents—time-consuming, and difficult to reproduce.

As previously explained, carbon composites result from the combination of carbon with one or more dissimilar materials, with

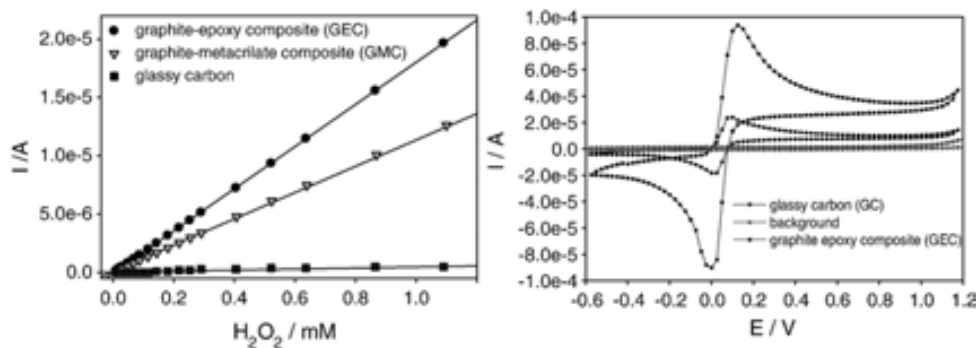


Fig. 2. Left: Electrochemical performance of graphite–epoxy composite (GEC) compared with glassy carbon (GC) for hydrogen peroxide, applied potential, 1.150 V (vs. Ag/AgCl). Right: Cyclic voltamperograms of hydroquinone 1.81 mM using as working electrodes graphite–epoxy and glassy carbon, $\nu=50 \text{ mV s}^{-1}$. In both cases, medium, phosphate buffer 0.1 M, KCl 0.1 M, pH 7.0.

the capability of integrating various materials as one of their main advantages. Some components, which are incorporated within the composite, result in enhanced sensitivity and selectivity. The best composite compounds will give the resulting material improved chemical, physical, and mechanical properties.

Rigid conducting graphite-polymer composites (GEC) and biocomposites (GEB) have been extensively used in our laboratories and shown to be a suitable material for electrochemical (bio)sensing due to their unique physical, and electrochemical properties [19,20]. In particular, we have used GEC (graphite–epoxy composite) made by mixing the nonconducting epoxy

resin (Epo-Tek, Epoxy Technology, Billerica, MA, USA) with graphite powder (particle size below 50 μm).

In the present work, GEB materials for the development of electrochemical biosensors are presented. The advantages of these new graphite–epoxy platforms for electrochemical biosensing are discussed and compared with the current state of the art in biosensing techniques.

1.3.1. Protein A graphite–epoxy biocomposite (ProtA-GEB)

One of the most important features in the immunosensor design is the proper choice of the immobilization method for keeping the

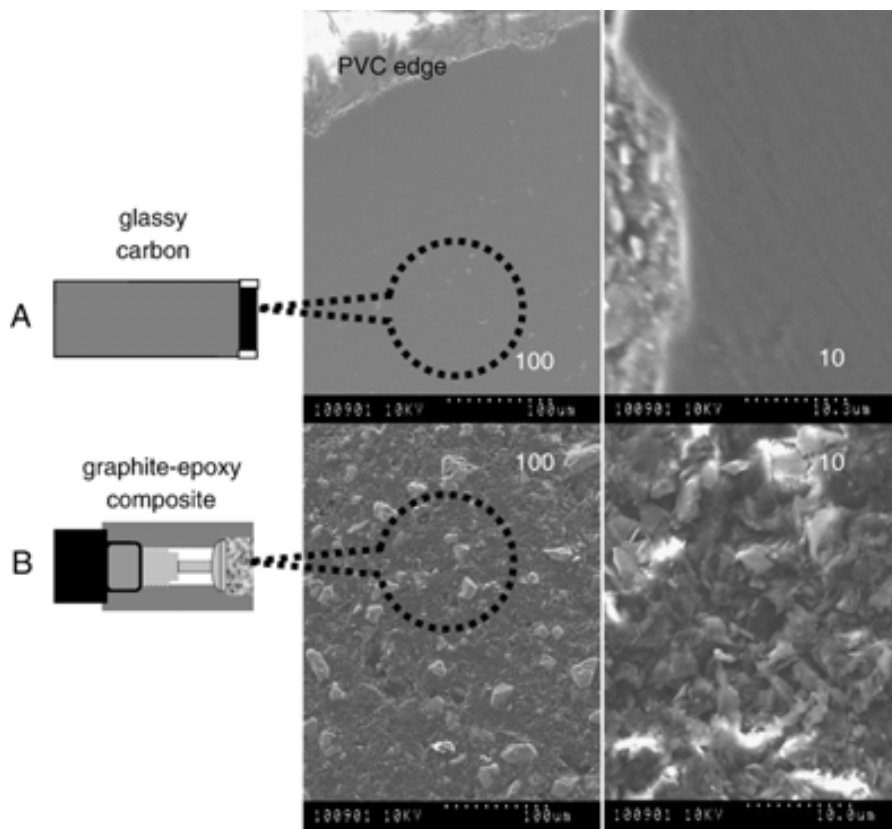


Fig. 3. Scanning electron microphotographs of the surfaces of a glassy carbon electrode (A) and a graphite–epoxy electrode (B). The same acceleration voltage (10 kV) and the same resolutions (100 and 10 μm , respectively as shown in the figure) were used in both cases. The figure was taken from [9]. Reprinted with permission.

affinity of the antibodies. 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. As Protein A is able to link the Fc region of different antibodies, there is no need to previously modify the antibody.

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 [24]. Because of these binding characteristics, Protein A can be used as an affinity matrix in classical immunoassays (ELISA) as well as in immunosensing devices [25,26]. 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 [27].

A rigid and renewable transducing material for electrochemical immunosensing can be easily prepared by adding a 2% of Protein A in the formulation of the graphite–epoxy composite to obtain ProtA-GEB, and using dry chemistry techniques, avoiding tedious, expensive and time-consuming immobilization procedures of the antibodies. The rigid conducting biocomposite acts not only as a transducer, but also as a reservoir for the biomolecule [28].

The ProtA-GEB surface was characterized by scanning electron and fluorescence microscopy as well as by electrochemical techniques.

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. 4 shows comparative scanning electron microphotographs of GEC (Fig. 4A) and ProtA-GEB (Fig. 4B). 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 characterized 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.

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 previously described, to form sequentially the immunological conjugate ProtA-GEB//RIgG//anti-RIgG-biotin//rhodamine–streptavidin, as shown in Fig. 5. The background control was performed omitting the RIgG immobilization step. Fig. 5A shows intense fluorescence areas (in red and circled), 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

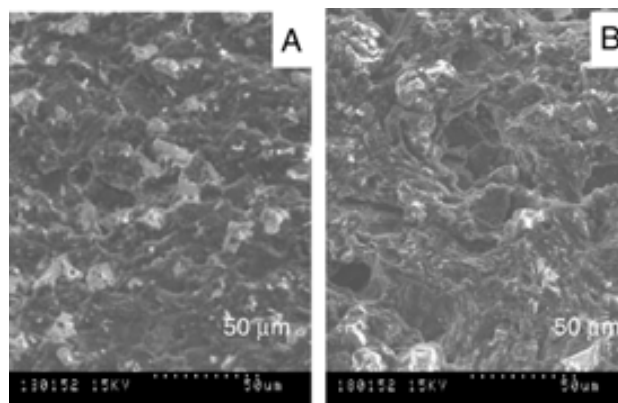


Fig. 4. Scanning electron microphotographs of (A) GEC and (B) ProtA(4%)-GEB. Identical acceleration voltage (10 kV) and resolution (50 μm) were used in both cases. The figure was taken from [28]. Reprinted with permission.

exposed Protein A binding sites, acting as an affinity matrix. These binding areas were not revealed in the control assay indicating negligible nonspecific adsorption (Fig. 5B).

Both images were taken under identical experimental conditions. The reflection of the material surface (in green) showed the same pattern for both assays.

1.3.2. Protein A graphite–epoxy biocomposite (ProtA-GEB) for electrochemical immunosensing of pesticides residues

The utility of the ProtA-GEB for electrochemical immunosensing was demonstrated for the detection of pesticides residues [29]. A rigid and renewable transducing material for electrochemical immunosensing of pesticides residues, based on bulk-modified graphite–epoxy biocomposite, can be easily prepared by adding 2% of Protein A in the formulation of the composite to obtain ProtA-GEB. The rigid conducting biocomposite acts not only as a transducer, but also as a reservoir for the biomolecule.

After use, the electrode surface can be renewed by a simple polishing procedure for further uses, highlighting a clear advantage of this new material with respect to surface-modified approaches such as classical biosensors and other common biological assays. Anti-atrazine antibodies can be easily immobilized on the surface of the Protein A-modified transducer without any modification of the antibodies (Fig. 6A).

In these cases, a competitive immunological assay was used (Fig. 6C). Briefly, the three-step experimental procedure consist of: i) immobilization procedure in which the antibody is immobilized onto the electrode surface through the Fc-Protein A (Fig. 6A); ii) competitive immunological reaction between the atrazine and an atrazine-HRP enzymatic tracer (Fig. 6C); iii) amperometric determination based on the enzyme activity by adding H₂O₂ and using hydroquinone as a mediator (Fig. 6C).

The strategies for the immobilization of the antibodies on the biosensor relies on ‘dry-assisted affinity’ immobilization, and it was performed by adding 20 μl of the nonmodified or the biotinylated antibodies to the surface of ProtA-GEB electrodes, at 40 °C, until dryness (approximately for 30 min) under static conditions (Fig. 6B). The performance of the electrochemical immunosensing strategy based on universal affinity biocomposite

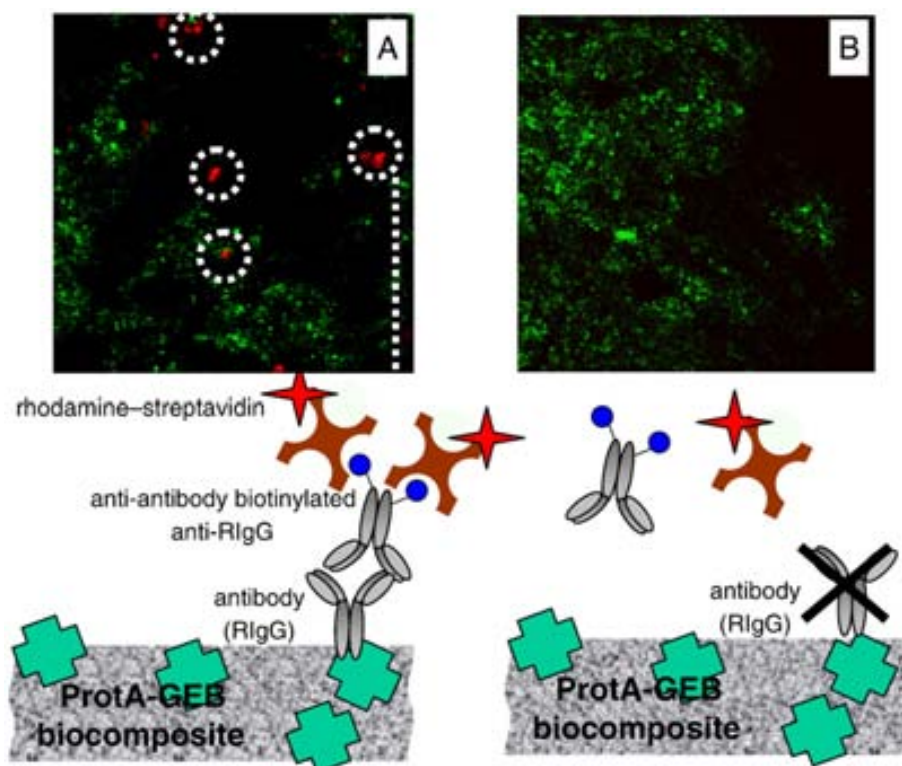


Fig. 5. Confocal laser scanning fluorescence microphotograph for (A) ProtA (4%) GEB transducers with 2 pmol R1gG, 10 pmol biotinylated anti-R1gG and 50 μg rhodamine–streptavidin, in order to form the immunological complex ProtA-GEB//R1gG//anti-R1gG-biotin//rhodamine–streptavidin and (B) background adsorption control omitting R1gG. Laser excitation was at 568 nm. Voltage: 352 V. The figure was taken from [28]. Reprinted with permission. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

platforms was successfully evaluated using spiked real orange juice samples. The competitive electrochemical immunosensing strategy can easily reach the required LOD for potable water orange juice (MRL $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$) established by the European Community directives with very simple sample pretreatments (Fig. 6D). The orange juice samples spiked with diluted atrazine were first adjusted to pH 7.5, diluted five times with PBST, and filtered through $0.22 \mu\text{m}$ filter before measurement. The features of these approaches are described in detail in the following section [29].

1.3.3. Avidin graphite–epoxy biocomposite (Av-GEB)

One of the most valuable strategies for the effective immobilization of biomaterial on different substrates is based on the avidin–biotin affinity reaction [30]. 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, $K_a = 10^{15} \text{ M}$) 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 [31]. In addition, the avidin–biotin-based immobilization method maintains the biological activity of the biomolecule being immobilized more successfully than other commonly used methods [32]. Much progress has been done in the

modification of biomolecules with biotin. A wide range of macromolecules including proteins—both enzymes and antibodies—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 of attaching different biotinylated biomolecules.

A rigid and renewable transducing material for electrochemical immunosensing, enzymosensing and genosensing can be easily prepared by adding 2% of avidin in the formulation of the graphite–epoxy composite to obtain Av-GEB, and using dry chemistry techniques, avoiding tedious, expensive and time-consuming immobilization procedures of the biomolecules. The rigid conducting biocomposite acts not only as a transducer, but also as a reservoir for the avidin.

The Av-GEB surface was characterized by fluorescence microscopy as well as by electrochemical techniques. The exposure of the avidin specific binding sites of the Av-GEB platform was studied using confocal laser scanning fluorescence microscopy [33]. The ProtA-GEB surface was treated following the procedure previously described, to form the conjugate Avidin-GEB//fluorescein–streptavidin, as shown in Fig. 7.

The background control was performed using nonbiotinylated fluorescein but the same Av-GEB platform. Fig. 7B 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. 7A) indicating negligible

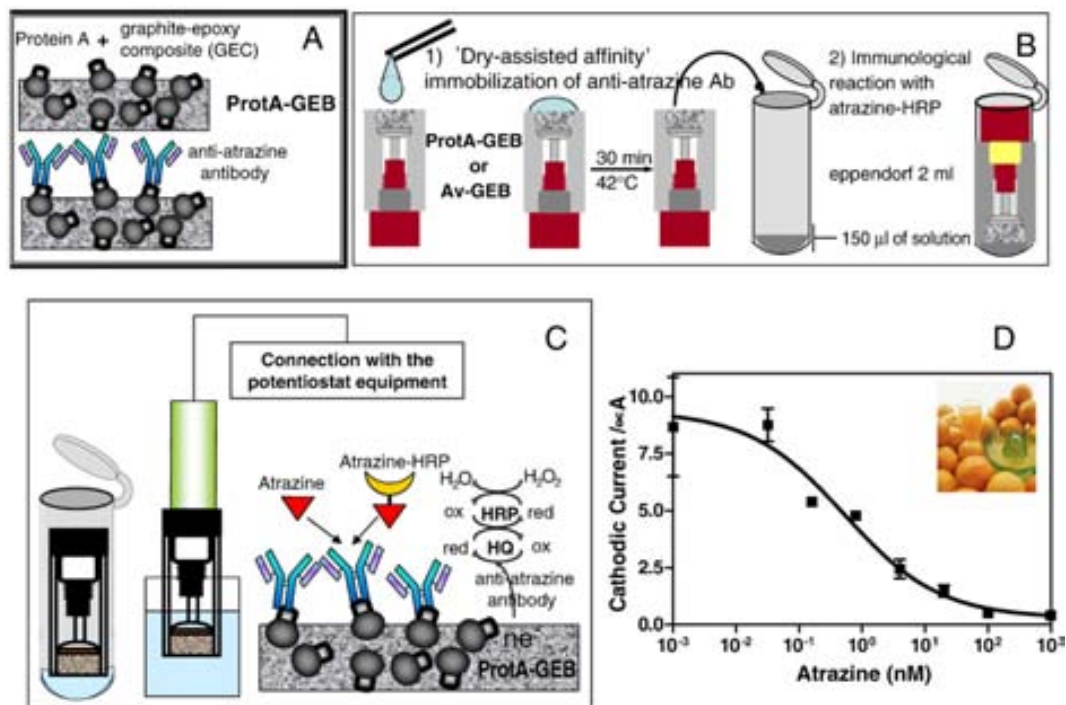


Fig. 6. Schematic representation of the electrochemical competitive immunosensing strategy for the detection of atrazine in orange juice with ProtA-GEB-based biosensors, showing the immobilization (A and B) and the competitive immunological reaction (C). Chemical reactions occurring at the m-GEC surface polarized at -0.150 V (vs. Ag/AgCl) upon the addition of H_2O_2 in the presence of mediator (HQ) is also shown in C. (D) Competitive immunoassays for the determination of atrazine in spiked orange juice samples, based on 'dry-assisted affinity' immobilization of the anti-atrazine antibodies ($0.5 \mu\text{g}$) on ProtA(2%)-GEB. The biosensors were incubated with $0.02 \mu\text{g}$ of atrazine-HRP tracer. $n=3$.

nonspecific adsorption. Both images were taken under identical experimental conditions. As the graphite–epoxy is a porous material the image 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 an affinity matrix. This fluorescence can be associated to the Av-GEB areas where not only avidin is exposed but also reached by the 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.

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. Hence, the purpose of cyclic voltammetry experiments was to characterize, rapidly and simply, the electrochemical behavior of the Av-GEB biocomposite. Fig. 8 shows cyclic voltammograms of the Av(2%)-GEB transducer compared with a GEC transducer without avidin. As can be observed in Fig. 8, the presence of avidin in the formulation slightly affects the value for the peak-to-peak separation, increased with the presence of avidin, 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.

1.3.4. Avidin graphite–epoxy biocomposite (Av-GEB) for electrochemical genosensing

The utility of the Av-GEB for electrochemical genosensing was demonstrated for the detection of a genetic sequence related with pathogenic *Salmonella* spp, based on the intrinsic oxidation signal of the DNA coming from the guanine residues.

The Av-GEB biosensor can be easily modified with biotinylated IS200 sequence (GTG ATA TTT ACA GTT CCA TCG GG-biotin) just by dipping the electrode in 140 mL of DNA solution, for 30 min at 42°C with gentle shaking. The signal obtained with 200 pmol of IS200-biotin sequence and using an Av-GEB biocomposite-based transducer was 375 nA higher than the background signal obtained with GEC. In all cases, the transducer was pretreated by applying $+1.20$ V for 1 min in PBS. The guanine oxidation signals were detected using DPV with a modulation amplitude of 100 mV. The oxidation peak height after baseline fitting was used as the

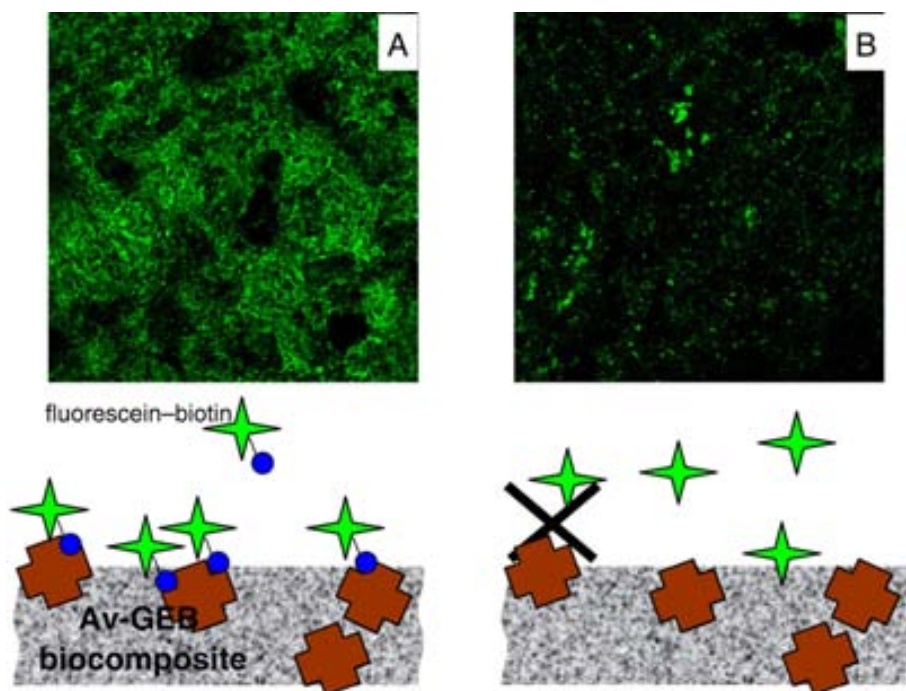


Fig. 7. Confocal laser scanning fluorescence microphotograph for Av-GEB transducers submitted to (A) 80 pmol of biotinylated fluorescein to form the complex Avidin-GEB//fluorescein–streptavidin and (B) nonbiotinylated fluorescein (background adsorption). Laser excitation was at 568 nm; voltage: 352 V. The figure was taken from [33]. Reprinted with permission.

analytical signal. The raw data were treated using the Savitzky and Golay filter (level 4) of the General Purpose electrochemical software (GPES) of Eco Chemie (The Netherlands) with a moving average baseline correction, using a ‘peak width’ of 0.01. The signal is clearly higher when using Av-GEB due to the improved immobilization of the biotin oligonucleotide through the highly oriented biotin/avidin linkage.

2. Conclusion

Graphite–epoxy composites (GEC) and biocomposites (GEB), widely studied by our research group, show excellent transducing features and improved electrochemical behavior compared with other continuous conducting materials such as glassy carbon.

However, the practical features related with the use of universal affinity molecule such as both avidin and Protein A as bioaffinity agents embedded into bulk-modified electrodes have demonstrated to be useful for the sensitive detection of a wide range of biomolecules. 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. The same characteristics were observed for ProtA-GEB, as it was possible for the sensitive detection of atrazine in orange juices by a competitive immunoanalysis, achieving the LOD required by the European commission.

As it was previously demonstrated, GEC materials have shown unique and selective adsorption behavior [34]. While DNA, proteins, enzymes or other biomolecules are shown to be firmly and irreversibly adsorbed on GEC under dry conditions,

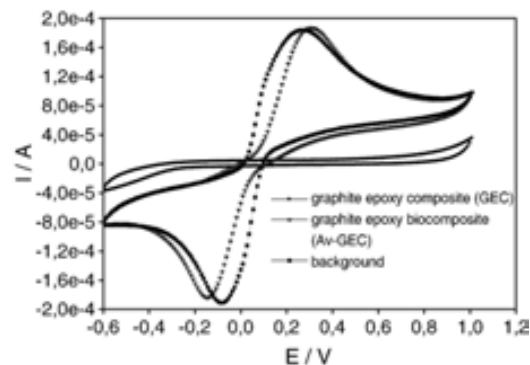


Fig. 8. Electrochemical response of graphite–epoxy composite (GEC) compared with Av-GEB. Cyclic voltamperograms of hydroquinone 3.61 mM, $\nu=50$ mV s⁻¹. In both cases, medium, phosphate buffer 0.1 M, KCl 0.1 M, pH 7.0.

the wet adsorption of nonspecific biomolecules was shown to be negligible under stirring or convection conditions in solution.

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 studied. Future research will also be focused on the controlled spatial deposition of biomolecules (such as DNA and proteins) over the GEB surface for the construction of multiplexed devices using thick film technology.

References

- [1] J.M. Song, T. Vo-Dinh, *Anal. Chim. Acta* 507 (2004) 115.
- [2] B.K. Oh, B.S. Chun, K.W. Park, W. Lee, W.H. Lee, J.W. Choi, *Mater. Sci. Eng., C, Biomim. Mater., Sens. Syst.* 24 (2004) 65.
- [3] J. Wang, X. Cai, C. Jonsson, M. Balakrishnan, *Electroanalysis* 8 (1996) 20.
- [4] A.M. Oliveira Brett, S.H.P. Serrano, I. Gutz, M.A. La-Scalea, M.L. Cruz, *Electroanalysis* 9 (1997) 1132.
- [5] K. Hashimoto, K. Ito, Y. Ishimori, *Anal. Chim. Acta* 286 (1994) 219.
- [6] X. Chu, K. Kinoshita, *Mater. Sci. Eng., B, Solid-State Mater. Adv. Technol.* 49 (1997) 53.
- [7] M. Streat, D.J. Malik, B. Saha, Adsorption and ion-exchange properties of engineered activated carbons and carbonaceous materials, in: A.K. SenGupta, Y. Marcus, J.A. Marinsky (Eds.), *Ion exchange and solvent extraction*, Dekker, New York, 2004, chap 1.
- [8] F. Regisser, M.A. Lavoie, G.Y. Champagne, D. Belanger, *J. Electroanal. Chem.* 415 (1996) 47.
- [9] M.I. Pividori, S. Alegret, DNA adsorption on carbonaceous materials, in: C. Wittmann (Ed.), *Immobilisation of DNA on Chips I. Topics in Current Chemistry Series*, Springer-Verlag, Berlin, 2005.
- [10] R.L. McCreery, K.K. Cline, Carbon electrodes, in: P.T. Kissinger, W.R. Heineman (Eds.), *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*, Dekker, New York, 1996, chap 10.
- [11] I.F. Hu, D.H. Karweik, T. Kuwana, *J. Electroanal. Chem.* 188 (1985) 59.
- [12] L.J. Kepley, A.J. Bard, *Anal. Chem.* 60 (1988) 1459.
- [13] A.M. Oliveira Brett, A.M. Chiorcea, *Langmuir* 19 (2003) 3830.
- [14] L. Wu, J. Zhou, J. Luo, Z. Lin, *Electrochim. Acta* 45 (2000) 2923.
- [15] S. Iijima, *Nature* 354 (1991) 56.
- [16] B.S. Sherigara, W. Kutner, F. D'Souza, *Electroanalysis* 15 (2003) 753.
- [17] H. Cai, X.N. Cao, Y. Jiang, P.G. He, Y.Z. Fang, *Anal. Bioanal. Chem.* 375 (2003) 287.
- [18] J. Li, H.T. Ng, A. Cassell, W. Fan, H. Chen, Q. Ye, J. Koehne, J. Han, M. Meyyappan, *Nano Lett.* 3 (2003) 597.
- [19] S. Alegret, *Analyst* 121 (1996) 1751.
- [20] F. Céspedes, E. Martínez-Fábregas, S. Alegret, *Trends Anal. Chem.* 15 (1996) 296.
- [21] R.N. Adams, *Anal. Chem.* 30 (1958) 1576.
- [22] Z. Li, H. Wang, S. Dong, E. Wang, *Anal. Sci.* 13 (1997) 305.
- [23] T. Lumley-Woodyear, C.N. Campbell, E. Freeman, A. Freeman, G. Georgiou, A. Heller, *Anal. Chem.* 71 (1999) 535.
- [24] J. Sjoquist, B. Meloun, H. Hjelm, *Eur. J. Biochem.* 29 (1972) 572.
- [25] U. De Alwis, G.S. Wilson, *Anal. Chem.* 59 (1987) 2786.
- [26] D.A. Palmer, T.E. Edmonds, N.J. Seare, *Analyst* 117 (1992) 1679.
- [27] B.J. Compton, M. Lewis, F. Whigham, J.S. Gerald, G.E. Countryman, *Anal. Chem.* 61 (1989) 1314.
- [28] E. Zacco, M.I. Pividori, X. Llopis, M. del Valle, S. Alegret, *J. Immunol. Methods* 286 (2004) 35.
- [29] E. Zacco, R. Galve, M.P. Marco, S. Alegret, M.I. Pividori, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) 1707.
- [30] P.B. Lippa, L.J. Sokoll, D.W. Chan, *Clin. Chim. Acta* 314 (2001) 1.
- [31] M.L. Jones, G.P. Kurzban, *Biochemistry* 34 (1995) 11750.
- [32] D. Hernández-Santos, M. Díaz-González, M.B. González-García, A. Costa-García, *Anal. Chem.* 76 (2004) 6887.
- [33] E. Zacco, M.I. Pividori, S. Alegret, *Biosens. Bioelectron.* 21 (2006) 1291.
- [34] M.I. Pividori, A. Merkoçi, S. Alegret, *Biosens. Bioelectron.* 19 (2003) 473.

Towards Q-PCR of pathogenic bacteria with improved electrochemical double-tagged genosensing detection

Biosensors and Bioelectronics, 23 (2008) 1805-1811

A. Lermo, E. Zacco, J. Barak, M. Delwiche, S. Campoy, J. Barbé, S. Alegret, M.I. Pividori



Towards Q-PCR of pathogenic bacteria with improved electrochemical double-tagged genosensing detection

A. Lermo^a, E. Zacco^a, J. Barak^c, M. Delwiche^d, S. Campoy^b, J. Barbé^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 Unitat de Microbiologia, Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Catalonia, Spain

^c Produce Safety and Microbiology Research Unit, Albany, CA 94710, USA

^d Department of Biological and Agricultural, Engineering University of California, Davis, CA 95616, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 December 2007

Received in revised form 13 February 2008

Accepted 21 February 2008

Available online 29 February 2008

Keywords:

Electrochemical DNA biosensor

(Strept)avidin

Magnetic beads

Escherichia coli

Q-PCR

Electrochemical genosensing

ABSTRACT

A very sensitive assay for the rapid detection of pathogenic bacteria based on electrochemical genosensing has been designed. The assay was performed by the PCR specific amplification of the *eaeA* gene, related with the pathogenic activity of *Escherichia coli* O157:H7. The efficiency and selectivity of the selected primers were firstly studied by using standard Quantitative PCR (Q-PCR) based on TaqMan fluorescent strategy. The bacteria amplicon was detected by using two different electrochemical genosensing strategies, a highly selective biosensor based on a bulk-modified avidin biocomposite (Av-GEB) and a highly sensitive magneto sensor (m-GEC). The electrochemical detection was achieved in both cases by the enzyme marker HRP. The assay showed to be very sensitive, being able to detect $4.5 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ and $0.45 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ of the original bacterial genome after only 10 cycles of PCR amplification, when the first and the second strategies were used, respectively. Moreover, the electrochemical strategies for the detection of the amplicon showed to be more sensitive compared with Q-PCR strategies based on fluorescent labels such as TaqMan probes.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The development of rapid, inexpensive, sensitive, and high sample throughput analytical strategies, which can be used as an 'alarm' to rapidly detect the risk of contamination by food pathogens in a wide variety of food matrixes, is an intensive research area. Biosensors offer an exciting alternative to traditional methods, allowing rapid and multiple analyses that are essential for the detection of bacteria in food (Leonard et al., 2003). Moreover, biosensing strategies would be implemented in Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCPs) systems that are, generally accepted, the most effective way to ensure food safety (Mello and Kubota, 2002). An ideal biosensing device for the rapid detection of microorganisms should be fully automated, inexpensive and routinely used both 'in field' and 'in lab'. Optical biosensors are particularly attractive as they can allow direct 'label-free' and 'real-time' detection of bacteria, but they lack of sensitivity. The phenomenon of Surface Plasmon Resonance (SPR), has shown good biosensing potential and many

SPR systems are commercially available (e.g. BIAcore™) (Terry et al., 2005). On the other hand, electrochemically based transduction devices are more robust, user-friendly, portable, sensitive, and cost-effective analytical systems. Furthermore, electrochemical biosensors can operate in turbid media such as food matrixes (Ivnitski et al., 2000; Mehrvar and Abdi, 2004).

The detection of microbial pathogens can be achieved with nucleic acid-based detection which has shown to be more specific and sensitive than immunological-based detection. The Polymerase Chain Reaction (PCR) can be easily coupled to enhance the sensitivity of nucleic acid-based assays. By now, nucleic acid-based detection coupled with PCR has distinct advantages over culture and other standard methods such as specificity, sensitivity, rapidity, accuracy and capacity to detect small amounts of target nucleic acid in a sample. The further amplicon detection can be achieved with electrochemical DNA biosensors (Ye et al., 2003; Nebling et al., 2004; Del Giallo et al., 2005; Liu et al., 2007), reducing the time of the assay and providing results to genetic specificity. Electrochemical DNA biosensors, thus, offer a considerable promise for obtaining sequence-specific information in a faster, simpler and cheaper manner compared to traditional hybridization assays. Such devices possess great potential for numerous applications, ranging from decentralized clinical testing, to environmental monitoring, food safety and forensic investigations. However, the most

* Corresponding author at: Grup de Sensors i Biosensors, Departament de Química, Universitat Autònoma de Barcelona, Edifici Cn, Campus UAB, 08193 Bellaterra, Catalonia, Spain. Tel.: +34 93 581 2118; fax: +34 93 581 2379.

E-mail address: Isabel.Pividori@uab.es (M.I. Pividori).

important drawback related with electrochemical DNA biosensor is the electrochemical detection of the hybridization event in a sensitive label-free manner without the need of amplification of the genetic material.

Escherichia coli is one of the most frequent causative pathogen in human bacterial infections. Enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) O157:H7 is one of the dangerous serotypes of *E. coli* that causes hemorrhagic colitis and severe hemolytic uremic syndrome, which may result in death because of acute or chronic renal failure (Karmali, 1989). Outbreaks of EHEC O157:H7 infections have been associated with food products such as ground beef (Doyle, 1991; Al-Gallal et al., 2002) and raw milk (De Buyser et al., 2001). Furthermore, documented outbreaks infections associated with fruits and vegetables have also occurred with increased frequency (Viswanathan and Kaur, 2001). In food and environmental samples responsible for disease, the levels of contamination are sometimes very low. Thus, very sensitive detection methods are required.

In this work, two different strategies for the electrochemical genosensing detection of *E. coli* were developed based on the amplification of a highly conserved sequence for several pathogenic *E. coli* serotypes. These new assays were compared in terms of specificity and sensitivity with a novel Q-PCR strategy based on TaqMan probe using fluorescence detection. TaqMan probes are oligonucleotides with a reporter dye at the 5' end and a quencher dye at the 3' end, which generate an increase in fluorescence emission when the reporter dye is separated from the quencher in the PCR amplification. Thus, the increase in fluorescence is a direct consequence of the amplification process (Gibson et al., 1996).

First of all, two new set of primers based on the derived consensus sequence were designed in order to produce an amplification product from several pathogenic *E. coli* serotypes by using Q-PCR procedure based on TaqMan probe. The set of primers were chosen and tested in terms of specificity and selectivity. The selected primers were labelled with biotin and digoxigenin in each extreme, in order to perform the rapid electrochemical verification of pathogenic *E. coli*. During PCR, not only the amplification of the pathogenic *E. coli* genome was achieved, but also the double tagging of the amplicon ends with (i) the biotinylated capture primer to achieve the immobilization on the genosensing transducer and (ii) the digoxigenin signalling primer to achieved the enzymatic detection through antiDIG-HRP reporter. The immobilization on the genosensing transducer was performed by using a highly specific avidin-modified biocomposite (Av-GEB) (Zacco et al., 2006a) or, in a second manner, through streptavidin-modified magnetic beads to achieve the further retention of the beads on a highly sensitive magneto sensor (m-GEC) (Erdem et al., 2006; Zacco et al., 2006b).

The results show that the combination of the genome amplification by PCR, capture of the double-tagged amplicon and electrochemical detection using a sensitive m-GEC electrode, provide promising results compared with Q-PCR based on TaqMan probes.

2. Experimental

2.1. Instrumentation

Amperometric measurements were performed with a LC-4C amperometric controller (BAS Bioanalytical Systems). A three-electrode setup was used comprising a platinum auxiliary electrode (Crison 52-67 1, Spain), a double junction Ag/AgCl reference electrode (Orion 900200) with 0.1 M KCl as the external reference

solution, and a working electrode (the GEC, m-GEC or Av-GEB electrode). Temperature-controlled incubations were done in an Eppendorf Thermomixer compact.

The magnetic separation was performed using a magnetic separator Dynal MPC-S (Prod. No. 120.20, Dynal Biotech ASA, Oslo, Norway). The PCR reaction was carried out in an Eppendorf Mastercycler Personal thermocycler.

Amplification and detection of TaqMan Q-PCR were carried out in optical-grade 96 well plates in an ABI 5700 sequence detection system (Applied Biosystems).

2.2. Chemicals and biochemicals

The graphite-epoxy composite and biocomposite were prepared using 50 μm particle size graphite powder (BDH, UK) and Epotek H77 epoxy resin and hardener (both from Epoxy Technology, USA). The Av-GEB biocomposite was prepared with avidin (Prod. No. A9275) coming from Sigma (Steinheim, Germany). The streptavidin-modified magnetic beads were Dynabeads M-280 Streptavidin (Prod. No. 112.06) and were purchased from Dynal Biotech ASA (Oslo, Norway).

Anti-Digoxigenin-POD, Fab fragments (Prod. No. 1207733) and Peroxidase biotinamidocaproyl labelled (Prod. No. P-9568) both of them used as enzyme reporters were purchased from Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germany) and Sigma (Steinheim, Germany), respectively.

Two primers, 32 and 25 nucleotides long, were obtained from TIB-MOLBIOL (Berlin, Germany) and were designed for PCR amplification of *eaeA* gene fragment related to *Escherichia coli*. The primer sequences were Biotinylated *eaeA* up: 5' bio-CTG AAT ATT CCG CAT GAT ATT AAT GGT ACT GA 3', whose 5' end is 228 bp from *eaeA* 5' end, DIG-*eaeA* down: 5' DIG-GTA ATG CAC TAT CAT CCC AGA CGA T 3', whose 5' end is 339 bp from *eaeA* 5' end. The Expand High Fidelity PCR System Kit (Roche Molecular Biochemicals) was used for performing the PCR. For the TaqMan Q-PCR the same primers were used, but in this case without modifications. The TaqMan probe consisted in an oligonucleotide with a 5' fluorescent reporter dye (FAM) and a 3' quencher dye (NQF). The TaqMan probe sequence was 5' FAM-ATCC CAG ACC GTA TTT GC-NQF 3', whose 5' end is 311 bp from *eaeA* 5' end.

All other reagents were of the highest available grade. Aqueous solutions were prepared with double-distilled water. The composition of these solutions were hybridization solution 5 \times SSC (0.75 mol l⁻¹ NaCl, 75 mmol l⁻¹ trisodium citrate, pH 7.0); Tris buffer (0.1 mol l⁻¹ Tris, 0.15 mol l⁻¹ NaCl, pH 7.5); blocking Tris buffer (2%, w/v BSA, 0.1%, w/v Tween 20, 5 mmol l⁻¹ EDTA, in Tris buffer); phosphate buffer (0.1 mol l⁻¹ phosphate, 0.1 mol l⁻¹ KCl, pH 7.0).

2.3. Construction of the magneto graphite-epoxy composite (m-GEC) and avidin graphite-epoxy composite (Av-GEB) transducers

Both types of electrodes were design in our laboratories for electrochemical genosensing (Pividori and Alegret, 2005; Erdem et al., 2006; Lermo et al., 2007); and immunosensing (Zacco et al., 2006a,b). The detailed preparation of the electrodes has been extensively described by Pividori et al. for m-GEC magneto electrodes (Pividori and Alegret, 2005; Pividori et al., 2007a,b) and for Av-GEB electrodes (Zacco et al., 2006a) based on rigid graphite-epoxy composite. In the case of the Av-GEB electrode, avidin was hand mixed with the graphite power and epoxy resin paste, resulting 1% (w/w) bulk-modified biocomposite. The magneto electrodes based on GEC as well as those based on the biocomposite material were cured at 40 °C for 1 week. Before each

use, the electrode surface was renewed by a simple polishing procedure, wetted with doubly distilled water, and then thoroughly smoothed with abrasive paper and finally with alumina paper (polishing strips Prod. No. 301044-001, Orion).

2.4. Sequence selection of the *eaeA* gene and PCR primer design for Q-PCR with TaqMan detection and double tagging for electrochemical detection

First of all, a comparative study of *eaeA* gene of pathogenic *E. coli* was performed. The nucleotide sequences of *eaeA* gene from diverse pathogenic *E. coli* serotypes were obtained from GenBank. All the sequences ($n = 62$) from AEEC, EHEC, EPEC, STEC and ECO *E. coli* were compared using Seqman 5.0 DNA analysis software (DNA*DNASar II, Lasergene, DNATAR Inc., USA) to determine the most conserved sequence among the serotypes of pathogenic strains. Q-PCR assays based on TaqMan probe were performed using a new set of primers designed for the *eaeA* consensus gene fragment. The electrochemical detection of the *eaeA* gene fragment was performed by the new set of primers, but in this case labelled, one of them with biotin and the other one with digoxigenin.

2.5. Q-PCR assay based on TaqMan strategy

A total of 16 strains were used by Q-PCR with TaqMan detection. Preliminary tests were carried out to determine optimum annealing temperature (60 °C and 62 °C), reaction volume (10–20 μl) and primers concentration (200 nmol l^{-1} , 450 nmol l^{-1} , 900 nmol l^{-1}). PCR reactions were performed in a reaction mixture with a total volume of 20 μl containing 9 μl of diluted DNA in sterile water (from 10 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ to 1 $\text{fg } \mu\text{l}^{-1}$, in total eight 10-fold-serial dilutions). Therefore, the final concentrations ranged from 4.5 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ to 0.45 $\text{fg } \mu\text{l}^{-1}$. TaqMan reactions contained 9 μl of a mixture of forward and reverse primers (final concentration 900 nmol l^{-1}) and 1 μl of TaqMan universal master mixture 2 \times (Applied Biosystems). TaqMan amplification conditions were carried out with an initial step at 50 °C for 2 min, and then at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s, and 62 °C for 1 min. Negative controls were carried out using sterile water instead of DNA. Once proved the PCR amplification specificity, the selected sequence and the evaluated primers were used for the PCR amplification in the electrochemical assay.

2.6. Electrochemical characterization and potential setting

The electrodes were evaluated by cyclic voltammetry using hydroquinone as electroactive indicator in order to obtain an estimation of the optimum potential to be applied. The m-GEC and Av-GEB not-modified surfaces were compared with a GEC transducer. The applied potential window scanned by cyclic voltammetry was from -0.6V to 1.0V (vs. Ag/AgCl). Once the characterization was performed, the optimum potential for the electrochemical genosensing was determined by amperometry. To achieve this purpose, the electrode surface was modified with biotin-HRP. In the case of Av-GEB, the electrodes were directly placed in Eppendorf tubes containing 140 μl of biotin-HRP (20 pmol) in blocking Tris buffer. For m-GEC, streptavidin magnetic beads (6.2×10^6) were used to attach biotin-HRP (0.5 pmol) in 140 μl of blocking Tris buffer. In both strategies, the incubation step was performed with gentle shaking for 30 min at 42 °C. Then, two washing steps were performed with Tris buffer. Finally, for m-GEC strategy, the modified beads were captured on the m-GEC electrode by placing the magneto electrode inside the Eppendorf tube. In both cases, the amperometric response was determined in phosphate buffer at the following working potentials: -0.200V ,

-0.150V , -0.100V and -0.050V (vs. Ag/AgCl). The amperometric determination was based on the activity of the HRP enzyme as electrochemical reporter by using hydroquinone as a mediator (1.81 mmol l^{-1}) and hydrogen peroxide as the substrate for the enzyme (4.90 mmol l^{-1}).

2.7. DNA amplification and double tagging for the electrochemical detection of *E. coli*

Two labelled-primers with biotin and digoxigenin, respectively were used for the amplification and the double tagging of the PCR amplicon. The PCR was performed in a 100 μl of reaction mixture containing 2 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ of purified DNA coming from pathogenic *E. coli* O157:H7. Each reaction contained 200 $\mu\text{mol l}^{-1}$ of each deoxynucleotide triphosphate (dATP, dGTP, dCTP, and dTTP), 0.5 $\mu\text{mol l}^{-1}$ of the double-tagging set of primers (Biotinylated *eaeA* up and DIG-*eaeA* down) and 5 U of polymerase. The reaction was carried out in buffer containing 1.5 mmol l^{-1} MgCl_2 .

The amplification mixtures were exposed to an initial step at 95 °C for 5 min followed by cycles of 95 °C for 30 s, 60 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s, and a last step of 7 min at 72 °C. The DNA amplification was performed stopping the reaction at 5, 10, 15, 20, 25 and 30 cycles.

The same protocol was performed but varying the concentration of PCR template (from 4.5 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ to 4.5 $\text{fg } \mu\text{l}^{-1}$, in total seven 10-fold-serial dilutions) in 100 μl of reaction mixture. DNA amplifications were performed stopping the reaction at 10, 15 and 20 cycles.

All of these amplifications included a blank as a control, which contained all reagents except *E. coli* template in the PCR mixture. The amplification products were analyzed by electrophoresis. As the primers were labelled with biotin and digoxigenin, the amplicon was expected to be double-tagged with both biotin and digoxigenin in each extreme, respectively.

2.8. Electrochemical detection of pathogenic *E. coli*

The double-tagged amplicon was detected by using Av-GEB and m-GEC electrodes. The protocol consisted of the following steps: (a) DNA amplification and double-labelling of the *eaeA* gene specific of *E. coli*; (b) immobilization of the doubly labelled amplicon by (b_i) avidin biocomposite, where the biotin extreme of the ds-DNA amplicon was attached to the surface of the Av-GEB and by (b_{ii}) streptavidin magnetic beads strategy, where the 5' biotin end was immobilized on the streptavidin magnetic beads; (c) enzymatic labelling using antiDig-HRP able to be attached in the 3' digoxigenin end of the amplicon; (d) magnetic capture of the modified magnetic particles by the m-GEC electrode (this step was omitted for Av-GEB strategy); (e) electrochemical determination (Fig. 1, steps a–e).

After the DNA amplification and double tagging of the *eaeA* gene, a dilution of the amplified product was prepared in 5 \times SSC. The PCR amplicon was incubated in 5 \times SSC for 15 min at 42 °C.

The immobilization of the doubly labelled amplicon was then achieved by (a) dipping the Av-GEB electrode in an Eppendorf tube containing the diluted amplicon and (b) adding 6.2×10^6 streptavidin magnetic beads in an Eppendorf tube with the diluted amplicon. In both cases, the immobilization was performed in 5 \times SSC solution at a final volume of 140 μl for 30 min at 42 °C.

Two washing steps were then performed with 140 μl 5 \times SSC for 10 min at 42 °C. After that, the enzymatic labelling was performed by using antiDig-HRP (60 μg) in blocking Tris buffer at a final volume of 140 μl for 30 min at 42 °C. Two washing steps were then performed for 10 min at 42 °C in 140 μl of Tris buffer. After the final washing step, in the case of m-GEC strategy, the modified magnetic

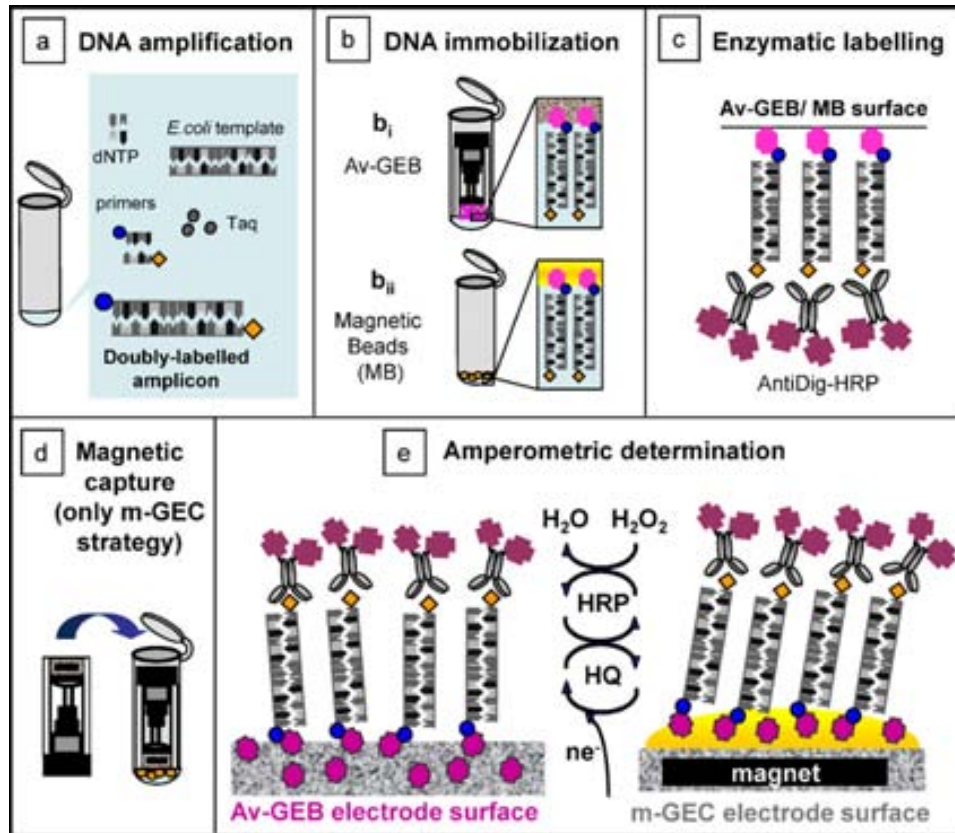


Fig. 1. Schematic representation of the electrochemical strategy for *E. coli* detection.

beads were captured by dipping the electrode inside the reaction tube.

Both genosensing strategies were used to follow the PCR amplification, stopping the reaction mixture at 5, 10, 15, 20, 25 and 30 cycles. In both cases the DNA template concentration evaluated was $2 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$, but using $2.5 \mu\text{l}$ and $5 \mu\text{l}$ of the final PCR mixture, for m-GEC and Av-GEB strategies, respectively.

The detection limit of the electrochemical procedures was evaluated stopping the PCR amplification at 10, 15 and 20 cycles using 10-fold-serial dilutions of the DNA template, ranged from $4.5 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ to $4.5 \text{ fg } \mu\text{l}^{-1}$.

The amperometric determination was performed as in Section 2.6. Fig. 1, step e represents the reactions that occur at m-GEC and Av-GEB sensor surfaces polarized at -0.150 V (vs. Ag/AgCl).

3. Results and discussion

3.1. Sequence selection of the *eaeA* gene and PCR primer design for Q-PCR with TaqMan detection and double tagging for electrochemical detection

Pathogenicity associated with EHEC involved a 94-kDa outer membrane protein called intimin-encoded by the *eaeA* gene-which has been shown to be necessary to produce the attaching-and-effacing lesions on intestinal epithelial cells (Louie et al., 1993; Ibekwe et al., 2002; Barak et al., 2005). Sequences of intimin attaching genes (*eaeA*) of pathogenic *E. coli* were compared in order to obtain a highly conserved gene sequence from which to develop PCR primers. A consensus nucleotide sequence of 469 pb was obtained (showed in the 'Supporting information' section).

A novel set of Q-PCR TaqMan primers for the amplification of *E. coli* O157:H7 as well as other *E. coli* serotypes – that would

be considered human pathogens and undesirable in foods – was selected. The new set of primers was able to produce an amplification product expected to be 112 pb. The amplicon sequence was: **CTGAATATTCCGCATGATATTAATGGTACTGAACRCAGTACGCAGAAG-ATTCARITGATCGTTAAGAGCAAATACGGTCTGGATCGTATCGTCTGG-GATGATAGTCATTAC** where the new set of primers position is shown in bold.

The same set of primers for TaqMan Q-PCR were used for the double-tagging and electrochemical detection, but in this case, were labelled with biotin and digoxigenin, in order to achieve the immobilization and the enzymatic labelling, respectively.

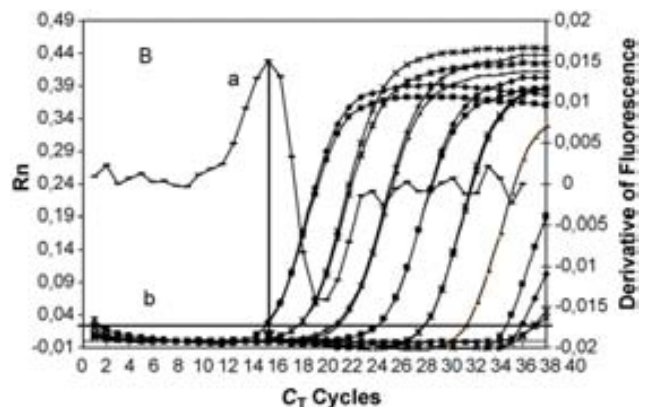


Fig. 2. Amplification plot for TaqMan strategy amplifying DNA of *E. coli* O157:H7. The parallel curves represent 10-fold DNA dilutions from $4.5 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ to $0.45 \text{ fg } \mu\text{l}^{-1}$. The perpendicular to the maximum of the second derivate curve (a) to the abscissa determines the Ct for the first concentration analyzed. The threshold line (b) was after setting.

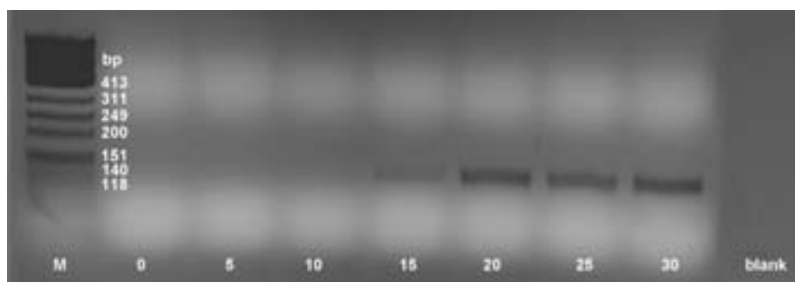


Fig. 3. Gel electrophoresis for the DNA amplification product using the double tagging set of primers.

3.2. Q-PCR assay based on TaqMan strategy

PCR experimental parameters (optimum annealing temperature, reaction volume and primer concentration) were optimized (data not shown). Real-time PCR experiments were carried out using extracted DNAs from 16 strains including pathogenic *E. coli*, non-pathogenic as well as other genera. The primers were able to amplify specifically the *eaeA* gene from all the pathogenic *E. coli* including O157:H7, O157:Neg, O29:NM, O25:NM, and O111:NM. Products for non-pathogenic *E. coli* were not detected. Fig. 2 shows the amplification plot for TaqMan strategy amplifying DNA of *E. coli* O157:H7 after optimization of experimental conditions. The parallel curves represent 10-fold DNA dilutions from $4.5 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ to $0.45 \text{ fg } \mu\text{l}^{-1}$. The perpendicular to the maximum of the second derivative curve (a) to the abscissa determines the threshold cycle (Ct) for the first concentration analyzed, being the Ct the fractional PCR cycle number at which the fluorescent signal is greater than the minimal detection level. The threshold line (b) was after setting. As shown in Fig. 2, Q-PCR with TaqMan strategy displays amplification curves in agreement with the DNA dilutions. A Ct value of 16 was obtained for the first DNA template and Ct increments between dilutions, ranging from 3 to 4. A linear relationship with very good fit was achieved when plotting Ct value with Log_{10} DNA concentration. The specificity of the amplification was obtained analyzing the denaturation profiles of the product and by gel electrophoresis. The melting temperatures were 72°C . The detection limit calculated amplifying *E. coli* O157:H7, was $4.5 \text{ fg } \mu\text{l}^{-1}$ for 37 cycles of PCR amplification.

3.3. Electrochemical characterization and potential setting

Av-GEB and m-GEC electrodes were submitted to cyclic voltammetry in order to obtain an estimation of the optimum working reduction potential of the mediator hydroquinone, which would be used in connection with the enzyme tracer HRP. A reduction

peak was observed at -100 mV for GEC and m-GEC, while in the case of Av-GEB (1%) a slight shift in potential can be observed (-175 mV approximately, vs. Ag/AgCl), accordingly with previous results (Zacco et al., 2006a). Once this rapid characterization was performed, the optimum potential for the electrochemical genosensing was determined by amperometry using a biotinylated enzyme tracer. To achieve this purpose, the electrode surface was modified with biotin-HRP. The optimum potential was finally set in -150 mV for both genosensing strategies based on m-GEC and Av-GEB electrodes (both cyclic voltammetry and amperometric plots are shown in the 'Supporting information' section).

3.4. DNA amplification and double tagging for the electrochemical detection of *E. coli*

Fig. 3 shows the gel electrophoresis of the DNA amplification product using the double-tagging set of primers ($0.5 \mu\text{mol l}^{-1}$ of biotinylated *eaeA* up and DIG-*eaeA* down), with $2 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ of DNA template. In all lanes, $5 \mu\text{l}$ of PCR reaction mixture was loaded. As shown in the picture, the PCR was successful performed with the double-tagging set of primers. Fig. 3 also shows that the double-labelled amplicon can be only observed above cycle 15 (from lanes 5 to 8, for cycles 15 to 30, respectively). No bands were observed in lanes 2, 3 and 4, loaded with the amplicon coming from 0, 5 and 10 cycles, respectively. Comparing with the results obtained with TaqMan Q-PCR (Fig. 2) the Ct cycle for $4.5 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ was determined in 16 and for $0.45 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ in 18.5. Thus the electrophoresis is able to detect the presence of the amplicon at lower concentration of DNA template. Agarose gel electrophoresis results also confirmed the expected size of the product (112 bp).

3.5. Electrochemical detection of pathogenic *E. coli*

The double-tagged amplicon was detected by using Av-GEB and m-GEC electrodes. The eCt (electrochemical threshold cycle) was

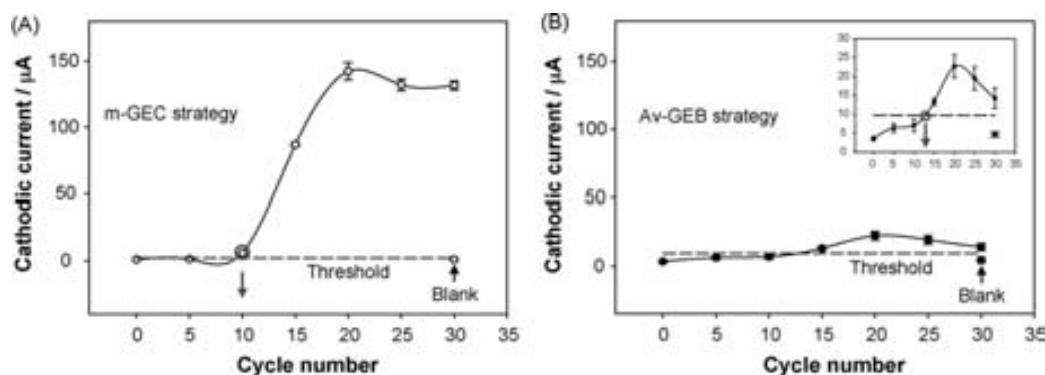


Fig. 4. Electrochemical detection of *E. coli* PCR product based on m-GEC (A) and Av-GEB (B) strategies. In all cases, $60 \mu\text{g}$ AntiDig-HRP was used. 4.90 mmol l^{-1} of H_2O_2 and 1.81 mmol l^{-1} of hydroquinone were also added. The medium was phosphate buffer. Applied potential = -0.15 V (vs. Ag/AgCl); $n = 3$.

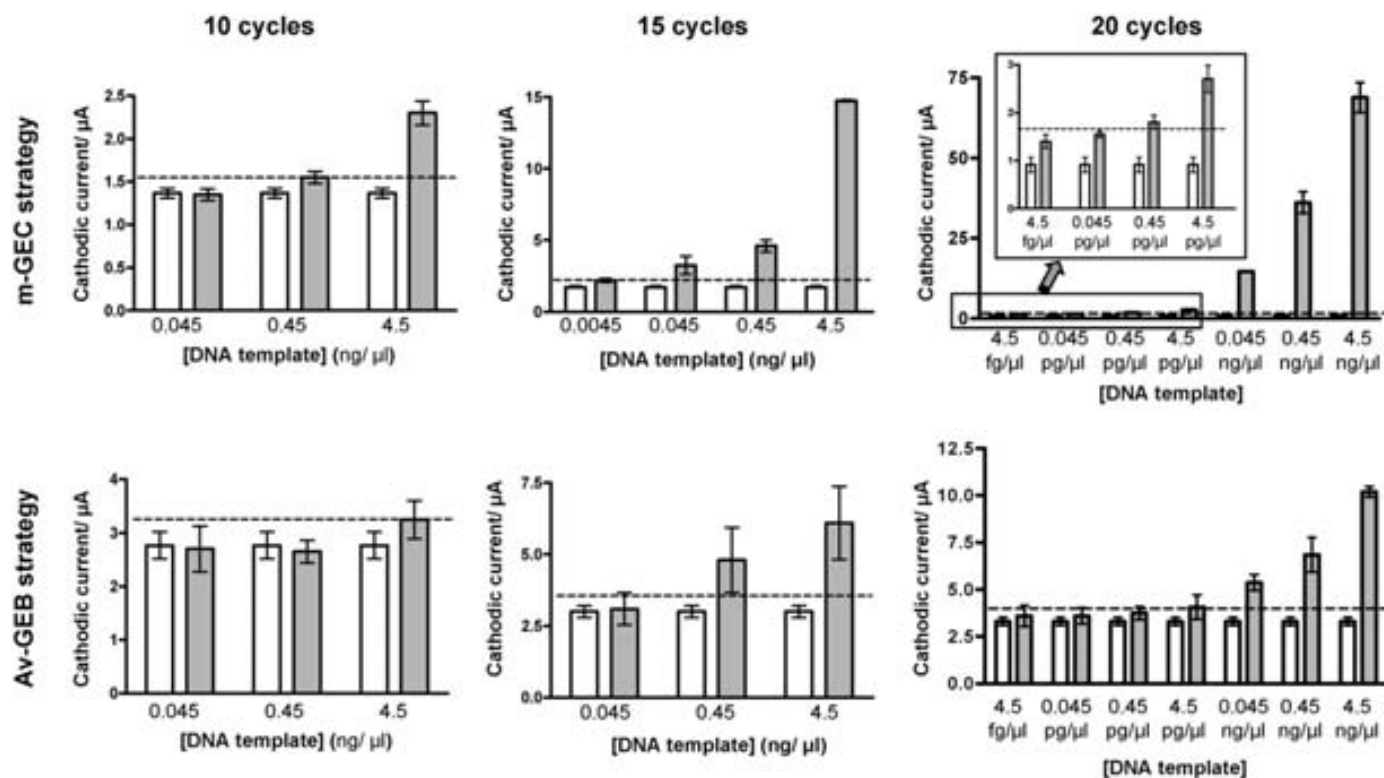


Fig. 5. LOD evaluation for m-GEC and Av-GEB strategies. PCR reactions were stopped at 10, 15 and 20 cycles. The blank controls (white bars) and the detection limit signal (discontinuous line) are shown for each strategy and PCR cycle. DNA template concentrations evaluated ranged from $4.5 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ to $4.5 \text{ fg } \mu\text{l}^{-1}$ (black bars). Other conditions as in Fig. 4.

determined for each strategy. The eCt is the first cycle in which there is a significant increase in the electrochemical signal above the background, taking as the background the signal value of the blank, and as the threshold, 10 times the value of the standard deviation of the background.

As shown in Fig. 4, as low as $2 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ DNA template can be detected after 10 cycles (the eCt) for m-GEC (A) and 13 cycles for Av-GEB (B). Comparing the Q-PCR with electrochemical detection with both TaqMan Q-PCR (17 cycles) and gel electrophoresis (15 cycles), the genosensing strategy (based on m-GEC or Av-GEB as well) is able to detect the amplification in much less number of cycles. Moreover, it should be pointed out that while in the case of Q-PCR with TaqMan the volume of reaction was $20 \mu\text{l}$, in the case of the electrochemical detection as low as $2.5 \mu\text{l}$ (m-GEC) and $5 \mu\text{l}$ (Av-GEB) were employed for the electrochemical detection.

Regarding the electrochemical genosensing strategies, m-GEC is able to detect the double-tagged amplicon in a less number of cycles than Av-GEB.

The detection limit of the electrochemical procedures was evaluated stopping the PCR amplification at 10, 15 and 20 cycles, using 10-fold-serial dilutions of the DNA template, ranging from $4.5 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ to $4.5 \text{ fg } \mu\text{l}^{-1}$. In all cases $5 \mu\text{l}$ of PCR amplicon was analyzed. The electrochemical response for both electrochemical strategies is shown in Fig. 5. As can be seen, the analytical response increases with the concentration of DNA template analyzed. In the case of m-GEC strategy, detection limits of $0.45 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$, $4.5 \text{ pg } \mu\text{l}^{-1}$ and $0.45 \text{ pg } \mu\text{l}^{-1}$ were obtained at 10, 15 and 20 cycles, respectively. For Av-GEB strategy, the detection limits at 10, 15, and 20 cycles were $4.5 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$, $0.45 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ and $4.5 \text{ pg } \mu\text{l}^{-1}$, respectively. As the previous results indicated, the electrochemical detection based on m-GEC strategy permits to detect low concentrations of the amplified material in relation to Av-GEB strategy.

4. Conclusions

A novel electrochemical assay for the sensitive DNA detection of pathogenic strains of *E. coli* has been developed. The assay is based on the amplification of the bacteria genome and the double tagging in order to achieve the immobilization and the electrochemical detection by using both tags.

The assay has been used for the electrochemical detection of the *eaeA* gene, related with the pathogenic activity of *E. coli* O157:H7. The biological material has been amplified by PCR using a new set of primers, which were chosen and tested in terms of specificity and selectivity by TaqMan Q-PCR procedure. The new set of primers obtained from the derived *eaeA* consensus gene fragment, was able to produce an amplification product from several pathogenic *E. coli* serotypes.

On the other hand, the new set of primers for Q-PCR with electrochemical detection were double tagged, in order to achieve the double tagging of the amplicon during PCR amplification. A unique band, as shown in gel electrophoresis and as in the case of Q-PCR with TaqMan detection, was obtained, ensuring the specificity of the assay for detecting *E. coli*.

The immobilization of the amplicon can be thus performed on avidin-modified magnetic bead followed with magnetic capture on m-GEC electrodes, or directly on avidin-modified biosensors (Av-GEB).

The use of Av-GEB electrodes provided improved features regarding selectivity of the assay by the direct interaction of the avidin surface with the biotinylated amplified material, while m-GEC strategy provided both enhanced selectivity and sensitivity by the use of streptavidin magnetic beads, which immobilized the biotinylated amplified material on the m-GEC surface and permitted a rapid magnetic separation of the unbound components.

These new strategies based on double tagging-PCR followed with electrochemical genosensing showed to be very sensitive. After only 10 cycles of PCR amplification, as low as $4.5 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ and $0.45 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ of original bacterial genome were detected by using Av-GEB and m-GEC strategies, respectively.

For the first time, from a consensus sequence, two primer based on different Q-PCR strategies were compared in terms of sensitivity for the amplification of pathogenic *E. coli* by using TaqMan detection and different electrochemical biosensing strategies. *E. coli* amplified material was detected by m-GEC in less number of cycles than Av-GEB strategy (10 and 13 cycles, respectively). However, the two-genosensing strategies were able to detect the amplification in much less number of cycles than TaqMan Q-PCR and gel electrophoresis (17 and 15, respectively). Moreover, the reaction volume analyzed by electrochemical strategies was four and eight times lower than in the case of TaqMan Q-PCR.

The combination of the genome amplification by double-tagging PCR, capture of the double-tagged amplicon and electrochemical genosensing detection by using the sensitive m-GEC electrode, provides a rapid, cheap and sensitive assay to quantify pathogenic *E. coli*.

Future work will be focused on multicoding genosensing of pathogenic bacteria.

Acknowledgments

Financial support from Ministry of Education and Science (MEC), Madrid (Project BIO2007-63300), is acknowledged. M.I.P. also acknowledges the financial support from the Universidad Nacional del Litoral (Argentina) and Agencia Española de Cooperación Internacional (Project A/6488/06).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bios.2008.02.020.

References

- Al-Gallas, N., Ben Aissa, R.R., Attia Annabi, T., Bahri, O., Boudabous, A., 2002. Food Microbiol. 19 (4), 389–398.
- Barak, J.D., Sananikone, K., Delwiche, M.J., 2005. Lett. Appl. Microbiol. 41 (2), 112–118.
- De Buyser, M.-L., Dufour, B., Maire, M., Lafarge, V., 2001. Int. J. Food Microbiol. 67 (1–2), 1–17.
- Del Giallo, M.L., Ariksoysal, D.O., Marrazza, G., Mascini, M., Ozsoz, M., 2005. Anal. Lett. 38 (15), 2509–2523.
- Doyle, M.P., 1991. Int. J. Food Microbiol. 12 (4), 289–301.
- Erdem, A., Pividori, M.I., Lermo, A., Bonanni, A., Valle, M.D., Alegret, S., 2006. Sens. Actuators B: Chem. 114 (2), 591–598.
- Gibson, U.E., Heid, C.A., Williams, P.M., 1996. Genome Res. 6 (10), 995–1001.
- Ibekwe, A.M., Watt, P.M., Grieve, C.M., Sharma, V.K., Lyons, S.R., 2002. Appl. Environ. Microbiol. 68 (10), 4853–4862.
- Ivnitski, D., Abdel-Hamid, I., Atanasov, P., Wilkins, E., Stricker, S., 2000. Electroanalysis 12 (5), 317–325.
- Karmali, M.A., 1989. Clin. Microbiol. Rev. 2 (1), 15–38.
- Leonard, P., Hearty, S., Brennan, J., Dunne, L., Quinn, J., Chakraborty, T., O’Kennedy, R., 2003. Enzyme Microb. Technol. 32 (1), 3–13.
- Lermo, A., Campoy, S., Barbe, J., Hernandez, S., Alegret, S., Pividori, M.I., 2007. Biosens. Bioelectron. 22 (9–10), 2010–2017.
- Liu, Y., Elsholz, B., Enfors, S.-O., Gabig-Ciminska, M., 2007. J. Microbiol. Methods 70 (1), 55–64.
- Louie, M., de Azavedo, J.C., Handelsman, M.Y., Clark, C.G., Ally, B., Dytoc, M., Sherman, P., Brunton, J., 1993. Infect. Immun. 61 (10), 4085–4092.
- Mehrvar, M., Abdi, M., 2004. Anal. Sci. 20 (8), 1113–1126.
- Mello, L.D., Kubota, L.T., 2002. Food Chem. 77 (2), 237–256.
- Nebling, E., Grunwald, T., Albers, J., Schafer, P., Hintsche, R., 2004. Anal. Chem. 76 (3), 689–696.
- Pividori, M.I., Alegret, S., 2005. Anal. Lett. 38, 2541–2565.
- Pividori, M.I., Lermo, A., Campoy, S., Barbe, J., Alegret, S., 2007a. Comprehensive Analytical Chemistry, 49. Elsevier, pp. e221–e226.
- Pividori, M.I., Lermo, A., Campoy, S., Barbe, J., Alegret, S., 2007b. Comprehensive Analytical Chemistry, 49. Elsevier, pp. e227–e231.
- Terry, L.A., White, S.F., Tigwell, L.J., 2005. J. Agric. Food Chem. 53 (5), 1309–1316.
- Viswanathan, P., Kaur, R., 2001. Int. J. Hyg. Environ. Health 203 (3), 205–213.
- Ye, Y.K., Zhao, J.H., Yan, F., Zhu, Y.L., Ju, H.X., 2003. Biosens. Bioelectron. 18 (12), 1501–1508.
- Zacco, E., Pividori, M.I., Alegret, S., 2006a. Biosens. Bioelectron. 21 (7), 1291–1301.
- Zacco, E., Pividori, M.I., Alegret, S., Galve, R., Marco, M.P., 2006b. Anal. Chem. 78 (6), 1780–1788.

TOWARDS Q-PCR OF PATHOGENIC BACTERIA WITH IMPROVED ELECTROCHEMICAL DOUBLE-TAGGED GENOSENSING DETECTION

Supporting information

A. Lermo¹, E. Zacco³, J.Barak⁴, M. Delwiche³, S. Campoy², J. Barbé², S. Alegret¹, M.I. Pividori*¹

¹ Grup de Sensors i Biosensors, Departament de Química, Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra, Catalonia, Spain

² Unitat de Microbiologia, Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra, Catalonia, Spain

³ Department of Biological and Agricultural, Engineering University of California. Davis, CA 95616, USA

⁴ Produce Safety and Microbiology Research Unit. Albany, CA 94710, USA

Corresponding author. E-mail: Isabel.Pividori@uab.es. Fax: +34 93 581 2379; Tel: +34 93 581 2118

Figure Captions

```
5'CTCCGATTCC TCTGGTGACG ATGGGGATCG ATTACCGTCA
TGGTACGGGT AATGAAAATG ATCTCCTTTA CTCAATGCAG
TTCCGTTATC AGTTTGATAA AYCGTGGTCT CAGCAAATYG
ARCCACAGTA TGTTAACGAG TTAAGAACAT TATCRGGCAG
CCGTTACGAT CTGGTTCAGC GTAATAACAA TATTATTCTG
GAGTACAARA AGCAGGATAT TCTTTCTCTG AATATTCCGC
ATGATATTAA TGGTACTGAA CRCAGTACGC AGAAGATTCA
RTTGATCGTT AAGAGCAAAT ACGGTCTGGA TCGTATCGTC
TGGGATGATA GTGCATTACG YAGYCAGGGC GGYCAGATTC
AGCATAGCGG AAGCCAAAGC GCACAAGAYT ACCAGGCTAT
TTTGCTGCT TATGTGCAAG GTGGYAGCAA TATTTATAAA
GTGACSGCTC GCGCCTATGA CCGWAATGG 3'
```

Figure i. Nucleotide sequence selected as target (469 bp), primers (underlines) and probe (in bold) positions for TaqMan strategy. The mismatches observed between the different pathogenic E.coli strains are remarked with: "Y, R, S and W", where "Y" corresponds to a high presence either of the bases C and T, "R" for the bases A and G, "S" for C and G and "W" for A and T. The amplicon is shown as the shadow region of the gene.

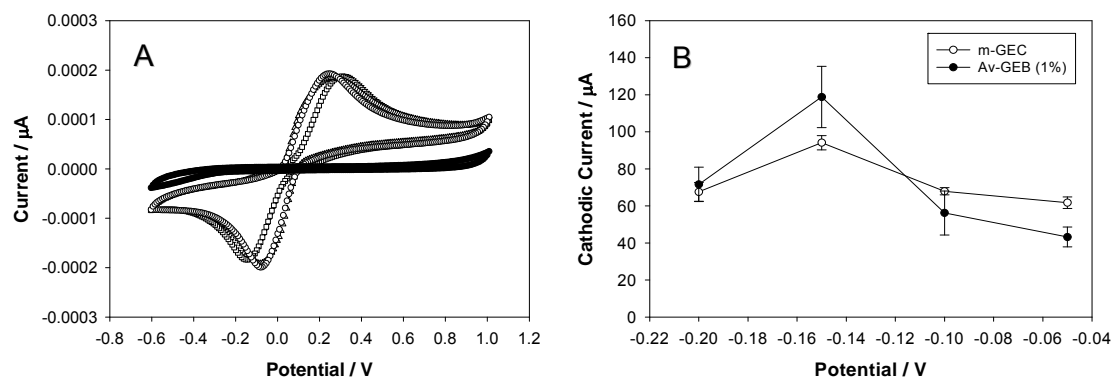


Figure ii. (A) Comparative study of the different transducers by cyclic voltammetry: (O) m-GEC, (\square) Av-GEB and (Δ) GEC, using hydroquinone (1.81 mmol L^{-1}) as mediator. The background signal without hydroquinone is also shown (\bullet). $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. (B) Optimization of the working potential by chronoamperometry. Av-GEB (1%) was modified with 20 pmols biotin-HRP while m-GEC was covered with streptavidin magnetic beads (6.2×10^6) modified with biotin-HRP (0.5 pmols). 4.90 mmol L^{-1} of H_2O_2 and 1.81 mmol L^{-1} of hydroquinone were also added. In all cases the medium was phosphate buffer. The applied potential was vs. Ag/AgCl; $n=3$.

Immunoassay for folic acid detection in vitamin-fortified milk based on electrochemical magneto sensors

Biosensors and Bioelectronics, 24 (2009) 2057-2063

A. Lermo, S. Fabiano, S. Hernández, R. Galvé, M.-P. Marco, S. Alegret and M.I.Pividori



Immunoassay for folic acid detection in vitamin-fortified milk based on electrochemical magneto sensors

A. Lermo^a, S. Fabiano^c, S. Hernández^c, R. Galve^b, 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), IQAC-CSIC, 08034 Barcelona, Catalonia, Spain*

^c *Laboratorio de Sensores y Biosensores, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, 3000 Santa Fe, Argentina*

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 July 2008

Received in revised form 21 October 2008

Accepted 22 October 2008

Available online 6 November 2008

Keywords:

Folic acid

Electrochemical immunosensor

Indirect competitive immunoassay

Magnetic beads

Fortified milk

ABSTRACT

An immunoassay-based strategy for folic acid in vitamin-fortified milk with electrochemical detection using magneto sensors is described for the first time. Among direct and indirect competitive formats, best performance was achieved with an indirect competitive immunoassay. The immunological reaction for folic acid (FA) detection was performed, for the first time on the magnetic bead as solid support by the covalent immobilization of a protein conjugate BSA-FA on tosyl-activated magnetic bead. Further competition for the specific antibody between FA in the food sample and FA immobilized on the magnetic bead was achieved, followed by the reaction with a secondary antibody conjugated with HRP (AntiIgG-HRP). Then, the modified magnetic beads were easily captured by a magneto sensor made of graphite–epoxy composite (m-GEC) which was also used as the transducer for the electrochemical detection. The performance of the immunoassay-based strategy with electrochemical detection using magneto sensors was successfully evaluated using spiked-milk samples and compared with a novel magneto-ELISA based on optical detection. The detection limit was found to be of the order of $\mu\text{g l}^{-1}$ (13.1 nmol l^{-1} , $5.8 \mu\text{g l}^{-1}$) for skimmed milk. Commercial vitamin-fortified milk samples were also evaluated obtaining good accuracy in the results. This novel strategy offers great promise for rapid, simple, cost-effective and on-site analysis of biological and food samples.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Folates, as various forms of tetrahydrofolate (THF) integrating the vitamin B group, are substrates and coenzymes involved in the acquisition, transport, and enzymatic processing of one-carbon units for amino acid and nucleic acid metabolism and metabolic regulation.

In order to prevent folate deficiency in individuals, folic acid is added to many food products. Supplementation is particularly important with pregnant women, as insufficient folic acid can cause neural tube defects in the developing foetus. Moreover, folate deficiency is the most common cause of anaemia after iron deficiency. Finally, a growing number of studies suggest that diminished folate status is associated with enhanced carcinogenesis, as folic acid together with vitamin B12 participates in the synthesis of DNA and RNA (Hoegger et al., 2007).

It was customary to use the terms ‘folic acid’, ‘folate’, or ‘folacin’ interchangeably for all of the pteroylglutamic acid derivatives and

their γ -polyglutamic acid conjugates. More recently, the term ‘folic acid’ is reserved for the parent and commercially available pteroylmonoglutamic acid which is in the oxidized state, whereas ‘folate’ is used to describe the derivatives which typically occur in natural foods and tissues (Bates, 2003). Folates are a mixture of non-substituted polyglutamyl tetrahydrofolates and various substituted one-carbon forms of tetrahydrofolate (e.g., 5-methyl, 10-formyl). As these reduced forms are chemically labile, natural folates rapidly lose activity in foods over periods of days or weeks. This is in contrast to the stability of the synthetic form of the vitamin, the folic acid, which is very resistant to chemical oxidation. Food fortification with this stable form can thus add significant amounts of folate to the diet.

Folic acid fortification of grain, estimated to supply on average an additional 100 μg daily, has introduced on a mandatory basis in US since 1996 (FDA Fact Sheet, 1996) and recent evidence shows that this measure has resulted in a 19% reduction in neural tube defects (Honein et al., 2001). Many countries have begun procedures to follow the example of the US in fortifying flour-based products. Milk fortification is also a common strategy and involves the addition, in most of the fortified-milk commercially available, of folic acid in the concentration of 30 μg in 100 ml.

* Corresponding author. Tel.: +34 93 581 4937; fax: +34 93 581 2379.
E-mail address: Isabel.Pividori@uab.es (M.I. Pividori).

The appearance of non-metabolized folic acid in the circulation was demonstrated following simulation of fortification conditions as well as consumption of physiological doses of folic acid (Kelly et al., 1997). Although folic acid is not thought to be toxic, it may contribute to the potential masking of pernicious anaemia in the elderly, as well as interfering with anticonvulsive therapy or cancer treatment with antifolates. Beside this, a rapid assay for folic acid may be mandatory to control the practice of “overage” during food preparation.

Given the vitamin losses during thermal processing, the manufacturers would often add a higher amount to ensure that the product did not provide less than the labelled amount. Moreover, fortification with synthetic vitamins usually occurs through dry spraying of the crystalline powder on the food matrix, a process bearing the risk of heterogeneous repartition of the vitamin in the solid or powder products which should be controlled. As a result, efficient control programs should be performed to investigate whether the folic acid values found agreed with those on the nutritional labels (EEC Council Directive, 1990).

The classical culture procedure depends on the extent of growth of a specific folate-dependent bacterial species, with long analysis times and relatively low precision. Many immunological-based assays (IAs) have been developed for the sensitive detection of folic acid in food samples (Reichert and Rubach, 1991; Das Sarma et al., 1995). Moreover, recent advances allow the IAs to be performed on magnetic beads as a support (Palecek et al., 2002; Centi et al., 2005). Due to the improved washing and separation steps when using magnetic beads, the matrix effect is minimized. 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.

Alternatives to microbiological methods and immunoassay for folate analysis in food include liquid chromatography (Sweeney et al., 2003; Perez Prieto et al., 2006; Quinlivan et al., 2006). However, 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 control by the official laboratories becomes problematic.

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. Biosensors offer an exciting alternative to more traditional methods for food analysis. Optical biosensing devices based on SPR for folic acid detection have been reported (Caselunghe and Lindeberg, 2000; Indyk et al., 2000; Gao et al., 2008).

Although excellent performance with SPR devices towards the detection of folic acid in milk samples has been demonstrated, electrochemical-based approaches can provide fast, simpler, user-friendly, low-cost and in-field detection. These features are ideal for a device to be used in Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) as a systematic approach for food safety (Slatter, 2003).

An electrochemical immunosensing strategy based on a magneto sensor is presented in this paper, as a sensitive, simple, inexpensive and user-friendly analytical method compared to classical assays for the detection of folic acid in milk samples.

This strategy combines the advantages taken from immunochemical assays, magnetic beads separation, and electrochemical transduction (Alegret, 2003). The assay relies for the first time on an indirect competitive immunoassay, between folic acid in the sample and folic acid covalently coupled on magnetic beads, for the specific antibody. A secondary-enzyme labeled antibody is used to achieve the electrochemical detection. The modified

magnetic beads are then captured by the magnetic field on the magneto sensor. As it will be demonstrated, this electrochemical immunosensing strategy offers many potential advantages compared to the traditional methods as well as the classical immunological strategies.

2. Materials and methods

2.1. Instrumentation

The electrochemical instrumentation and electrodes has been previously reported (Lermo et al., 2008). Temperature-controlled incubations in Eppendorf tubes were performed in an Eppendorf Thermomixer compact. Polystyrene microtiter plates were purchased from Nunc (Maxisorb, Roskilde, DK). Washing steps were carried out using a SLT 96PW microplate washer (SLT Labinstruments GmbH, Salzburg, Austria). 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 Graph Prism software (GraphPad Software, San Diego, CA). The magnetic separation during the washing steps was performed using a magnetic separator Dynal MPC-S (Prod. No. 120.20D, Dynal Biotech ASA, Norway) or 96-Well Plate Separation Rack (Prod. No. CD1001, Cortex Biochem, CA, USA).

2.2. Chemicals and immunochemicals

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). Folic acid (FA) and bovine serum albumin (BSA) were provided from Sigma. The stock solution of FA (10 mmol l^{-1}) was prepared in dimethylsulfoxide (DMSO, Merck) and stored at 4 °C. Monoclonal mouse folic acid antibody (clone VP-52, Ab) and anti-mouse polyvalent immunoglobulin peroxidase conjugate (AntilgG-HRP) were provided by Sigma.

The Bradford solution (BIO-RAD protein assay cat no. 600-0005) was purchased from BIO-RAD laboratories GmbH (Munich, Germany). All buffer solutions were prepared with milliQ water and all other reagents were in analytical reagent grade (supplied from Sigma and Merck). The composition of these solutions were: PBS (10 mmol l^{-1} phosphate buffer, 0.8% w/v NaCl, pH 7.5); PBST and PBST_C (PBS with 0.05% and 0.01% v/v of Tween 20 added, respectively); coating buffer (0.05 mmol l^{-1} carbonate–bicarbonate buffer, pH 9.6); citrate buffer (0.04 mmol l^{-1} sodium citrate, pH 5.5); PBS_E (0.1 mol l^{-1} phosphate buffer, 0.1 mol l^{-1} KCl, pH 7.0); McIlvaine buffer (80 mmol l^{-1} phosphate buffer, 60 mmol l^{-1} citric acid, 10 mmol l^{-1} Na₂EDTA, pH 3.5). The milk-reference solution was prepared by mixing skimmed milks and diluting them 1/10 in PBST_C.

2.3. Construction of magneto graphite–epoxy composite (m-GEC) electrodes

The m-GEC electrodes were designed in our laboratories for electrochemical genosensing (Pividori and Alegret, 2005; Erdem et al., 2006; Lermo et al., 2008); and immunosensing (Zacco et al., 2006, 2007). The detailed preparation of the electrodes has been extensively described by Pividori et al. for renewable m-GEC magneto electrodes based on rigid graphite–epoxy composite (Pividori and Alegret, 2005; Pividori et al., 2007).

2.4. Preparation of the protein conjugates for folic acid (BSA-FA and FA-HRP)

Folic acid (FA) was covalently attached through its carboxylic acid groups to the lysine groups of both BSA (bovine serum albumin) as well as HRP (horseradish peroxidase) via the active ester method (Schneider and Hammock, 1992). Experimental details are described in the [Supplementary Material section](#).

2.5. BSA-FA binding to the magnetic beads

The synthesized BSA-FA conjugate was covalently coupled to the tosyl-activated magnetic beads. Experimental details for this procedure are extensively described in the [Supplementary Material section](#). Before each assay, a volume of tosyl-modified magnetic beads corresponding to the desired amount was washed three times with PBS and resuspended in a volume of PBST in order to obtain the desired concentration of magnetic beads in 100 μl .

2.6. Immunoassay optimization

Direct and indirect competitive assays for folic acid were compared to a classic ELISA (96-well polystyrene microtiter plate with optical detection). In the direct assay, the enzyme tracer conjugated with folic acid (FA-HRP) competes with folic acid (FA) for the binding sites of the specific antibody (Ab) immobilized on the solid support, whereas in the indirect assay, the protein conjugate (BSA-FA) is immobilized on the solid support and the competition is established between FA in the sample and the immobilized BSA-FA, for the specific antibody (Ab) in solution, as shown in [Fig. 1](#). In this case, the amount of specific antibody specifically bound on the solid support is determined using a secondary antibody conjugated with HRP as enzyme label (AntiIgG-HRP). When the competitive assay was optimized, a set of experimental parameters (such as pre-

incubation time, incubation time, detergent concentration, ionic strength and pH) were also studied and optimized to improve the immunoassay, as detailed described in the [Supplementary Material section](#).

2.7. Indirect competitive magneto-ELISA procedure

Two-dimensional experiments were performed using the indirect competitive magneto-ELISA procedure with optical detection in order to select optimum concentrations for both the folic acid modified magnetic beads, and the specific folic acid antibody. Optimal concentrations were chosen to produce a signal ranging from 0.7 and 1 absorbance units. Experimental details for this procedure are extensively described in the [Supplementary Material section](#).

The standard curve was fitted to a four-parameter logistic equation according to the formula $y = \{(A - B) / [1 + 10^{\exp((\log C - \log X) \times D)}] + B$, where A is the maximal absorbance, B is the minimum absorbance, C is the concentration producing 50% of the maximal absorbance, X is the folic acid concentration and D is the slope at the inflection point of the sigmoid curve. LOD values were obtained as 90% of A value. Moreover, CV values for $n = 3$ were obtained for the IC50 concentration. In all cases, the error bars shown in all figures represent the standard deviation for $n = 3$.

2.8. Matrix effect

The term matrix effect is related with the sum of all interference effects that influence the final results in an analytical method. Due to the composition of milk, involving high contents of fat, protein and minerals (Marshall, 2003), it is expected that this complex matrix content will affect the immunological interaction between folic acid and its specific antibody. For this reason, the matrix effect was evaluated in skimmed milk obtained from local retail stores. Skimmed milk samples were submitted to different treatments (dilution of the sample, milk centrifugation and protein precipi-

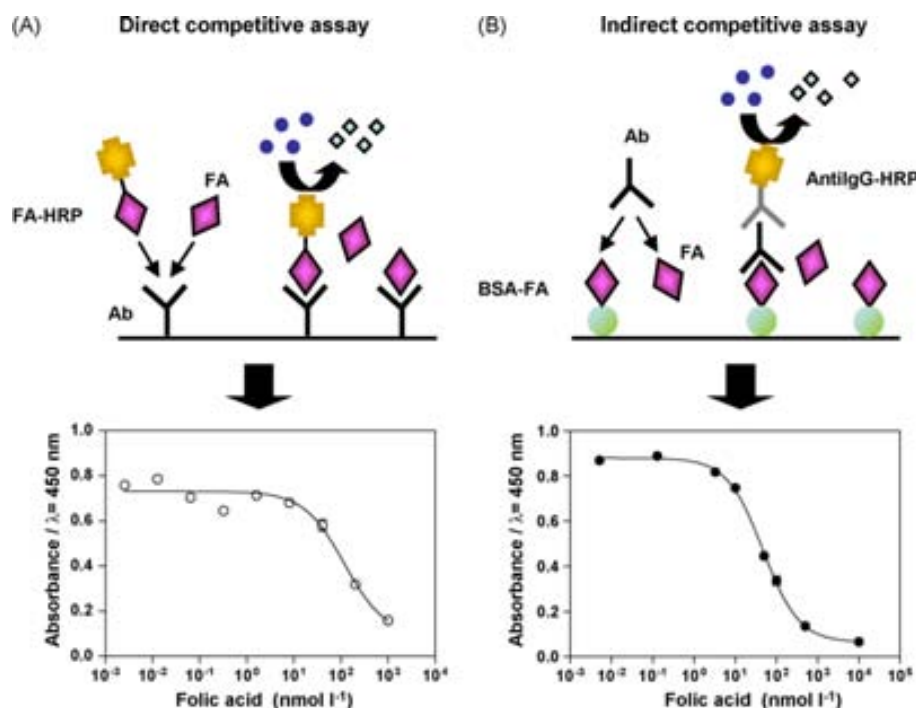


Fig. 1. Up: Direct (A) and indirect (B) competitive immunoassays for folic acid detection. Down: Comparative results obtained with both strategies in PBST buffer. Experimental conditions: (○) 0.2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Ab and 0.03 $\mu\text{g ml}^{-1}$ FA-HRP; (●) 0.035 $\mu\text{g ml}^{-1}$ BSA-FA, 1/64,000 Ab and 1/6000 AntiIgG-HRP. The error bars show the standard deviation for $n = 3$.

tation with McIlvaine buffer) in order to overcome matrix effect (experimental details shown in Supplementary Material).

For the evaluation of the matrix effect in the untreated milk as well as the milk submitted to the different treatment, the standard curves in spiked-milk with folic acid were compared with the same curves performed in PBST_C.

2.9. Immunoassay with electrochemical magneto sensors

A schematic representation of the whole procedure is shown in Fig. S1 in the Supplementary Material section. The indirect 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. The optimal concentration of specific antibody and the BSA-FA modified magnetic beads were chosen to produce between 0.5 and 3 μ A of amperometric response. For this purpose, a two-dimensional assay was performed, by adding increasing concentrations of modified magnetic beads (ranging from 0.025 to 0.2 mg ml⁻¹) and 100 μ l of specific antibody (ranging from 1/16,000 to 1/64,000).

In the competitive assay 100 μ l of BSA-FA modified magnetic beads (0.2 mg ml⁻¹) were added and the supernatant solution was separated. Then, 50 μ l of folic acid standard solutions (in PBST_C or, in order to overcome matrix effect, in milk-reference solution prepared by mixing skimmed milks and diluting them 1/10 in PBST_C) were added followed by the addition of 50 μ l of specific antibody (diluted 1/32,000 in PBST_C). The competitive immunological reaction was allowed to proceed with vigorous shaking for 30 min at room temperature. The magnetic beads were then washed with 100 μ l of PBST three times. 100 μ l of a secondary antibody AntiIgG-HRP (diluted 1/6000 in PBST) were added and incubated for 30 min at room temperature. The magnetic beads were washed again with 100 μ l of PBST three times. After that, the beads were resuspended in 140 μ l of PBST and captured by dipping the magneto sensor (m-GEC) into the tubes. The distribution of the magnetic beads on the m-GEC electrodes has been previously studied in detail by SEM (Zacco et al., 2006; Lermo et al., 2007). 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 of PBS_E. The response was determined by polarizing the m-GEC electrode at -0.150 V. The electrochemical signal was based on the enzymatic activity of the HRP under the addition of H₂O₂ (4.90 mmol l⁻¹) as the substrate and hydroquinone (1.81 mmol l⁻¹) as a mediator. The standard curve was fitted to a four-parameter logistic equation according to the formula $y = \{(A - B) / [1 + 10 \exp((\log C - \log X) \times D)]\} + B$, where A and B are the maximal and minimal amperometric signal, respectively, while C is the concentration producing 50% of the maximal amperometric signal, X is the folic acid concentration and D is the slope at the inflection point of the sigmoid curve. LOD values were obtained as 90% of A value. Moreover, CV values for $n=3$ were obtained for the IC50 concentration. In all cases, the error bars shown in all figures represent the standard deviation for $n=3$.

2.10. Accuracy studies and folic acid determination in fortified-milk

Milk samples were spiked with folic acid simulating fortified-milk to obtain several solutions from 160 to 2500 nmol l⁻¹ of folic acid and then they were diluted 1/10 in PBST_C. The samples were analyzed by the magneto-ELISA strategy and the immunoassay with electrochemical magneto sensors.

Folic acid content was also determined in commercial fortified milk using both strategies. The results were compared with the labeled values of folic acid in commercial fortified milk samples.

3. Results and discussion

3.1. Immunoassay optimization

Direct and indirect competitive assays for the detection of folic acid were performed using a classic ELISA experiments in microtiter plates. Although a direct competitive assay is simpler and involves only one step, in this case better results were achieved when an indirect competitive assay was performed (IC50 of 78.1 nmol l⁻¹ and LOD of 2.5 nmol l⁻¹ for direct competitive assay while IC50 of 24.6 nmol l⁻¹ and LOD of 2.8 nmol l⁻¹ for indirect competitive assay) (Fig. 1, down). The CV values were also calculated for IC50 concentration, being 1% and 2%, respectively. Experimental parameters such as pre-incubation time, incubation time, Tween 20 concentration, ionic strength and pH were also studied. The results for the optimization of the experimental parameters are discussed in the Supplementary Material section. As a conclusion, the best Absmax/IC50 ratio value related with improved limit of detection for the assay was obtained by performing the competitive step for 30 min without any previous pre-incubation using PBST_C (10 mmol l⁻¹ PBS pH 7.5 with 0.01% Tween 20).

3.2. Indirect competitive magneto-ELISA procedure and matrix effect study

The efficiency of the coupling BSA-FA to tosyl-magnetic beads was evaluated by the Bradford test (Bradford, 1976). This assay showed a successful binding (60%) of the conjugated protein according to the efficiency binding showed in tosyl-magnetic beads instructions.

From the two-dimensional experiments, the following parameters have been chosen to be assayed in indirect competitive assays: 100 μ l of tosyl-modified magnetic beads (0.050 mg ml⁻¹) and 50 μ l of specific antibody (diluted 1/32,000).

General procedures in order to overcome interferences by sample matrix are dilution of the sample to a range which does not affect the assay or the use of a sample extract in the preparation of the standard curve, although in food matrix sample clean-up may sometimes be necessary (Chu, 2003). After the optimization of the reagent quantities, the indirect competitive assays were performed by varying the amount of folic acid, in PBST_C buffer as well as in skimmed-milk diluted ten times. As shown in Fig. 2A, the signal decreased when the competition step is performed in milk (diluted ten times) compared when is performed in PBST_C buffer. This matrix effect could not be avoided with different treatments, such as dilution of the sample up to 100 times, milk centrifugation at 35 °C, and protein precipitation with McIlvaine buffer (results shown in Supplementary Material).

However, as shown in Fig. 2B, the matrix effect can be easily overcome by performing the standard curve for the competitive assay in a milk-reference solution instead of in PBST_C buffer, avoiding the need of sample clean-up. This milk-reference solution was prepared by mixing three different skimmed milk and diluting them 1/10 in PBST_C. Standard curves were prepared with this milk-reference solution, and spiked with increasing concentration of standard folic acid (from 2.3 to 10,000 nmol l⁻¹). In order to overcome the decrease in the absorbance values, the BSA-FA modified magnetic beads, as well as the specific antibody were increased to 0.075 mg ml⁻¹ and 1/16,000, respectively. Fig. 2B shows the comparative results when the assay was performed in a milk-reference solution, comparing the signal with three different commercial

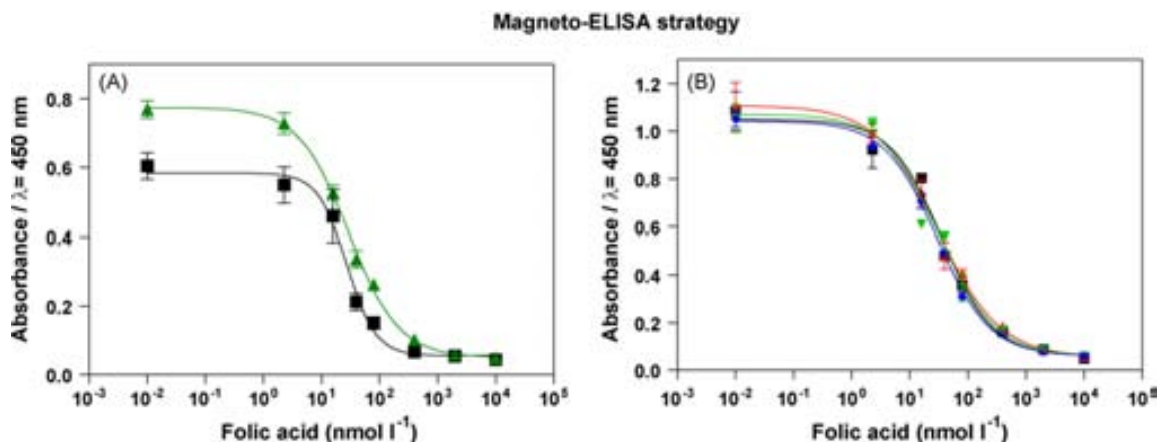


Fig. 2. Indirect competitive immunoassay for the determination of folic acid performed with the magneto-ELISA procedure. (A) Results obtained in (▲, green curve) PBST_c buffer and in (■, black curve) milk-reference solution. (B) Results obtained in (▲, red curve; ▼, green curve; ◆, blue curve) three different commercial skimmed milks diluted 1/10 with PBST_c buffer. Experimental conditions: 0.050 mg ml⁻¹ BSA-FA modified-MB and 1/32,000 Ab (A); 0.075 mg ml⁻¹ BSA-FA modified-MB and 1/16,000 Ab (B). In both cases, 1,6000 AntilgG-HRP was used. The error bars show the standard deviation for $n=3$. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

milks. Although the matrix effect could not be eliminated, it was completely overcome, because a perfect match was achieved, obtaining an IC₅₀ of 35.2 nmol l⁻¹ with CV for IC₅₀ concentration of 3% for milk-reference solution. Further experiments were performed in the milk-reference solution.

3.3. Immunoassay with electrochemical magneto sensors

From the two-dimensional experiments, the following parameters have been chosen to be assayed in further experiments: 100 μl of BSA-FA modified magnetic beads (0.2 mg ml⁻¹) and 50 μl of specific antibody (diluted 1/32,000). In order to overcome the decrease in the electrochemical response when the assay is performed in milk-reference solution, the BSA-FA modified magnetic beads, as well as the specific antibody were adjusted to 0.1 mg ml⁻¹ and 1/16,000, respectively.

Fig. 3 compares the competitive curves obtained with the magneto-ELISA strategy (Fig. 3A) vs. the immunoassay with electrochemical magneto sensors (Fig. 3B) performed in the milk-reference solution. Excellent results, as detailed shown in Table 1, where obtained for the detection of folic acid in milk-reference solution with the electrochemical (IC₅₀ of 46.6 nmol l⁻¹, CV for IC₅₀

concentration of 2%, and LOD of 13.1 nmol l⁻¹) as well as optical (IC₅₀ of 36.3 nmol l⁻¹, CV for IC₅₀ concentration of 3%, and LOD of 4.2 nmol l⁻¹) detection. Table 1 also shows comparatively the values and other parameters extracted from the four-parameter equation for the different strategies (ELISA, magneto-ELISA and electrochemical immunoassay) performed in PBST_c and in milk-reference solution. LOD for this assay can not be considered an issue, because the linear range obtained in the electrochemical strategy (21.1–129.3 nmol l⁻¹) is enough to allow by far the detection of folic acid in fortified milk samples with a concentration of folic acid of around 680 nmol l⁻¹ (300 μg l⁻¹). These results are similar to those previously reported with SPR detection using the Biacore commercial kit (Indyk et al., 2000).

3.4. Accuracy studies and folic acid determination in fortified-milk

Spiked samples simulating fortified-milk were tested using both the immunoassay with electrochemical magneto sensors strategy as well as the magneto-ELISA procedure, and using as a standard curve that obtained with milk-reference solution. Table 2 shows the recovery values. Although the best recovery was obtained for those

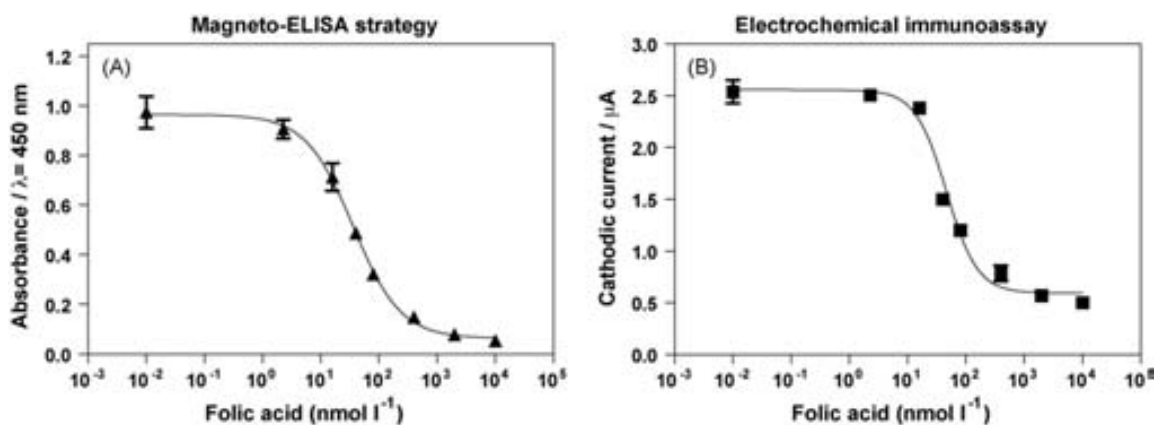


Fig. 3. Comparative results of the indirect competitive immunoassays for the determination of folic acid in milk using the magneto-ELISA strategy (▲) and the electrochemical immunoassay strategy (■). Both strategies are performed in milk-reference solution. Experimental conditions: 0.075 mg ml⁻¹ BSA-FA modified-MB and 1/16,000 Ab (A); 0.1 mg ml⁻¹ BSA-FA modified-MB and 1/16,000 Ab. E applied = -0.15 V (vs. Ag/AgCl) (B). In both cases 1/6000 AntilgG-HRP was used. The error bars show the standard deviation for $n=3$.

Table 1
Comparative results obtained with the ELISA, the magneto-ELISA and the electrochemical immunoassay performed in PBSTc and milk-reference solution.

	IC50 (nmol l ⁻¹)	Max signal	Min signal	Linear range (nmol l ⁻¹)	Slope	LOD (nmol l ⁻¹)
PBSTc buffer						
ELISA	47.2	0.88 a.u.	0.06 a.u.	10.9–185.0	-0.99	4.5
Magneto-ELISA	30.1	0.77 a.u.	0.05 a.u.	7.7–120.4	-1.00	3.5
Electrochemical immunoassay	93.1	2.39 μA	0.63 μA	18.1–323.9	-1.00	6.0
Milk-reference solution						
Magneto-ELISA	36.3	0.96 a.u.	0.06 a.u.	9.5–138.8	-1.06	4.2
Electrochemical immunoassay	46.6	2.56 μA	0.59 μA	21.1–129.3	-1.63	13.1

Table 2
Accuracy studies for the magneto-ELISA and the electrochemical immunoassay in spiked samples. The recovery calculation showed in the table was taken from each standard curve obtained with milk-reference solution, respectively.

Spiked skimmed milk sample, diluted 1/10 with PBSTc buffer		
Real concentration (nmol l ⁻¹)	Found concentration (nmol l ⁻¹)	Recovery (%)
Magneto-ELISA		
160	164	103
250	221	88
500	501	100
1250	1103	88
2500	1497	60
Electrochemical immunoassay		
200	224	112
500	475	95
1200	1009	81
2500	1810	72

values around 500 nmol l⁻¹ (corresponding with 220.5 μg l⁻¹) in both methodologies, good results were obtained in all the tested concentration range, although for higher concentration of folic acid, an underestimation is clearly observed.

Further experiments were performed in real commercial fortified milk. Two different brands of fortified skimmed milk containing 300 μg l⁻¹ of folic acid content as labelled values were analyzed. Milk samples were diluted in milk-reference solution. Very similar (or hardly higher) to the labelled content folic acid were found. For fortified-milk No. 1 and No. 2, 333 and 511 μg l⁻¹ were found with the magneto-ELISA strategy, respectively, while 321 and 380 μg l⁻¹ with the electrochemical strategy. It should be pointed out that manufacturers would often add higher amount of folic acid to ensure that the product did not provide less than the labelled value due to the losses in the thermal processing of the milk.

4. Conclusion

An immunoassay with electrochemical detection based on magneto sensors for folic acid in fortified-milk has been developed. Covalent coupling of BSA-folic acid conjugate was successfully performed on tosyl-modified magnetic beads, achieving an excellent coupling efficiency. The performance of the electrochemical immunoassay 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 indirect competitive electrochemical immunoassay strategy can easily reach LODs of 13.1 nmol l⁻¹ (5.8 μg l⁻¹) and IC50 of 46.6 nmol l⁻¹ (20.6 μg l⁻¹) with CV for IC50 concentration of 2% in skimmed-milk. As a consequence, this method can easily reach the folic acid values in fortified-food. In the case of fortified-milk the folic acid content is usually near 300 μg l⁻¹.

Because of the simplicity of the immunochemical procedure presented here this strategy can be suitable for relatively fast semiquantitative and quantitative on-site analysis of folic acid in fortified milk. The sensitivity conferred by the m-GEC electrode in connection with the use of magnetic beads and enzymatic labeling result in a rapid, cheap, robust and environmentally friendly device.

Future work will be focused on the possible application of such method to screen printed electrodes and also for fortified food based products, allowing the development of disposable electrodes for in-field, low cost and user-friendly detection.

Acknowledgments

Financial support from Ministry of Education and Science (MEC), Madrid (Project BIO2007-63300), is acknowledged. M.I.P., S.F. and S.H. also acknowledge the financial support from the Universidad Nacional del Litoral (Argentina), Funcación Carolina and Agencia Española de Cooperación Internacional (Project A/6488/06 and A/7927/07) which made possible this collaborative work.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bios.2008.10.020.

References

- Alegret, S., 2003. Comprehensive Analytical Chemistry, vol. 39. Elsevier, Amsterdam, pp. 1–36; Chapter 1.
- Bates, C.J., 2003. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. Academic Press, Oxford, pp. 2559–2564.
- Bradford, M.M., 1976. Analytical Biochemistry 72 (1–2), 248–254.
- Caselunghe, M.C.B., Lindeberg, J., 2000. Food Chemistry 70 (4), 523–532.
- Centi, S., Laschi, S., Fránek, M., Mascini, M., 2005. Analytica Chimica Acta 538 (1–2), 205–212.
- Chu, F.S., 2003. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. Academic Press, Oxford, pp. 3248–3255.
- Das Sarma, J., Duttgupta, C., Ali, E., Dhar, T.K., 1995. Journal of Immunological Methods 184 (1), 1–6.
- EEC Council Directive, 90/496 (1990) on nutrition labeling for foodstuffs.
- Erdem, A., Pividori, M.I., Lermo, A., Bonanni, A., Valle, M.d., Alegret, S., 2006. Sensors and Actuators B: Chemical 114 (2), 591–598.
- FDA Fact Sheet, February 29, 1996. Folic acid fortification. Office of Public Affairs.
- Gao, Y., Guo, F., Gokavi, S., Chow, A., Sheng, Q., Guo, M., 2008. Food Chemistry 110 (3), 769–776.
- Hoegger, D., Morier, P., Vollet, C., Heini, D., Reymond, F., Rossier, J.S., 2007. Analytical and Bioanalytical Chemistry 387 (1), 267–275.
- Honein, M.A., Paulozzi, L.J., Mathews, T.J., Erickson, J.D., Wong, L.-Y.C., 2001. The Journal of the American Medical Association 285 (23), 2981–2986.
- Indyk, H.E., Evans, E.A., Caselunghe, M.C.B., Persson, B.S., Finglas, P.M., Woolard, D.C., Filonzi, E.L., 2000. Journal of AOAC International 83 (5), 1141–1148.
- Kelly, P., McPartlin, J., Goggins, M., Weir, D.G., Scott, J.M., 1997. The American Journal of Clinical Nutrition 65 (6), 1790–1795.
- Lermo, A., Campoy, S., Barbé, J., Hernández, S., Alegret, S., Pividori, M.I., 2007. Biosensors and Bioelectronics 22 (9–10), 2010–2017.
- Lermo, A., Zacco, E., Barak, J., Delwiche, M., Campoy, S., Barbé, J., Alegret, S., Pividori, M.I., 2008. Biosensors and Bioelectronics 23 (12), 1805–1811.
- Marshall, R.J., 2003. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. Academic Press, Oxford, pp. 3963–3968.

- Palecek, E., Kizek, R., Havran, L., Billova, S., Fojta, M., 2002. *Analytica Chimica Acta* 469 (1), 73–83.
- Perez Prieto, S., Cancho Grande, B., Garcia Falcon, S., Simal Gandara, J., 2006. *Food Control* 17 (11), 900–904.
- Pividori, M.I., Alegret, S., 2005. *Analytical Letters* 38 (15), 2541–2565.
- Pividori, M.I., Lermo, A., Campoy, S., Barbé, J., Alegret, S., 2007. *Comprehensive Analytical Chemistry*, vol. 49. Elsevier, Amsterdam, pp. e221–e226.
- Quinlivan, E.P., Hanson, A.D., Gregory, J.F., 2006. *Analytical Biochemistry* 348 (2), 163–184.
- Reichert, N., Rubach, K., 1991. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 87 (11), 341–345.
- Schneider, P., Hammock, B.D., 1992. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40 (3), 525–530.
- Slatter, J., 2003. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Academic Press, Oxford, pp. 3023–3028.
- Sweeney, M.R., McPartlin, J., Weir, D.G., Scott, J.M., 2003. *Journal of Chromatography B* 788 (1), 187–191.
- Zacco, E., Pividori, M.I., Alegret, S., Galve, R., Marco, M.-P., 2006. *Analytical Chemistry* 78 (6), 1780–1788.
- Zacco, E., Adrian, J., Galve, R., Marco, M.-P., Alegret, S., Pividori, M.I., 2007. *Biosensors and Bioelectronics* 22 (9–10), 2184–2191.

IMMUNOASSAY FOR FOLIC ACID DETECTION IN VITAMIN-FORTIFIED MILK BASED ON ELECTROCHEMICAL MAGNETO SENSORS

Supplementary Material

A. Lermo¹, S. Fabiano³, S. Hernández³, R. Galve², M.-P. Marco², S. Alegret¹ and M.I. Pividori^{1*}

¹Grup de Sensors i Biosensors, Departament de Química, Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra, Catalonia, Spain.

²Applied Molecular Receptors Group (AMRg), IQAC-CSIC, 08034, Barcelona, Catalonia, Spain.

³Laboratorio de Sensores y Biosensores, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, 3000, Santa Fe, Argentina.

*Corresponding author. E-mail address: Isabel.Pividori@uab.es. Tel: +34 93 581 4937, Fax: +34 93 581 2379.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of the protein conjugates for folic acid (BSA-FA and FA-HRP)

FA (0.5 μmol for BSA-FA or 10 μmol for FA-HRP) was reacted with N-hydroxysuccinimide (25 μmol) and dicyclohexylcarbodiimide (50 μmol) in 200 μl of anhydrous dimethylformamide, under stirring at room temperature for 2 h. The solid residue of urea was separated by centrifugation (14000 rpm). The supernatant was then slowly added to a solution of BSA (10mg) or HRP (2mg) both dissolved in 1.8 ml of borate buffer (0.2mol l⁻¹ borate-boric, pH 8.7) and stirred for 4 h at room temperature.

The conjugates were purified by dialysis against phosphate buffer (0.1 mol l⁻¹ pH 7.5, 5 l, 4 times) and MilliQ water (5 l, once) at 4 °C. Then the conjugates were lyophilized and stored freeze-dried at -40 °C. Working aliquots were prepared at 1 mg ml⁻¹ in PBS and stored at 4 °C.

BSA-FA binding to the magnetic beads

The synthesized BSA-FA conjugate was covalently coupled to the tosyl-activated magnetic beads. For this purpose, 350 μl (30 mg ml^{-1}) of tosyl-modified magnetic beads were washed twice with 1 ml of borate buffer 0.1 mol l^{-1} pH 8.5. The magnetic beads were resuspended in 875 μl of borate buffer and 210 μl (1 mg ml^{-1}) of the BSA-FA conjugate was then added. The beads were incubated for 24 hours at room temperature with slow tilt rotation. The modified beads were submitted to several washing steps with slow tilt rotation in order to eliminate unbound BSA-FA conjugate as well as to block non-reacted tosyl functionalities, i) with 1 ml of PBS, 0.1 % (w/v) BSA for 5 minutes at 4° C, twice, ii) with 1 ml of Tris 0.2 mol l^{-1} , pH 8.5, 0.1 % (w/v) BSA solution, for 24 hours at room temperature and iii) with, 1 ml of PBS, 0.1 % (w/v) BSA for 5 minutes at 4° C. Finally, the magnetic beads were resuspended in PBS, 0.1 % (w/v) BSA, 0.02 % (w/v) sodium azide to reach a 12 mg ml^{-1} stock solution and stored at 4° C.

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 the BSA-FA conjugate.

Indirect competitive ELISA

The assay comprises the follow steps (all the referred quantities are 'the amounts added per well'). 100 μl of BSA-FA (0.035 $\mu\text{g ml}^{-1}$ in coating buffer) were added and incubated overnight at 4 °C. Each well was then washed with 300 μl of PBST four times. After that, 50 μl of folic acid standard solutions (from 0.005 to 10000 nmol l^{-1}) were added, followed by the addition of 50 μl of specific antibody (diluted 1/64000). After 30 min of incubation at 25°C, the plate was washed again. 100 μl of the secondary antibody AntiIgG-HRP (1/6000 in PBST) were added and incubated for 30 min at 25°C. The plate was then washed again and 100 μl of substrate solution (0.004 % v/v H_2O_2 and 0.01 % w/v TMB –3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine– in citrate buffer) were added. The enzymatic reaction was stopped after 30 min at 25°C with 50 μl of 2 mol l^{-1} H_2SO_4 and the absorbance was

measured at 450 nm. The standard curve was fitted to a four-parameter logistic equation according to the formula $y = \frac{(A-B)}{1+10^{\exp((\log C - \log X) \times D)}} + B$, where A is the maximal absorbance, B is the minimum absorbance, C is the concentration producing 50 % of the maximal absorbance, X is the folic acid concentration and D is the slope at the inflection point of the sigmoid curve. LOD values were obtained as 90 % of A value.

Immunoassay optimization

A set of experimental parameters (pre-incubation time, incubation time, detergent concentration, ionic strength and pH) were studied. The experiments were performed using the indirect competitive protocol described above for the 'Indirect competitive ELISA'. On the same plate, each experiment was varied on just the studied parameter during the competitive step. The conditions of each parameter are described below.

Pre-incubation step. The folic acid and the specific antibody were pre-incubated prior to the competition step for 0, 15, 30, 60, 120 min and 20 h. After that, 100 μ l of the mixture were added to the coated plate and processed as already described.

Incubation step. The competition step was performed for 10, 20, 30, 40, 50 and 60 min. Then the plates were processed as previously described.

Effect of the detergent concentration. PBST solutions containing different concentration of Tween 20 (0.005, 0.01, 0.025, 0.05 and 0.1 %) were used to prepare the folic acid standard solutions as well as the specific antibody (immunoreactives of the competitive step).

Effect of the ionic strength. Different PBST solutions (2, 5, 10, 20 and 50 mmol l^{-1} in PBS and 0.05 % Tween 20) were used to prepare the immunoreactives in the competitive step.

Effect of the pH. PBST solutions ranging from pH 4.5 to 9.5 were also studied for the competitive step.

Indirect competitive magneto-ELISA procedure

The assay was performed in microtiter plates with round-bottomed wells. After each incubation or washing step, the magnetic beads were separated from the supernatant on the side wall by using a 96-well magnet plate separation rack, positioned 2 min under the microtiter plate. All the referred quantities are 'the amounts added per well'.

100 μl of BSA-FA modified magnetic beads (0.050 mg ml^{-1}) were added and separated from the supernatant by applying a magnetic field. After that, 50 μl of folic acid standard solutions in PBST_C (from 2.3 to 10000 nmol l^{-1}) were added, followed by the addition of 50 μl of specific antibody (diluted 1/32000 in PBST_C). The competitive immunological reaction was allowed to proceed with vigorous shaking for 30 min at room temperature. The magnetic beads were then washed with 100 μl of PBST three times. 100 μl of the secondary antibody AntiIgG-HRP (diluted 1/6000 in PBST) was added and incubated for 30 min at room temperature. The magnetic beads were washed three times with 100 μl of PBST. After that, 100 μl of substrate solution (0.004 % v/v H_2O_2 and 0.01 % w/v TMB –3, 3', 5, 5'tetramethylbenzidine– in citrate buffer) were added and the plate was incubated again for 30 min at room temperature. The enzymatic reaction was stopped by adding 50 μl of H_2SO_4 2 mol l^{-1} . The final solution in each well was separated from the magnetic beads and added to a different plate with flat-bottomed wells for the absorbance measurements at 450 nm. The standard curve was fitted to a four-parameter logistic equation according to the formula $y = \frac{(A-B)}{[1+10\exp((\log C-\log X) \times D)]} + B$, where A is the maximal absorbance, B is the minimum absorbance, C is the concentration producing 50 % of the maximal absorbance, X is the folic acid concentration and D is the slope at the inflection point of the sigmoid curve. LOD values were obtained as 90 % of A value.

Matrix effect

Skimmed milk samples were submitted to different treatments (dilution of the sample, milk centrifugation and protein precipitation with McIlvaine buffer) in order to overcome matrix effect. Then the pretreated samples were evaluated using the indirect competitive protocol described in

'Indirect competitive ELISA'. The conditions of each treatment are described as follow:

Dilution of the sample. The milk sample was diluted (1/10, 1/25, 1/50, 1/100) with PBSTc. Folic acid standard solutions were prepared with these milk solutions as well as with non-diluted milk and PBSTc. The specific antibody was diluted in PBSTc.

Milk centrifugation at 35 °C. The milk sample was centrifuged at 35 °C for 30 min at 4000 rpm. The supernatant was then separated and the resulting solution (Milk C) was diluted 1/10, 1/25, 1/50 1/100 with milliQ water. These solutions were used to prepare folic acid standard solutions. The specific antibody was diluted with 2 X PBSTc in order to obtain PBSTc after mixing the reagents, in the competitive step.

Protein precipitation with McIlvaine buffer. The protein precipitation was performed by mixing equal parts of skimmed milk and McIlvaine buffer. Then the solution was stirred for 1 min and then centrifuged at room temperature for 15 min at 4000 rpm. The supernatant was removed and pH was adjusted to 7.5 with hydroxide solution. The resulting solution (Milk serum) was diluted 1/10, 1/20 and 1/50 with milliQ water pretreated as milk sample (MilliQ T). These solutions were used to prepare folic acid standard solutions. The specific antibody was diluted in PBSTc with 0.02 % of Tween 20 in order to obtain PBSTc after mixing the reagents in the competitive step.

RESULTS AND DISCUSSION

Immunoassay optimization

The effect of the incubation time as well as the composition of the buffer solution for the competitive step was optimized. Figure ii shows the values of A_{max}/IC_{50} ratio obtained varying each parameter in the indirect competitive ELISA. Figure ii (A) show the effect in the assay of pre-incubating folic acid with the specific antibody prior to the competition step. As can be seen, no significant differences were observed performing a pre-incubation step for 15, 30, 60, 120 min. Similar results were obtained for a pre-incubation step of the immunoreagents for 20 h ($Abs_{max}/IC_{50}= 0.009$).

Therefore, a pre-incubation step was considered no necessary for further experiments. On the other hand, the competitive step was also studied. In a competitive ELISA the time given to the immunoreagents to interact may have a direct effect on the sensitivity of the assay. As shown in Figure ii (B) the greater Absmax/IC50 ratio was obtained for 30 min of incubation time.

In order to evaluate the effects in the immunoreaction related with the concentration of the surfactant, the competitive step was performed by varying this parameter. Figure ii (C) shows this dependence against the detergent concentration. The value of Absmax/IC50 ratio was higher when decreasing the Tween 20 concentration up to 0.01%, while the signal also decreased with higher concentrations of detergent used (0.025% to 0.1%).

There is a clear dependence of the assay with the ionic strength and the pH of PBST buffer used in the competition step. As can be seen in Figure ii (D and E) the best results were obtained under the standard conditions using a concentration of 10 mmol l^{-1} of PBST with pH 7.5.

Therefore, the detergent concentration has been the parameter with stronger effect in the competitive step for indirect competitive ELISA. As a conclusion, the best Absmax/IC50 ratio value related with increased limit of detection for the assay was obtained performing the competitive step for 30 min without any previous pre-incubation using PBSTc (10 mmol l^{-1} PBS with 0.01% Tween 20 pH 7.5).

Matrix effect

Different treatments have been investigated in order to avoid matrix effect. In Figure iii is shown the standard curves obtained with the sample dilution (A), centrifugation (B) and protein precipitation using McIlvaine buffer (C). As can be seen in Figure iii (A) the absorbance and IC50 decrease when the assay is performed in milk. The matrix effect can not be avoided diluting the sample up to 100 times. In the case of milk precipitation procedure similar effect is observed, Figure iii (B). The matrix effect was not overcome with precipitation using McIlvaine buffer and further dilution of the serum, as shown in Figure iii (C). The accuracy of McIlvaine buffer pretreatment was evaluated by spiking $300 \mu\text{g l}^{-1}$ of folic acid in skimmed milk. This methodology showed poor recovery values for

folic acid (of around 5%). These results suggested the elimination of folic acid with the McIlvaine pretreatment. For these reason, this methodology was not used for folic acid detection in milk samples. As a conclusion, and taking into account the good results obtained when performing the standard curve in milk reference solution (as shown in Figure 2, B) no sample pretreatment was performed.

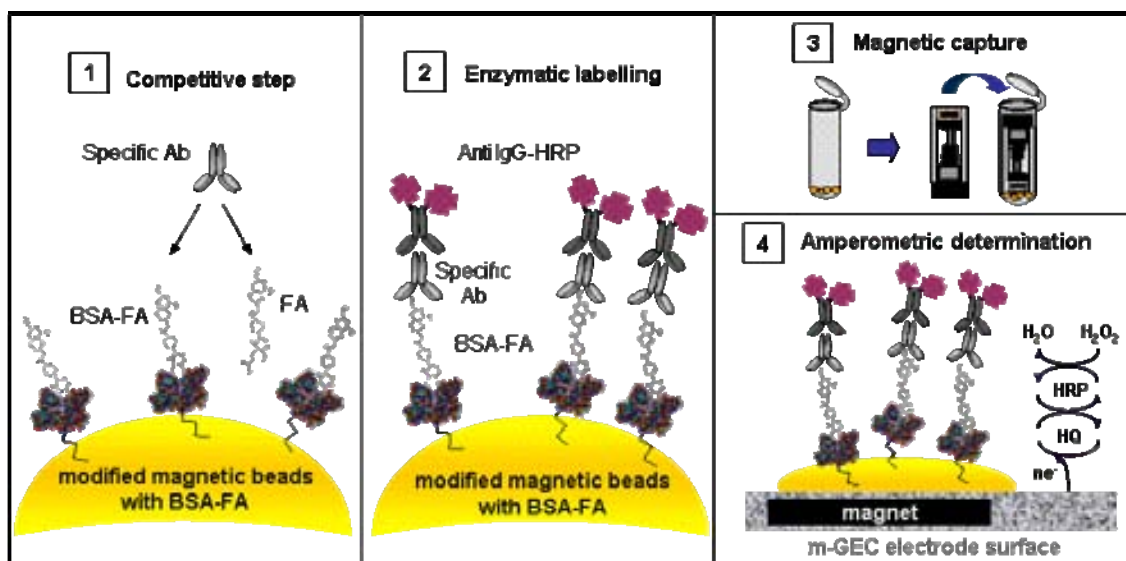


Figure i. Schematic representation of the electrochemical strategy for folic acid detection. Competitive step between FA in the sample and the immobilized BSA-FA for the specific antibody (1), enzymatic labelling with a secondary antibody conjugated with HRP as enzyme label (AntiIgG-HRP) (2), magnetic capture of the modified magnetic beads by the magneto sensor (3), amperometric determination (4).

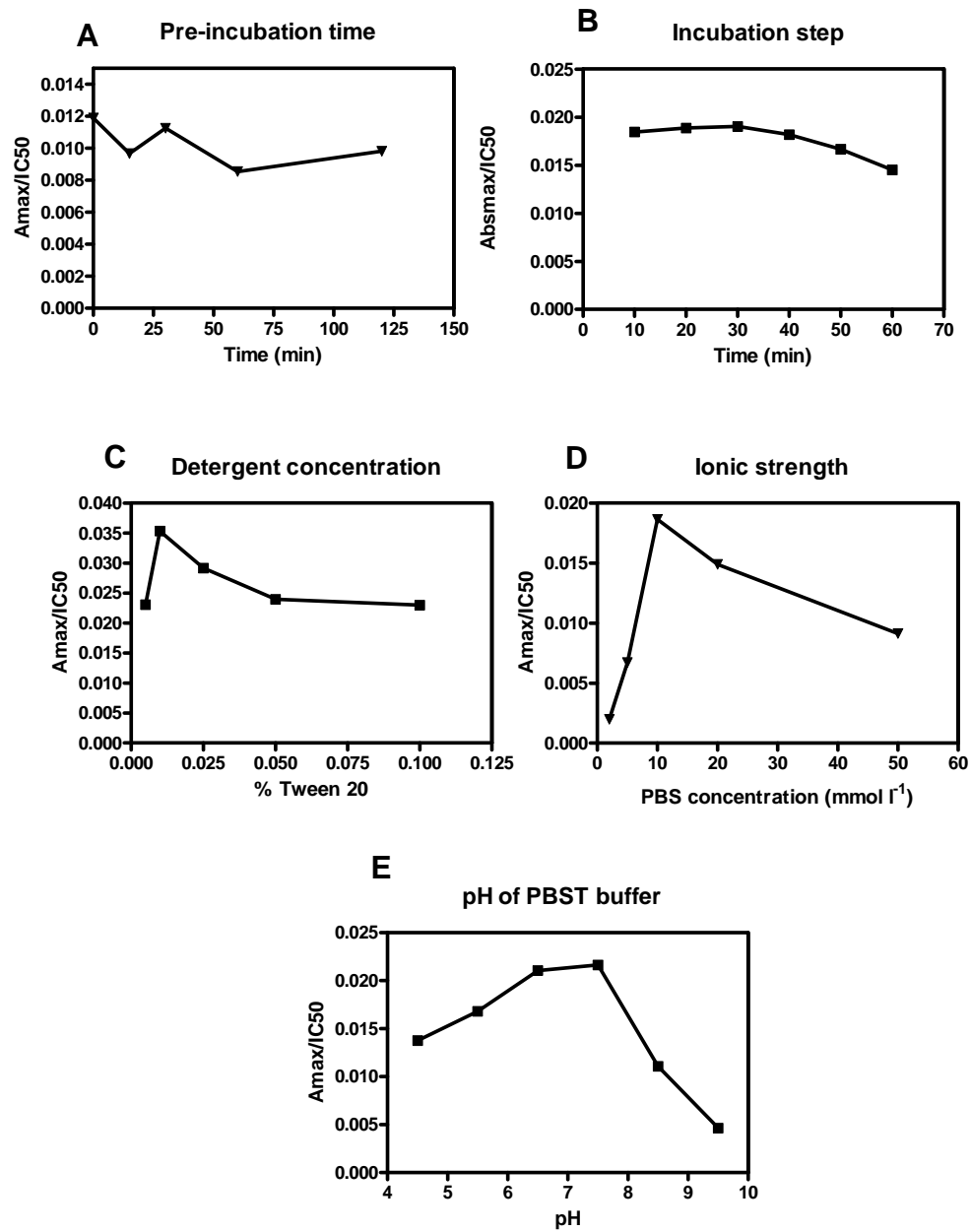


Figure ii. Optimization of the experimental parameters for the indirect competitive ELISA. Effect of the pre-incubation time (A), incubation time (B), detergent concentration (C), ionic strength (D) and pH of PBST buffer (E). IC50 values were extracted from the four-parameter logistic equation used to fit the standard curves.

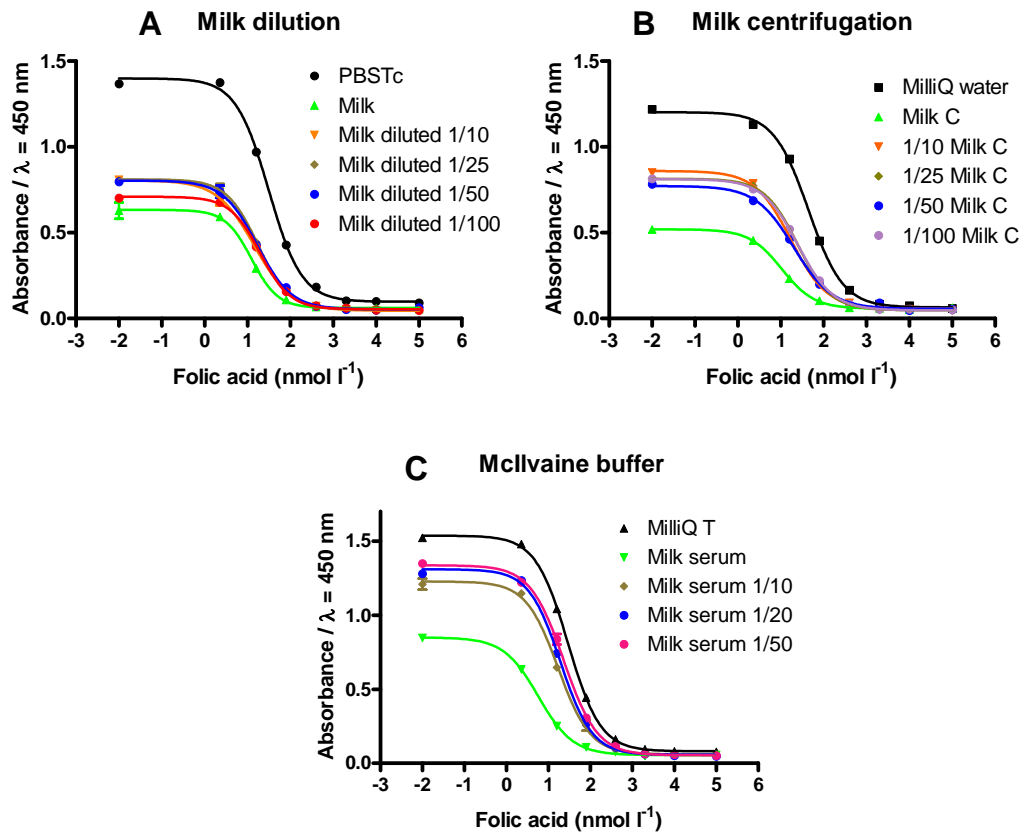


Figure iii. Milk treatment study for overcoming matrix effect: dilution of the sample (A), milk centrifugation (B), protein precipitation with Mcllvaine buffer (C). Each point of the curves was obtained using the optimized indirect competitive ELISA.

