

ESTUDIO DE SUPERFICIES DE BIORRECONOCIMIENTO DE OCRATOXINA A EN EL DESARROLLO DE UNA PLATAFORMA MULTISENSORA ELECTROQUIMICA PARA MICOTOXINAS

MASTER EN INVESTIGACIÓN QUÍMICA

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA, UNIVERSIDAD DE
ZARAGOZA**



**Universidad
Zaragoza**



CARLOTA CUBEL SÁNCHEZ

TRABAJO FIN DE MASTER

JULIO 2013



Dr. Juan Ramón Castillo Suárez, Catedrático de Química Analítica de la Universidad de Zaragoza y Dra. Laura Bonel Sanmartín, investigadora del Grupo de Espectroscopía Analítica y Sensores de la Universidad de Zaragoza.

CERTIFICAN:

Que la memoria titulada “**Estudio de superficies de biorreconocimiento de ocratoxina A en el desarrollo de una plataforma multisensora electroquímica para micotoxinas**”, presentada por **Dña. Carlota Cubel Sánchez**, para superar el Máster de Investigación Química, ha sido realizada en el Grupo de Espectroscopía Analítica y Sensores (GEAS) del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza bajo su dirección.

Zaragoza, 21 de junio de 2013

Fdo. Juan Ramón castillo Suárez

Fdo. Laura Bonel Sanmartín

ÍNDICE

ABREVIATURAS

RESUMEN

Capítulo 1: INTRODUCCIÓN

1.1. MICOTOXINAS Y SU IMPORTANCIA

- 1.1.1. Ocratoxina A
- 1.1.2. Toxicidad
- 1.1.3. Legislación

1.2. METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE OCRATOXINA A

- 1.2.1. Métodos cromatográficos para la determinación de ocratoxina A
- 1.2.2. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)
- 1.2.3. Biosensores y Aptasensores

1.3. USO DE PARTÍCULAS MAGNÉTICAS EN BIOSENSORES

Capítulo 2: OBJETIVOS

Capítulo 3: EXPERIMENTAL

3.1. ESTUDIO DE LA REACCIÓN DE AFINIDAD ENTRE LA OCRATOXINA A Y APTÁMERO SOBRE PARTÍCULAS MAGNÉTICAS: ESQUEMA DIRECTO E INDIRECTO

- 3.1.1. Materiales e Instrumentación
- 3.1.2. Reactivos y tampones
- 3.1.3. Procedimiento experimental
 - 3.1.3.1. Esquema directo
 - 3.1.3.2. Esquema indirecto
- 3.1.4. Resultados y discusión

3.2. ESTUDIO DE LA REACCIÓN DE AFINIDAD ENTRE OCRATOXINA A-BSA Y APTÁMERO BIOTINILADO POR RESONANCIA DE PLASMÓN SUPERFICIAL (SPR)

- 3.2.1. Materiales e Instrumentación
- 3.2.2. Reactivos y tampones
- 3.2.3. Procedimiento experimental
- 3.2.4. Resultados y discusión

3.3. ESTUDIO DE LA REACCIÓN DE AFINIDAD ENTRE LA OCRATOXINA A Y UN ANTICUERPO MONOCLONAL SOBRE PARTÍCULAS MAGNÉTICAS: ESQUEMA DIRECTO

3.3.1. Materiales e Instrumentación

3.3.2. Reactivos y tampones

3.3.3. Procedimiento experimental

3.3.4. Resultados y discusión

Capítulo 4: CONCLUSIONES

ANEXOS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREVIATURAS

AptOTA: Aptámero específico de ocratoxina A

AptOTA-bi: Aptámero específico de ocratoxina A biotinilado

AuNPs: Nanopartículas de oro

BSA: Albúmina Sérica bovina

DON: Deoxinivalenol

ELISA: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

eaMBs: Micropartículas magnéticas funcionalizadas con estreptavidina

EDC: 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

FAO: Food and Agriculture Organization

FB: Fumonisin

HPLC-FLD: Cromatografía líquida de alta resolución con detección fluorescente

HPLC-MS: Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas

HRP: Peroxidasa de rábano picante

IARC: Agencia Internacional para la investigación sobre el Cáncer

LOD: Límite de detección

mAbOTA : Anticuerpo monoclonal específico para OTA

MBS: Partículas magnéticas

MBS-prG: Partículas magnéticas funcionalizadas con proteína G

NHS: N-hidroxisuccinimida

OTA: Ocratoxina A

OTA-BSA: Conjugado ocratoxina A con la albúmina sérica bovina

OTA-HRP: Conjugado ocratoxina A con la peroxidasa

OTB: Ocratoxina B

OTC: Ocratoxina C

pAbOTA: Anticuerpo policlonal de OTA

PBS: Tampón fosfato salino

PBS: Tampón fosfato salino con Tween 20

SELEX: *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*

SPR: Resonancia de Plasmón Superficial

TLC: Cromatografía líquida en capa fina

TMB: 3,3',5, 5'- tetrametilbencidina

RESUMEN

La **ocratoxina A (OTA)** es una micotoxina producida por ciertas especies de hongos *Aspergillus* o *Penicillium* en una serie de alimentos y presenta actividad nefrotóxica, teratogénica, carcinogénica e inmunotóxica que afecta tanto a animales como a humanos. Se encuentra presente en numerosos tipos de alimentos como vino, mosto, frutos secos, cerveza, trigo, etc. Las principales vías de incorporación son a través de la ingestión, inhalación y absorción a través de la piel. Debido a estos efectos toxicológicos, la legislación internacional en referencia a la OTA es extremadamente restrictiva y cada vez más exigente. Los contenidos máximos permitidos de OTA en diferentes alimentos y piensos están en los niveles de ng g^{-1} . Se va a llevar a cabo el estudio de diferentes elementos de biorreconocimiento mediante la técnica espectrofotométrica ELISA. Los estudios que se llevan a cabo son mediante dos esquemas de trabajo diferente, esquema competitivo directo donde el elemento de biorreconocimiento es inmovilizado sobre la superficie de las partículas magnéticas o mediante un esquema competitivo indirecto en el cual es el analito objeto de estudio es el que se une a las partículas magnéticas. Las partículas mejoran considerablemente el rendimiento de la reacción inmunológica debido a una rápida cinética de inmunoensayo ya que las partículas se encuentran en suspensión, facilitando además los protocolos de lavado y separación. Durante el ensayo se llevan a cabo etapas de lavado y separación con la ayuda de un separador magnético evitándose adsorciones inespecíficas o interferencias de matriz sobre la superficie de la placa ELISA, posteriormente se lleva a cabo la etapa de competición entre la OTA y la OTA marcada con la enzima peroxidasa (HRP), ésta última compite con la primera por los sitios de unión libres del elemento de biorreconocimiento. La reacción enzimática se lleva a cabo mediante el uso de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) en un tiempo de 20 minutos y una posterior medida de absorbancia a una longitud de onda de 450 nm. Complementariamente a estos ensayos se recurre a otras técnicas espectroscópicas (SPR, fluorescencia y absorción UV-Vis) que nos permitan estudiar tanto el grado de inmovilización sobre las partículas magnéticas como las posibles reacciones de afinidad entre el elemento de biorreconocimiento y el analito.

Capítulo 1: INTRODUCCIÓN

1.1 MICOTOXINAS

Las **micotoxinas** son productos naturales de bajo peso molecular (300-400 Daltons) creados como metabolitos secundarios producidos por los filamentos de hongos. Estos metabolitos constituyen un conjunto heterogéneo químico y tóxico pudiendo producir enfermedades en los seres humanos y en otros vertebrados ^[1].

Los cultivos son susceptibles a la contaminación por hongos por lo que las micotoxinas afectan a una amplia gama de productos agrícolas ya que son producidas en las plantas (trigo, maíz, arroz, frutos secos, uvas, etc) en el campo o durante su almacenamiento y procesado. La producción de las micotoxinas y su grado de contaminación depende de la cepa del hongo, el sustrato y las condiciones de temperatura y humedad. Son generalmente termoestables durante los procesos térmicos, persistiendo durante la transformación de la planta contaminada ^[2].

Se estima que el 25 % de los cultivos alimentarios mundiales, incluyendo los alimentos básicos se ven afectados por hongos productores de micotoxinas. Según las estimaciones de la FAO, las pérdidas mundiales de productos alimenticios debidas a las micotoxinas son del orden de 1000 millones de toneladas al año ^[3].

Por todo esto, por la presencia contaminante en una gran variedad de alimentos y por su elevada toxicidad en personas y animales, las micotoxinas están recibiendo en la actualidad una importancia cada vez mayor, pasando a formar parte de la cadena alimentaria. Los altos niveles de micotoxinas en la dieta pueden producir riesgos para la salud muy graves como genotoxicidad, efectos cancerígenos, inmunodepresión, daños en múltiples órganos como son hígado, riñón, sistema nervioso y endocrino entre otros. En general, el riesgo de intoxicación por micotoxinas en los seres humanos es bajo en comparación con el envenenamiento microbiológico o con la contaminación química pero debido a su toxicidad crónica y a la producción de cáncer se considera de alto riesgo ^[4].

El número de micotoxinas conocidas superan las 300, clasificándose en función del hongo que las origina pudiendo ser originadas a partir de una o más especies de hongos específicas ^[5]. Los tres géneros de hongos más importantes en la producción de micotoxinas son *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* dependiendo su producción de factores como la temperatura y la humedad.

Las micotoxinas más importantes son las aflatoxinas (AFs), ocratoxinas y tricotecenos (fumonisinas (FB), deoxivalenol (DON), T-2, HT-2, etc) variando su toxicidad en función del tipo de micotoxina.

1.1.1 Ocratoxina A

La **ocratoxina A (OTA)** fue descubierta en 1965 y es una micotoxina naturalmente fluorescente producida por hongos como *Aspergillus* o *Penicillium*. La OTA normalmente se produce durante el almacenamiento donde se dan las condiciones necesarias para el crecimiento del moho y la producción de esta micotoxina^[6]. Se encuentra en una gran variedad de alimentos como en los cereales (trigo, cebada, maíz, avena y centeno), también se encuentra en alimentos de origen tropical como es el café y cacao y en bebidas como el mosto, vino y cerveza^[7].

Se pueden encontrar hasta 5 tipos de ocratoxinas siendo la más tóxica la OTA seguida de la OTB y OTC, cuya estructura química consiste en una estructura cíclica 3,4-dihidro-3-metil-isocumarina unida a través del grupo 7-carboxi al grupo de la L-β-fenilalanina mediante un enlace amida^[8].

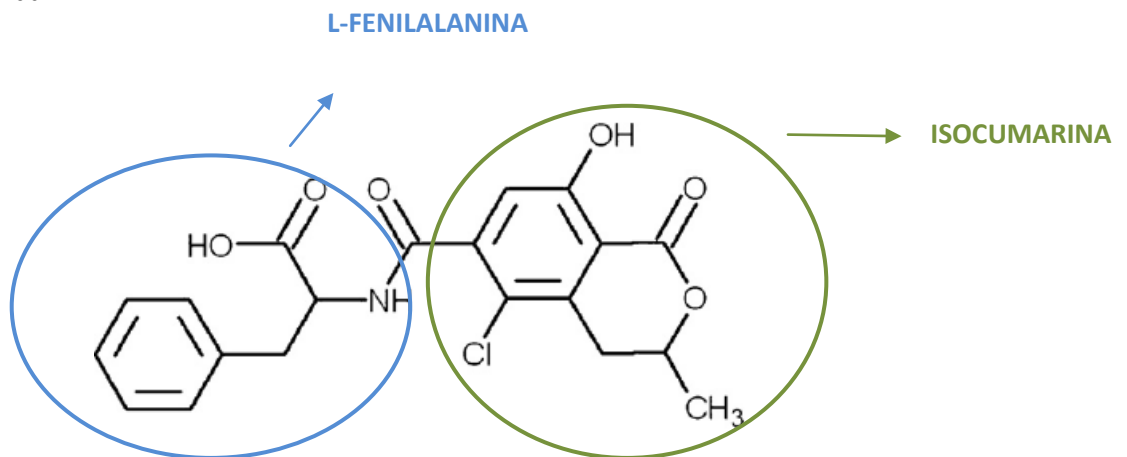


Figura 1. Estructura química de la OTA, en donde se unen el aminoácido L-Phe con el anillo de isocumarina a través de un enlace amida.

Su peso molecular es de 403,8 Dalton, y su fórmula molecular es de $C_{20}H_{18}ClNO_6$. La OTA pertenece a un grupo amplio de moléculas de la misma familia (A, B, C y ésteres de ocratoxina) que poseen diferente toxicidad siendo ocratoxina A la de máxima toxicidad.

1.1.2 Toxicidad

La toxicidad de la OTA es debida en su mayor parte al grupo funcional de la lactona insaturada (isocumarina)^[9]. Es altamente hidrofóbica y muy estable.

Como sucede con todas las micotoxinas, los efectos adversos que pueden tener sobre la salud humana son muy importantes.

La OTA se considera una molécula nefrotóxica y está clasificada por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) como posible agente carcinogénico para el hombre (grupo 2B), también presenta una alta afinidad por las proteínas plasmáticas, lo que explica su alta persistencia en el organismo. Se elimina por vía renal y hepatobiliar o por secreción láctea^[10].

Los principales órganos afectados por esta toxina son el riñón y el hígado, actúa como inmunosupresor y un potente teratógeno. Es capaz de alterar la fisiología celular de múltiples

maneras pero parece que los efectos primarios están asociados con las enzimas involucradas en el metabolismo de la fenilalanina, sobre todo mediante la inhibición de la enzima implicada en la síntesis del complejo fenilalanina-tRNA.

Se ha llegado a encontrar OTA en la leche materna, en sangre e incluso en carne de cerdo destinada al consumo humano ^[1]. Por todos estos problemas presentes debido a la presencia de la OTA, la Comisión de Regulación Europea recomendó que se redujeran los niveles de OTA por debajo de 5 ng kg⁻¹ de peso corporal por día.

1.1.3 Legislación

Debido a la importancia tan relevante en el control de los niveles de OTA en diversos tipos de alimentos, ha habido un creciente interés en los últimos años por establecer unos límites máximos permitidos cada vez más bajos en las diferentes muestras de alimentos. Este hecho tiene una gran relevancia analítica, ya que se precisa de métodos e instrumentación más precisa y con mayor sensibilidad para poder llevar a cabo dichas determinaciones. La legislación en los países desarrollados es cada vez más estricta y exigente en este sentido por ello la legislación española y europea ^[11] ha establecido límites máximos aceptables para la OTA en diferentes alimentos.

Durante los últimos años las concentraciones máximas permitidas de OTA en diversos productos alimentarios oscilan entre 0,5 y 10 µg kg⁻¹, en el caso de los cereales en grano sin transformar el límite máximo era de 5 µg kg⁻¹ y según el reglamento (CE) Nº 594/2012 del 5 de Julio de 2012 ha disminuido hasta 3 µg kg⁻¹.

En la tabla 1 se indican los límites máximos permitidos en diferentes muestras de alimentos según la última **Directiva de la UE (Regulación Europea (EC) Nº 594/2012 del 5 de Julio**, de acuerdo con la Regulación de la Comisión Europea, (modificando la Regulación (EC) Nº105/2010).

MUESTRA	MÁXIMA CONCENTRACIÓN DE OTA (µg kg ⁻¹)
Cereales en grano sin transformar	5,0 (3,0)
Productos derivados de los cereales	3,0
Uvas pasas	10,0
Café tostado (en grano/molido)	5,0
Café soluble	10,0
Vino/zumo de uva/ Mosto de uva	2,0
Alimentos infantiles	0,5
Alimentos dietéticos	0,5

Tabla 1. Límites máximos permitidos en el contenido de OTA (µg kg⁻¹) en diferentes tipos de alimentos

Estas recomendaciones y el número elevado de micotoxinas que existen han propiciado el desarrollo de una gran cantidad de proyectos de investigación en busca de nuevos métodos analíticos para el control de los alimentos.

1.2 METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE OCRATOXINA A

1.2.1 Métodos cromatográficos para la determinación de ocratoxina A

Existen diferentes métodos analíticos que pueden ser utilizados para la cuantificación de las micotoxinas, debido a la baja concentración en la que se encuentran (del orden de ng g^{-1}), se requieren métodos analíticos más sensibles y además es necesario que el método se aplique a una variedad amplia de muestras ^[12].

Normalmente el análisis de micotoxinas es un proceso multietapa que comprende la toma de muestra y su preparación, la extracción de la micotoxina de la matriz de la muestra y finalmente la detección y determinación cuantitativa ^[13].

Para la determinación de la concentración de micotoxinas se utilizan diversos métodos analíticos cuantitativos basados en separaciones cromatográficas, entre ellas se encuentra la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección ultravioleta o fluorescente y la cromatografía en capa fina (TLC) que se usa para *screening*, otro método analítico de gran interés son los métodos inmunoquímicos o los sensores ópticos como la Resonancia de Plasmon Superficial (SPR), que permiten realizar análisis semicuantitativos y cuantitativos ^[14].

La técnica HPLC es el método instrumental más usado donde se obtienen unos límites de detección de $0,2 \text{ ng g}^{-1}$ en la mayoría de los alimentos y unas recuperaciones mayores al 90 %, en el caso del estudio de la OTA se usa la detección por fluorescencia (HPLC-FD) debido a que la OTA presenta un fluoróforo natural en sus moléculas ^[15]. La desventaja que presentan los métodos cromatográficos es que se requiere una instrumentación compleja, necesitando un tiempo de análisis elevado así como un alto coste de reactivos y disolventes orgánicos.

Por los motivos anteriores, entre otros, en los últimos años se han desarrollado métodos inmunoquímicos para facilitar la determinación de OTA ^[16], como métodos de análisis más simples, rápidos y de bajo requerimiento instrumental. Un claro ejemplo de método inmunoquímico son los ensayos ELISA.

1.2.2 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Los métodos ELISA con detección espectrofotométrica son muy empleados en el análisis rutinario, aunque generalmente sólo se usan para confirmar la presencia o no de niveles máximos de micotoxinas en alimentos (*screening*). Algunas veces los métodos ELISA son estudios previos de base para el desarrollo de nuevos inmunosensores para micotoxinas.

Pueden ser cualitativos o semi-cuantitativos y son probablemente más adecuados para los propósitos de detección rápida. Es importante tener la seguridad de que tales métodos han sido completamente validados. (www.mycotoxins.org).

La tecnología se basa en la capacidad de un anticuerpo específico de distinguir la estructura tridimensional de una micotoxina específica y llevar a cabo una etapa de reacción competitiva entre el antígeno y el anticuerpo durante un tiempo de 1-2 horas.^[17]

Todos los ensayos ELISA dependen de los mismos elementos básicos:

Revestimiento/captura: inmovilización directa o indirecta de antígenos sobre la superficie de los pocillos de poliestireno. El antígeno se inmoviliza ya sea mediante adsorción directa o por medio de un anticuerpo adsorbido a los pocillos de una microplaca.

Etapas de bloqueo: Adición de una proteína u otra molécula para cubrir todos los sitios de unión insaturados de la superficie de los pocillos de la placa.

Competición: Incubación con anticuerpos específicos de antígenos que por afinidad se unen a los antígenos.

Medición de la señal: la detección de la señal generada a través de la etiqueta directa o indirecta o secundaria en el anticuerpo específico. La señal observada es proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra.

Los sucesivos lavados entre las etapas garantizan que las altas uniones específicas se mantengan hasta la etapa de revelado de la señal.^[18]

En la figura 1 se muestran los diferentes esquemas de trabajo en un ensayo ELISA competitivo.

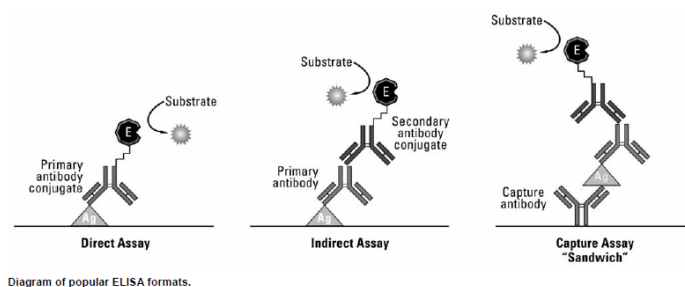


Figura 2. Diferentes esquemas de trabajo de ELISA competitivo.

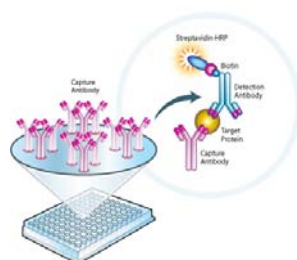


Figura 3. Principio de ELISA competitivo directo para el análisis de micotoxinas. Esquema de inmunoensayo en el pocillo ELISA.

Existen numerosos métodos ELISA disponibles comercialmente para la determinación de micotoxinas basados en un ensayo competitivo. Estos kits son portables, rápidos y muy específicos así como de fácil manejo pero presentan como desventajas, principalmente que son de uso individual lo que incrementa su coste económico, otras desventajas son su limitado rango de detección debida a la poca sensibilidad de los anticuerpos,^[15] además de sus largos tiempos de análisis y la gran cantidad de falsos positivos y negativos que puede haber^[19].

La sensibilidad y especificidad de un método ELISA depende en su mayor parte de la naturaleza, del origen y de las propiedades del anticuerpo utilizado,^[20] presentando mayor sensibilidad los ensayos ELISA competitivos indirectos que de los directos^[21].

La gran ventaja que presenta el método ELISA es que es una técnica cuantitativa, rápida, de fácil operación para determinar una gran cantidad de muestras y es sensible^[22].

BIOSENSORES

Desde las últimas dos décadas se ha comenzado a reconocer los beneficios del uso de los biosensores como herramienta de investigación de una forma rutinaria. Los **biosensores** son dispositivos que usan receptores biológicos o químicos en contacto con un transductor para detectar analitos en una muestra.

Los receptores biológicos suelen ser enzimas, tejidos animales o vegetales, antígenos, anticuerpos, ácidos nucleicos, etc, son usados como elementos de biorreconocimiento para dotar al dispositivo de la selectividad y especificidad requeridas para la determinación de analitos de origen muy variado en el ámbito clínico, toxicológico, medioambiental, agroalimentario, etc^[24].

El rendimiento de un biosensor depende de su capacidad para inmovilizar receptores, de la accesibilidad de los receptores y de la baja adsorción inespecífica sobre el soporte sólido. Estos requisitos son los que aportan especificidad y sensibilidad al biosensor.^[25]

Se pueden dividir los biosensores en cuatro grupos principales en función de las propiedades físico-químicas de las micotoxinas:^[4] luminiscentes /calorimétrico, de plasmón superficial (SPR), de microbalanza de cuarzo o sensores electroquímicos teniendo estos últimos la ventaja de su alta sensibilidad y simplicidad.

El uso de biosensores en el análisis de contaminantes en alimentos es una tecnología emergente y todavía no existen en el mercado más que un número muy limitado para la determinación de OTA^[26] basándose la mayoría en la transducción SPR.

La resonancia de plasmón superficial (SPR) es una técnica óptica donde la luz se utiliza para excitar los plasmones en una lámina delgada de oro unido a la superficie de un prisma de vidrio. La resonancia es un acoplamiento entre la energía de la luz y los plasmones superficiales en la película de oro, cuando se produce la resonancia hay una absorción resultante de la energía y una disminución en la intensidad de la luz reflejada. El ángulo de la luz incidente en el que se produce este proceso se conoce como ángulo de resonancia y depende de los índices de refracción del prisma y de la superficie del sensor.^[27]

Los ensayos SPR se pueden clasificar dependiendo de las características del analito, de la muestra y de la sensibilidad que tiene el instrumento ya que la detección directa solamente es útil para muestras que tienen un peso molecular mayor a 10 kDa por lo que en el caso de la OTA, al ser una molécula de bajo peso molecular (403,8 Da), se necesitan ensayos de tipo sándwich o ensayos competitivos.^[28]

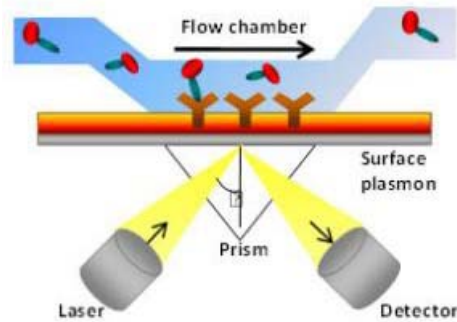


Figura 4: Esquema de la etapa de interacción antígeno-anticuerpo en SPR

SPR es una técnica útil para monitorizar interacciones en tiempo real, permite caracterizar cada paso de la inmovilización y el proceso de unión del analito, por lo que es de gran interés para la determinación de OTA ^[29], según la bibliografía los biosensores basados en SPR con aplicaciones en micotoxinas son los más numerosos ^[30], se han desarrollado métodos para la detección simultánea de múltiples micotoxinas en un bajo tiempo de análisis con un límite de detección para la OTA de $0,1 \text{ ng ml}^{-1}$ ^[31] además de obtener un rango de respuesta muy amplio^[32].

Mediante la combinación de las ventajas de la reacción inmunológica específica de antígeno-anticuerpo y la alta sensibilidad y fiabilidad de la señal de transducción, los inmunoensayos SPR ofrecen unos rendimientos excepcionales con respecto a la sensibilidad, especificidad, velocidad y detección multianalito en matrices analíticas complejas.^[33]

1.2.2.1 INMUNOSENSORES Y APTASENORES

En los últimos años, la tecnología ha experimentado un interés particular por el uso de inmunosensores y aptasensores para la determinación de OTA ^[32], ^[34].

Los inmunosensores y aptasensores son biosensores de afinidad y se pueden clasificar atendiendo al elemento de biorreconocimiento, si se lleva a cabo la inmovilización del elemento de bioconocimiento se trata de inmunosensores o aptasensores directos y en el caso de la inmovilización del antígeno se hablará de indirectos.

Un inmunosensor o aptasensor competitivo se basa en la competición entre el analito y el analito marcado normalmente con una enzima (en nuestro caso HRP) por los sitios de unión

del anticuerpo por lo que cuanto mayor es la concentración del analito menor es la unión del analito marcado al anticuerpo produciéndose de esta forma una menor señal ^[35], ^[36]. En este tipo de esquema se cumple que la concentración de analito es inversamente proporcional a la señal.

Los **inmosensores** están basados en el uso de **anticuerpos** como elemento de biorreconocimiento de la OTA. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales siendo los últimos mucho más específicos y de mayor afinidad hacia el analito que los primeros.

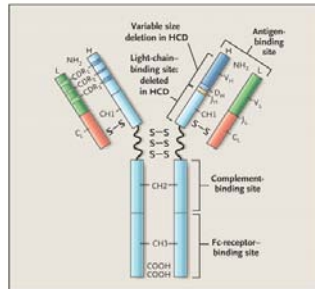


Figura 5: Representación gráfica de un anticuerpo

En los esquemas directos, la inmovilización del elemento de bioreconocimiento se considera como un paso crítico en el desarrollo de un inmosensores, la mayor afinidad entre antígeno-anticuerpo depende de la orientación del anticuerpo ^[37].

Cada vez es más emergente el uso de inmosensores, de ahí que se pueda encontrar una amplia bibliografía, se encuentran artículos donde se estudian las diferentes superficies sólidas donde llevar a cabo la inmovilización tanto del anticuerpo como del antígeno como es el caso del uso de membranas de nitrocelulosa donde se usa BSA como bloqueante ^[35].

Dado que nuestro trabajo de investigación se centra en la determinación de OTA se va a mencionar a continuación algunos estudios para esta micotoxina.

En los últimos años se ha desarrollado el uso de inmosensores electroquímicos para la determinación de OTA en vino y cereales basados en inmunoensayos competitivos directos e indirectos. En ambos casos se consiguieron obtener límites de detección por debajo de los límites legales establecidos ^[38]. Este tipo de inmosensores permite una cuantificación sencilla y sensible de la OTA muy por debajo de los límites de concentración regulados por la Comisión Europea donde los resultados obtenidos demuestran que son unas potentes y novedosas herramientas analíticas para la determinación de OTA, manteniendo una alta correlación con los resultados obtenidos con la metodología oficial (HPLC-FD) ^[39]. Son posibles mejoras analíticas mediante el uso de nanopartículas de oro como superficie sólida de inmovilización ^[40] como se comentará posteriormente.

La determinación de la concentración de OTA en un inmunoensayo competitivo se lleva a cabo a partir del ajuste a una sigmoide mediante el modelo de los 4 parámetros logísticos a través de la ecuación:

$$f(X) = i_{\min} + \frac{(i_{\max} - i_{\min})}{1 + (X/EC_{50})^m}$$

Los inmunosensores han revolucionado el análisis moderno ya que son instrumentos sensibles, selectivos, de monitoreo en tiempo real. La técnica de trabajo es sencilla y tienen una gran velocidad de respuesta ^[32]. La selectividad de un inmunosensor está dada por el anticuerpo monoclonal que se usa, mientras que la alta sensibilidad se debe a la alta afinidad del anticuerpo y la sensibilidad de la detección electroquímica ^[39].

El descubrimiento de los aptámeros en el año 1990 ^[41] abrió nuevas perspectivas en el campo de los biosensores. Los **aptámeros** son secuencias cortas (20 a 90 oligonucleótidos) de oligonucleótidos de cadena sencilla (ADN, ARN) seleccionadas *in vitro* ^[4]. El procedimiento SELEX, permite en un principio la posibilidad de crear receptores artificiales para un rango de tipos de moléculas prácticamente ilimitado, tanto de alto peso molecular como de moléculas de pequeño tamaño ^[42]. Los aptámeros, debido a que tienen cadenas sencillas y flexibles, tienen la capacidad en determinadas condiciones físico químicas de adquirir conformaciones tridimensionales facilitando las interacciones específicas con la molécula diana ^[43].

Los aptámeros ofrecen varias ventajas sobre los anticuerpos ya que pueden ser sintetizados *in vitro* en unos pocos minutos, también presentan la ventaja de su estabilidad y pueden ser modificados fácilmente proporcionando una gran flexibilidad durante el ensayo ^[44], son muy selectivos y específicos por lo que son utilizados como elementos de biorreconocimiento útiles para biosensores para determinar OTA en alimentos.

Son muchas las investigaciones donde los **aptasensores** han sido desarrollados, usando técnicas de polarización por fluorescencia ^[45], cromatografía de afinidad acoplados a la detección por fluorescencia molecular ^[44] o por colorimetría donde se usan las nanopartículas de oro (AuNPs) como indicador colorimétrico ^[46].

Pero son los aptasensores electroquímicos los que han sido desarrollados más recientemente, estando muchos de ellos basados en ensayos competitivos mediante el uso de partículas magnéticas como superficie sólida de inmovilización ^[36].

Estos tipos de aptasensores presentan una alta sensibilidad, un tiempo de respuesta rápida, bajo costo, presenta una instrumentación sencilla ^[47] y con posibilidad de hacer un análisis *in situ*.

1.3 USO DE PARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Para que un elemento de biorreconocimiento funcione correctamente es necesario que se inmovilice sobre un soporte sólido. Esta etapa de inmovilización es muy importante que se controle para conseguir una alta reactividad, buena orientación y accesibilidad, estabilidad sobre la superficie y conseguir una mínima unión inespecífica. Las **partículas magnéticas (MBs)** son una herramienta poderosa que se presenta en una gran variedad de bioensayos ya que su uso aporta una gran variedad de ventajas. Su uso mejora la afinidad entre antígeno y el elemento de biorreconocimiento mediante una cinética rápida debido a que las MBs se encuentran en suspensión. El posible efecto matriz se reduce considerablemente debido a que gracias a un separador magnético se pueden efectuar correctamente las etapas de lavado y de

separación ^[48], aportan sensibilidad y un sistema de detección rápido y portable ^[49], aumenta considerablemente el rendimiento del inmunoensayo debido al incremento considerable de la superficie de biorreconocimiento ^[50].

La unión de los elementos de biorreconocimiento sobre las partículas magnéticas se produce a través de los grupos funcionales (amino, carboxilo, proteína, etc) presentes en la superficie sólida de éstas. Dicha unión se produce mediante la formación de un enlace covalente.

En nuestro tema de estudio se usan diferentes tipos de partículas magnéticas como superficie sólida donde se lleva a cabo la inmovilización de los elementos de biorreconocimiento. Antes de la etapa de inmovilización se lleva a cabo una serie de lavados ^[39] que permitan eliminar los posibles conservantes que puedan contener, dichas etapas de lavados antes, durante y después de la etapa de inmovilización se realizan con la ayuda de un separador magnético que es capaz de atraer a las partículas magnéticas con los bioreactivos inmovilizados y permite eliminar los bioreactivos que no han reaccionado.

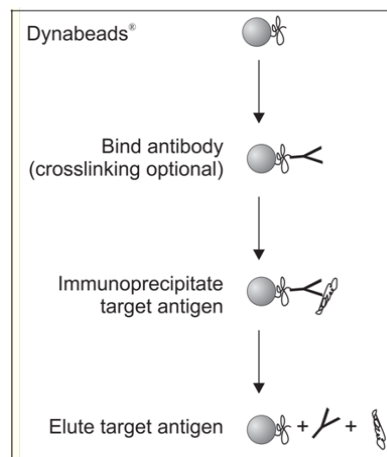


Figura 6: ejemplo de inmovilización de las MBs mediante un esquema directo.

Capítulo 2: OBJETIVOS

El objetivo general que se plantea en este trabajo de investigación se centra en el estudio de diferentes elementos de biorreconocimiento para la determinación de la OTA, estudiándose la reacción de afinidad entre este elemento de biorreconocimiento selectivo a la OTA y ésta última.

Estos dos elementos de biorreconocimiento objeto de estudio son un aptámero y un anticuerpo monoclonal, que son el elemento fundamental para el desarrollo posible final tanto de un aptasensor como de un inmunosensor electroquímicos respectivamente.

Una vez planteado el objetivo general, se pretende conseguir los siguientes objetivos más específicos:

1. Estudio y optimización de los diferentes parámetros que intervienen en la reacción de afinidad entre la OTA que es el analito objeto de estudio y el aptámero de la OTA (AptOTA). Se estudiaron dos aptámeros, uno modificado con biotina en el extremo 5' y otro sin biotina. En todos los casos se trabajó sobre partículas magnéticas (MBs) como superficie sólida para inmovilizar el elemento de biorreconocimiento, tanto en el estudio de un esquema directo como indirecto competitivo mediante ensayo ELISA realizando previamente los oportunos estudios de inmovilización sobre las MBs y estudios de afinidad. Entre los parámetros a optimizar se encuentran la elección de las partículas magnéticas óptimas, elección de bloqueantes y activadores, concentración de AptOTA y AptOTA-bi, etc
2. Estudio de la reacción de afinidad entre los diferentes elementos de biorreconocimiento y la OTA-BSA mediante la técnica de Resonancia de Plasmón Superficial (SPR). Para ello se lleva a cabo la inmovilización del conjugado OTA-BSA sobre la superficie del chip de dextrano y a continuación se hace reaccionar con el correspondiente elemento de biorreconocimiento.
3. Estudio y optimización de los diferentes parámetros que intervienen en la reacción de afinidad entre la OTA que es el analito objeto de estudio y el anticuerpo monoclonal sobre las MBs, en el estudio de un esquema directo competitivo mediante ensayo ELISA. Entre los parámetros a optimizar se encuentran la concentración del conjugado enzimático (OTA-HRP), la elección de las partículas magnéticas óptimas, el tiempo de la etapa de inmovilización y de competición, etc.

Capítulo 3: EXPERIMENTAL

3.1. ESTUDIO DE LA REACCIÓN DE AFINIDAD ENTRE LA OCRATOXINA A Y APTÁMERO SOBRE PARTÍCULAS MAGNÉTICAS: ESQUEMA DIRECTO E INDIRECTO

En este primer apartado se describe la caracterización de la reacción de afinidad entre el aptámero selectivo a OTA y la OTA y/o OTA-HRP mediante diferentes técnicas espectroscópicas usando MBs como superficie sólida donde tiene lugar la etapa de inmovilización y competición. También se llevó a cabo una experiencia donde se estudiaron las posibles uniones inespecíficas que pueda haber tanto entre la enzima peroxidasa con las MBs en ausencia de elemento de biorreconocimiento o del AptOTA con las MBs que presentan grupo NH₂. El estudio sobre el aptámero puede quedar dividido principalmente en dos esquemas de ensayo:

- Esquema directo competitivo: **eaMBs-AptOTA-bi + OTA/OTA-HRP**

En este primer esquema de trabajo se pretende estudiar, mediante la técnica espectrofotométrica ELISA, diferentes tipos de MBs funcionalizadas con estreptavidina y optimizar las concentraciones de OTA-HRP y de AptOTA-bi. Al ser un esquema directo se inmoviliza el AptOTA-bi sobre las MBs.

- Esquema indirecto competitivo: **MBs-NH₂-OTA/OTA + AptOTA-bi/AptOTA**

Este esquema de trabajo abarca el uso de diferentes técnicas (ELISA espectrofotométrico, fluorescencia y abSORBANCIA) ya que se pretende estudiar nuevamente, mediante espectroscopía de absorción y mediante inmunoensayo espectrofotométrico la afinidad entre aptámeros (con y sin biotina), de diferentes casas comerciales, con la OTA. Al ser un esquema indirecto, la OTA se inmoviliza sobre las MBs modificadas con el grupo amino y a continuación se hacen reaccionar con el aptámero. Mediante fluorescencia se estudiará el porcentaje de inmovilización de la OTA (previamente activada) sobre las MBs-NH₂.

3.1.1 Materiales e instrumentación

El instrumento usado para el estudio de dichas reacciones de afinidad mediante técnicas espectrofotométricas es un lector de placas **ELISA** (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (Biorad microplat reader, Modelo 680) como el que se muestra a continuación:



Figura 7. Lector de placas ELISA (Biorad microplat reader, Modelo 680)

Para llevar a cabo las diferentes etapas para el estudio de afinidad se usan placas ELISA de poliestireno con 96 pocillos (IWAKI, Japón; figura 8) y un separador magnético (Life Technologies, figura 9) que ayuda a que las partículas magnéticas queden retenidas adecuadamente.



Figura 8. Placa ELISA de poliestireno

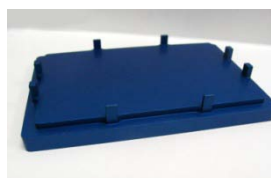


Figura 9. Separador magnético ELISA

Se usan también eppendorfs donde se lleva a cabo la inmovilización tanto del elemento de biorreconocimiento como del analito, según el tipo de esquema que se siga, sobre las partículas magnéticas y su correspondiente separador magnético (Promega, Madison, USA; figura 10) para realizar las sucesivas etapas de separación.



Figura 10. Separador magnético para eppendorfs

Las micropipetas a usar son de volúmenes comprendidos entre 5 y 1000 μ l (Crison, Barcelona, España).

También se necesita un agitador Thermomixer Compact, para 24 viales eppendorf (Eppendorf Ibérica, Madrid, España; figura 11) y un agitador tipo vortex (Reax-control; figura 12).



Figura 11. Thermomixer Compact (Eppendorf Ibérica, Madrid, España)



Figura 12. Aagitador tipo vortex (Reax-control)

En los casos de estudio por espectroscopía de absorción molecular UV-Vis y fluorescencia se trabaja con los siguientes equipos:



Figura 13. Espectrofotómetro de fluorescencia (Perkin Elmer, USA)



Figura 14. Espectrofotómetro diode Array (Hewlett Packard, USA)

3.1.2 Reactivos y tampones

Tampones

- Tampón A: 5 mM Tris -HCl, 0,5 mM EDTA, 1M NaCl, pH 7,5.
- Tampón B: 10 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM CaCl₂, pH 8,5.
- Tampón C: 10 mM PBS, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM CaCl₂ pH 7.
- Tampón D: 10 mM PBS, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM CaCl₂, Tween 20 (0,1%) pH 7.
- Tampón E: 10 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM CaCl₂, Tween 20 (0,1%) pH 8,5.
- Tampón F: 10 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM CaCl₂, pH 6,5.
- Tampón G: 50 mM MES pH= 6.
- Tampón H: 5 mM Tris-HCl pH= 7.5, 0.5 M EDTA, 1 M NaCl.

- Tampón I: 40 mM Tris pH= 7.

Reactivos generales

- Superblock Blocking buffer (Thermo Scientific)
- 3, 3',5,5'- Tetrametilbencidina, TMB (Sigma-Aldrich)
H₂SO₄ 95% (Merck, Madrid, España)
- Tween 20 (Sigma Aldrich)
- 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, EDC (Fluka)
- N-hidroxisuccinimida, NHS (Sigma-Aldrich)
- Etanolamina (Sigma-Aldrich)
- Agua MilliQ
- Biotina (Sigma-Aldrich)

Reactivos de inmunoensayo

- Partículas magnéticas Dynabeads M-270 Streptavidin, Dynabeads M-280 Streptavidin, Dynabeads MyOne Streptavidin C1, Dynabeads MyOne Streptavidin T1 (10 mg ml⁻¹, Dynal, Invitrogen, Oslo, Noruega)
- Partículas magnéticas magMP-NH₂ (28 mg ml⁻¹, Nanomyp, Granada)
- Partículas magnéticas MBs-NH₂ M-270 (30 mg ml⁻¹, Dynal, Invitrogen, Oslo, Noruega)
- Ocratoxina A (ACROS ORGANICS)
- AptOTA-bi y AptOTA (AptaRes, Mittenwalde, Alemania)
- AptOTA-bi y AptOTA (IBA, Alemania)
- Conjugado OTA-HRP (Europroxima)
- eaHRP (Sigma-Aldrich)

3.1.3 Procedimiento experimental

El esquema de trabajo se divide en dos:

- **Esquema directo:**
 - **ELISA espectrofotométrico con diferentes partículas magnéticas funcionalizadas con estreptavidina.**

Principalmente se pretende seleccionar las mejores partículas magnéticas modificadas con estreptavidina para llevar a cabo la inmovilización el AptOTA-bi. Por ello, se estudian

diferentes tipos de partículas magnéticas, las partículas **C1, T1, M-280 y M-270** que están **funcionalizadas con estreptavidina** y que difieren entre ellas en su capacidad de unión sobre el oligonucleótido, por ello la concentración de AptOTA-bi (AptaRes) adicionada va en relación con la capacidad de unión de las eaMBs, adicionándose en este caso la mitad de los moles, ya que así hay más posibilidad de que queden inmovilizados sobre la superficie de las partículas, y por ello se estudian los cuatro tipos. Se adiciona además una concentración de 100 mg l^{-1} de biotina para bloquear los posibles sitios de unión de estreptavidina que puedan haber quedado libres tras la inmovilización del AptOTA-bi y por lo tanto contribuir a un efecto importante de unión no específica. También es muy importante la concentración del conjugado enzimático OTA-HRP en relación con los sitios de unión del AptOTA-bi, normalmente la relación molar de aptámero y de OTA-HRP es de 1:1 pero en este caso se añade un exceso de dos veces más de moles de OTA-HRP en función de los moles de AptOTA-bi ya que así es más probable que sean reconocidas más moléculas de OTA-HRP. Además de lo indicado hasta ahora y como se comentó en su momento, se estudiará la señal de absorbancia en ausencia de OTA-HRP y la unión inespecífica posible en presencia de HRP.

El procedimiento de trabajo se recoge en el **Anexo I**.

- **Esquema indirecto:**
 - **ELISA espectrofotométrico con MBs de grupo amino.**

El uso de las MBs-NH₂ conlleva a que el esquema de trabajo sea indirecto, por ello difieren de las anteriores en el grupo terminal amino donde se inmoviliza la OTA que deberá ser reconocida posteriormente por el AptOTA (elemento de biorreconocimiento).

Se selecciona dicha técnica para llevar a cabo el estudio de la afinidad entre el elemento de biorreconocimiento y analito previamente inmovilizado en la superficie sólida de las partículas magnéticas. También se estudia la unión inespecífica que se pueda dar entre las MBs-NH₂ con el AptOTA y con la eaHRP y la propia unión inespecífica de las partículas sobre la superficie de poliestireno de la placa ELISA. Además también es posible que se de la unión inespecífica entre las MBs-NH₂-OTA con la eaHRP.

La relación molar entre AptOTA y OTA fue diferente dependiendo de las partículas magnéticas utilizadas, en el caso de las MBs-NH₂ de la casa comercial Nanomyp se usó una relación molar 1:1, por lo que para diferentes cantidades de OTA (1, 10, 40 y 80 ng ml^{-1}) a optimizar se añadió la concentración de aptámero correspondiente a la concentración más alta de OTA (80 ng ml^{-1}), por lo que habrá tanto una relación molar de aptámero como un exceso de éste. En el caso de las de la casa comercial Dynal la relación molar es la misma añadiéndose también un exceso. Se requiere el uso de EDC y de EDC/NHS + NH₂OH como activantes.

Para abordar este ensayo es necesario bloquear las MBs-NH₂ activadas con EDC/NHS ya que el AptOTA-bi se une inespecíficamente a las mismas, los dos bloqueantes a estudiar han sido la albúmina sérica bovina (BSA) en una concentración de 10 mg ml^{-1} y la etanolamina (1 M, pH 8,5)

El protocolo de trabajo se recoge en el **Anexo II**.

- **Medidas por fluorescencia**

Sabiendo que la OTA presenta propiedades fluorescentes se utilizó esta técnica óptica para el estudio del porcentaje de inmovilización de ésta sobre las partículas magnéticas. El uso de estas MBs requiere también el uso de activantes por lo que además se estudiaron las propiedades fluorescentes de la OTA y de la OTA activada previamente.

El protocolo de trabajo se recoge en el **Anexo III**.

- **Medidas por espectroscopía de absorción molecular UV-Vis**

El AptOTA y AptOTA-bi presentan un máximo de absorción a una longitud de onda de 260 nm por lo que se aprovecha esta característica para estudiar la afinidad entre el aptámero y la OTA de diferentes casas comerciales. La OTA ha sido previamente inmovilizada sobre la superficie de las partículas magnéticas (MBs-NH₂). Se estudió en primer lugar la absorción que presenta el AptOTA (a diferentes concentraciones), en segundo lugar la absorción de las MBs-NH₂-OTA, y finalmente la absorción del sobrenadante de las MBs-NH₂-OTA +AptOTA (-bi) una vez se hubo llevado a cabo la reacción de afinidad durante un tiempo determinado. El uso de diferentes bloqueantes también es un parámetro a optimizar.

El protocolo de trabajo se recoge en el **Anexo IV**.

3.1.4. Resultados y discusión:

Como se indicó anteriormente se estudiaron dos tipos de ensayos competitivos:

- **Estudio directo:**
 - **ELISA espectrofotométrico con diferentes partículas magnéticas funcionalizadas con estreptavidina.**

En el presente estudio de la reacción de afinidad entre el AptOTA-bi con presencia y ausencia de OTA-HRP se utilizaron partículas magnéticas funcionalizadas con estreptavidina. El AptOTA-bi es de la casa comercial AptaRes. Con la adición de un exceso de AptOTA-bi se consiguió que se inmovilizase totalmente sobre las partículas y reconociese a la OTA-HRP añadida en exceso consiguiéndose valores de absorción elevados, en el caso de no añadir OTA-HRP los valores de absorción eran próximos a cero.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

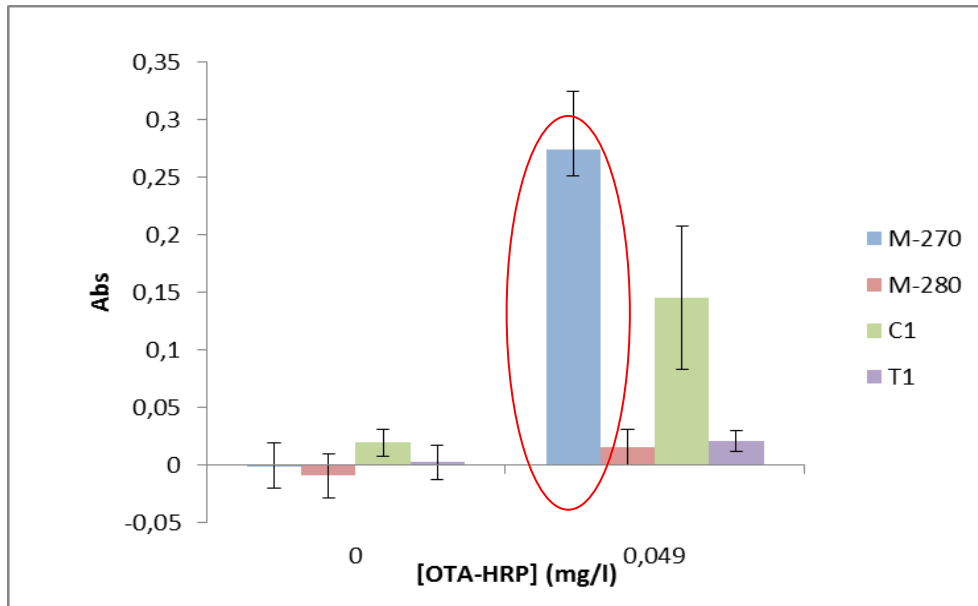


Figura 15: Resultados experimentales ELISA. 15 minutos de inmovilización de AptOTA-bi. Blancos y concentraciones máximas de OTA-HRP (0 y 2,5 mg/l) según partículas M-270, M-280, C1 y T1. Tiempo incubación: 30 minutos. Bloqueado con biotina 1000 mg/l. Tiempo bloqueo: 30 minutos.

A la vista de los resultados recogidos en la figura 15 se puede decir que en las experiencias donde **no hay OTA-HRP las señales de absorbancia son cercanas a cero** por lo que todas las eaMBs se han comportado prácticamente igual. En el caso de las experiencias con presencia de OTA-HRP ($0,049 \text{ mg l}^{-1}$) las MBs que reportan la mayor absorbancia (0,25) son las M-270, seguidas de las C1 (0,15 unidades de Abs).

La duda que se puede presentar es si el AptOTA-bi inmovilizado sobre las partículas magnéticas reconoce a la parte de la OTA o a la parte de HRP del conjugado enzimático o en su defecto si la HRP es capaz de unirse a las eaMBs por los sitios de unión libres que hayan podido no ser ocupados por el AptOTA-bi, por todo esto se repitió el ensayo en las mismas condiciones, pero aplicando la siguiente variación [21] con respecto al protocolo inicial de trabajo que se recoge en el *Anexo I: Adición de la concentración requerida de HRP o OTA-HRP durante 30 minutos con agitación y a temperatura ambiente.*

Con las modificaciones realizadas sobre el procedimiento experimental inicial se obtuvieron los siguientes resultados:

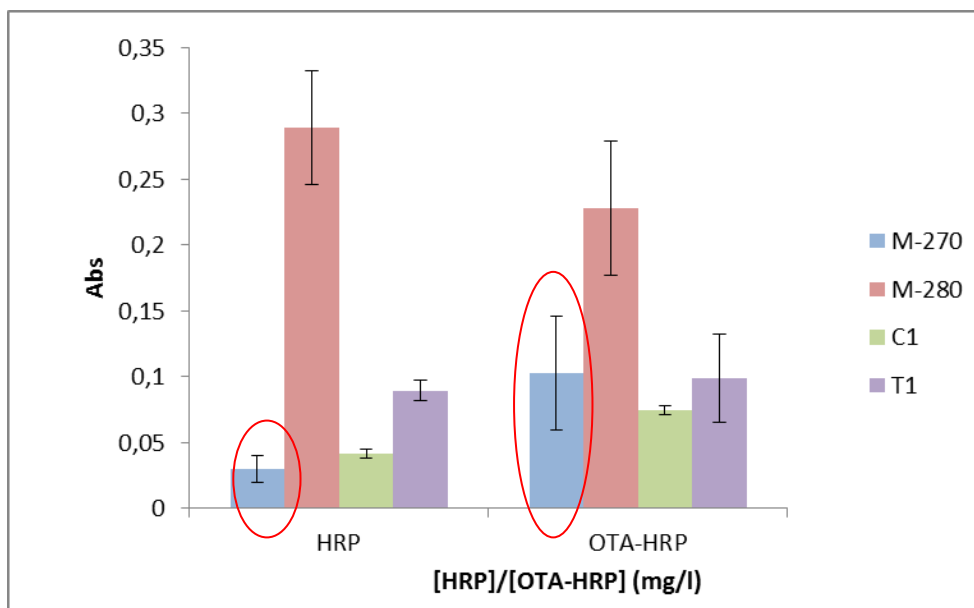


Figura 16: Resultados experimentales ELISA. 15 minutos de inmovilización de AptOTA-bi. Concentraciones máximas de HRP y OTA-HRP ($2,5 \text{ mg l}^{-1}$) según partículas M-270, M-280, C1 y T1. Tiempo incubación: 30 minutos. Bloqueo con biotina 1000 mg l^{-1} . Tiempo bloqueo: 30 minutos.

Como se puede observar, se obtienen diferentes resultados al trabajar con las diferentes eaMBs. Para el caso de las cuatro eaMBs se produce una considerable unión inespecífica, la HRP es reconocida tanto por el AptOTA-bi como por las eaMBs, siendo para el caso de la M-270 donde más baja es dicha unión (0,025). Estas eaMBs M-270 son las únicas que se podrían considerar como adecuadas ya que presentan la mayor diferencia entre los valores de absorbancia obtenidos para la unión específica e inespecífica, en presencia o no del elemento de biorreconocimiento, con una diferencia en el valor de absorbancia medido próximo a 0,075. Como consecuencia de todas estas experiencias con los diferentes tipos de eMBs se puede concluir que debido a la poca reproducibilidad de los resultados, a la alta unión inespecífica y baja unión específica se decide cambiar a un esquema competitivo indirecto por lo que conlleva a cambiar de partículas magnéticas.

- **Esquema indirecto:**

- **MBs de grupo amino (Nanomyp)**

- **ELISA espectrofotométrico**

En una sola experiencia se estudiaron las diferentes reacciones de afinidad, la concentración de MBs utilizada ha sido de 1 mg ml^{-1} , y en su superficie sólida se inmovilizaron diferentes concentraciones crecientes de OTA en el rango $0 - 80 \text{ ng ml}^{-1}$, para una concentración constante de eaHRP 1:10000 y una concentración de AptOTA proporcional a la concentración más alta de OTA adicionada (80 ng ml^{-1}).

Se adiciona dicha concentración de AptOTA para que haya un posible exceso de aptámero sobre las moléculas de OTA ya que la concentración óptima (teórica) de aptámero es aquella que es equimolecular con el número de moles de OTA en usencia de OTA-HRP.

Los estudios llevados a cabo fueron:

-Unión inespecífica

MBs-NH₂

MBs-NH₂ + eaHRP

MBs-NH₂ + AptOTA-bi

MBs-NH₂ + AptOTA-bi + eaHRP

MBs-NH₂-OTA + eaHRP

-Unión específica

MBs-NH₂-OTA (1, 10, 40 y 80 ng ml⁻¹) + AptOTA-bi + eaHRP

Todo ello para 5 µg de partículas magnéticas:

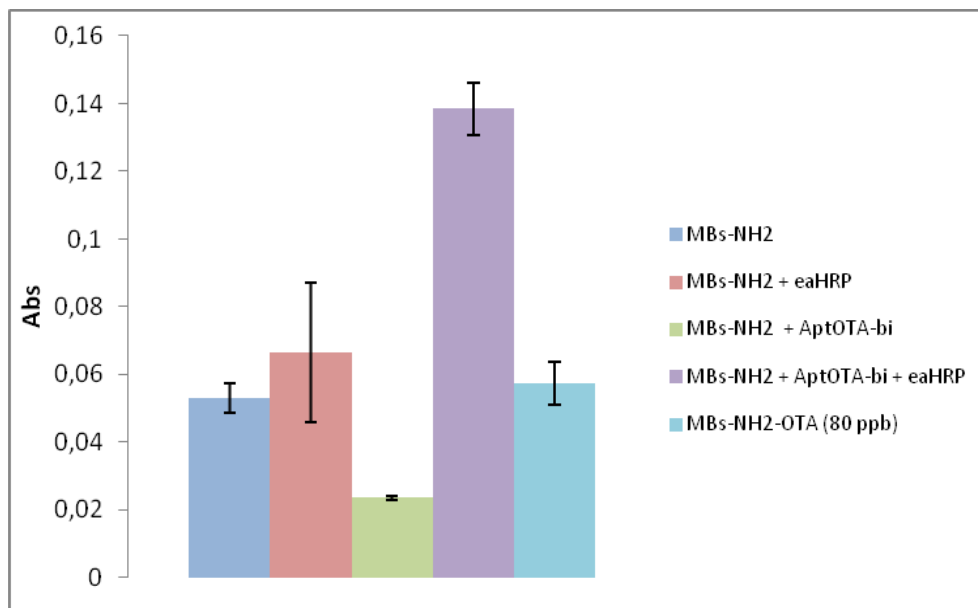


Figura 17: Resultados experimentales de unión inespecífica por ELISA. 2 horas de incubación de MBs-NH₂-OTA y MBs-NH₂. 30 minutos de inmovilización de AptOTA-bi. Adición ea-HRP 1/10000. Tiempo incubación 30 min.

A la vista de los resultados recogidos en la figura 17 se puede decir que hay una unión inespecífica considerable para todos los casos.

En el caso del estudio de las MBs-NH₂-OTA (80 ng ml⁻¹) se observa una muy baja unión no específica de la eaHRP (1:10000) a las MBs-NH₂ modificadas con OTA.

Para el caso de ausencia de OTA inmovilizada sobre las MBs-NH₂ y en presencia de AptOTA-bi (sin eaHRP) se observa una señal de absorbancia muy baja (0,02) lo cual es lógico pues no hay enzima HRP.

Se observa una señal inespecífica alta del AptOTA-bi a las MBs-NH₂ modificadas en presencia de eaHRP, lo cual tiene sentido ya que el ácido nucleico en presencia de EDC se unirá al grupo amino de las partículas.

Se obtienen valores de absorbancia muy bajos para el caso de MBs-NH₂ y MBs-NH₂ + eaHRP (0,056 y 0,65 respectivamente) en el primer caso es razonable porque no hay eaHRP y en el segundo caso se concluye que hay muy poca unión inespecífica de la la eaHRP sobre las MBs-NH₂ activadas con EDC.

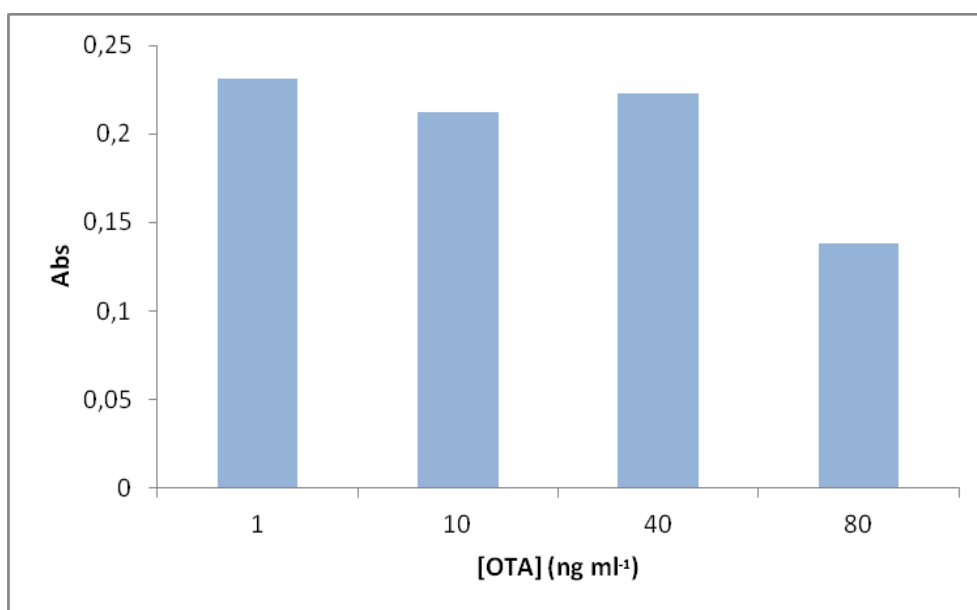


Figura 18: Resultados experimentales de unión específica por ELISA. 2 horas de incubación de MBs-NH₂-OTA y MBs-NH₂. 30 minutos de inmovilización de AptOTA-bi. Concentraciones de OTA (1; 10; 40 Y 80 ng ml⁻¹). Adición ea-HRP 1/10000. Tiempo incubación 30 min.

En las experiencias mostradas en la figura 18 podemos observar que a medida que aumenta la concentración de OTA desde 1 hasta 80 ng ml⁻¹ disminuye la absorbancia medida (0,23- 0,15). Esto se puede explicar teniendo en cuenta problemas de espacio para que el AptOTA-bi se una alrededor de la OTA cuando hay un exceso de la misma sobre la superficie de las partículas magnéticas. No obstante en todos los casos se ha observado una señal de absorbancia mayor al caso de no haber AptOTA-bi.

Como resumen podemos decir que se ha observado afinidad entre el AptOTA-bi y la OTA inmovilizada sobre las MBs-NH₂. El mayor valor de absorbancia se observa para una concentración de OTA inmovilizada de 1 ng ml⁻¹. Además se concluye que existen problemas de unión no específica del AptOTA-bi a las MBs-NH₂ modificadas con EDC y almacenadas en tampón B.

- **Medidas por fluorescencia y absorbancia**

Se ha llevado a cabo el estudio, gracias a la fluorescencia intrínseca de la molécula de OTA, su espectro de emisión a diferentes concentraciones (1, 10, 40 y 80 ng ml⁻¹) tanto de la OTA como de la OTA con el activante EDC, posteriormente se llevó a cabo la inmovilización tanto de las diferentes concentraciones de la OTA como de la OTA + EDC durante 3 horas y a temperatura ambiente siendo medido el sobrenadante por fluorescencia, el porcentaje de inmovilización más elevado conseguido fue de **50 %** correspondiente a una concentración de OTA de 80 ng ml⁻¹.

A partir de ahí se estudió la afinidad entre el AptOTA y la OTA inmovilizada sobre las MBs mediante absorbancia y la posible unión inespecífica del AptOTA con las MBs-NH₂. El aptámero (AptOTA-bi y AptOTA) utilizado es de la casa comercial AptaRes.

En primer lugar se estudió la absorbancia que presentan los aptámeros de concentración 0,5 μM en tampón J, posteriormente se estudió la **suspensión** tanto de las MBs-NH₂.OTA como de las MBs-NH₂ y finalmente la afinidad del AptOTA por la OTA (80 ng ml⁻¹) inmovilizada sobre las partículas como por las MBs-NH₂, tanto el sobrenadante recogido en el separador magnético como la disolución resultante tras haber llevado a cabo un filtrado (filtros de 0,22 de diámetro de poro).

La concentración de AptOTA adicionada es proporcional a los moles de OTA (2.10⁻⁷ moles).

Los resultados mostraron que el AptOTA muestra una mayor afinidad respecto al AptOTA-bi y que prácticamente no hay unión inespecífica del AptOTA sobre las MBs-NH₂. Para obtener unos resultados consolidados se llevó a cabo la repetición de la experiencia anterior donde se usó únicamente AptOTA mediante el mismo protocolo de trabajo indicado en el **Anexo IV** los resultados obtenidos mostraron una elevada unión inespecífica y una baja unión específica.

Como consecuencia de estos resultados experimentales poco satisfactorios, se decidió estudiar la inmovilización de la OTA sobre otras MBs modificadas con el grupo NH₂.

MBs-NH₂ (M-270, Dynal)

- **Medidas por fluorescencia y absorbancia**

Mediante estas dos técnicas analíticas se pretende estudiar la reacción de inmovilización de la OTA sobre las MBs-NH₂ y posteriormente la reacción de unión específica e inespecífica sobre esta superficie sólida, utilizando el AptOTA como elemento de biorreconocimiento.

Para el estudio con las MBs-NH₂ (M-270) se usan como activantes EDC y EDC/NHS de concentración 10 mg ml⁻¹ para el caso de EDC y de 15 mg ml⁻¹ para el caso de NHS.

Se llevaron a cabo las mismas experiencias que en el caso de usar MBs-NH₂ (Nanomyp) pero aplicando las siguientes variaciones respecto a las indicadas en el **Anexo II** apartado A: tanto en las medidas de fluorescencia como en las de absorbancia se usó el protocolo de trabajo de acondicionamiento de las MBs recogido en el apartado B del citado Anexo y se modificó [7] del **Anexo IV** apartado A por **un tiempo de incubación de 30 minutos a temperatura ambiente**.

En el estudio por absorbancia se trabajó con AptOTA de las casas comerciales AptaRes e IBA adicionando tanto un defecto como un exceso de moles respecto a los moles adicionados de OTA.

Los resultados obtenidos no fueron satisfactorios para el caso de las medidas por fluorescencia, ya que se obtuvo únicamente un **11 % de inmovilización de la OTA** sobre las MBs-NH₂. En el caso de las medidas por absorbancia indicar que se obtuvo un **64 % de afinidad del AptOTA de la casa comercial IBA** en el caso de encontrarse en exceso respecto a los moles de OTA. La unión inespecífica existente fue de un **15 %**.

- **ELISA espectrofotométrico**

Unión específica e inespecífica con diferentes aptámeros.

En el estudio de la reacción de afinidad entre AptOTA y OTA inmovilizada sobre MBs-NH₂ y activadas tanto con EDC como con EDC/NHS + NH₂OH, de forma general se observó que con el aumento de concentración de AptOTA se consiguen mayores valores de absorbancia pero los valores obtenidos son demasiado bajos.

Se repitió el ensayo en las mismas condiciones, pero aplicando las siguientes variaciones [16] con respecto al protocolo inicial de trabajo que se recoge en el *Anexo II apartado B: Añadir en cada uno de los pocillos 50 µl de concentraciones crecientes de AptOTA (0; 0,5; 1 y 2 µM) o en su defecto tampón J* (según estudio de especificidad).

Para comprobar si el aumento de absorbancia respecto a un incremento de la concentración de AptOTA es debido a la afinidad entre AptOTA y OTA o es debido a la unión inespecífica del AptOTA sobre las MBs-NH₂ se amplió el ensayo con las mismas condiciones de trabajo pero con MBs-NH₂ sin OTA inmovilizada, pudiéndose comprobar en la siguiente gráfica comparativa:

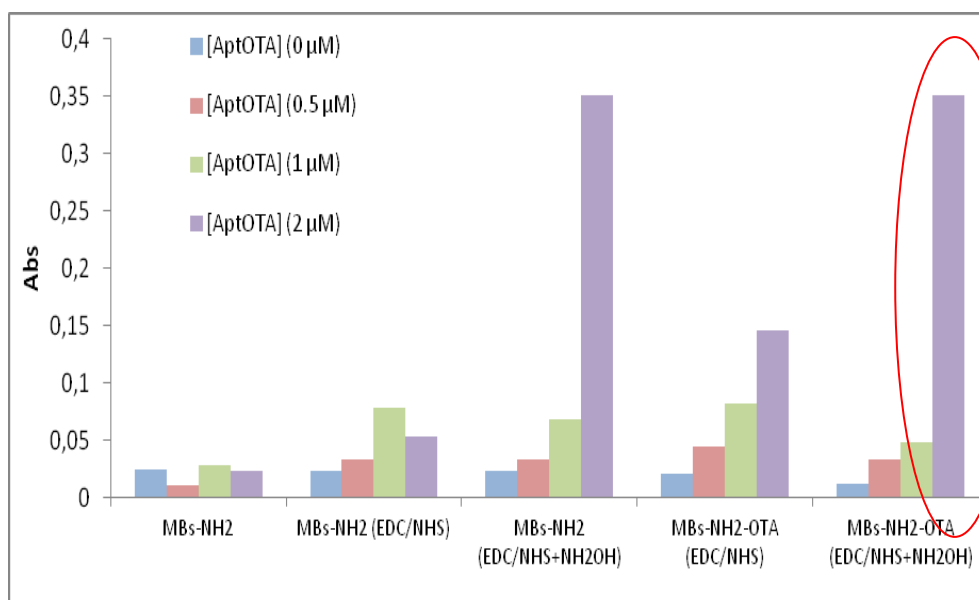


Figura 19: Resultados experimentales de estudio de afinidad por ELISA. 2 horas de incubación de MBs-NH₂-OTA y MBs-NH₂ activadas con EDC o con EDC/NHS + NH₂OH .30 minutos de inmovilización de AptOTA. Concentraciones de AptOTA-bi (0; 0,02; 0,2 y 0,5 µM). Adición ea-HRP 1/100000. Tiempo incubación 30 min.

A la vista de los resultados se puede concluir que hay una baja unión inespecífica del AptOTA y de la eaHRP a las MBs-NH₂. En el caso de haber modificado las MBs-NH₂ con EDC/NHS se produce un mayor efecto de unión inespecífica y es debida al AptOTA ya que aumenta respecto al aumento de concentración. Se observa que en presencia de la OTA inmovilizada y activada con EDC/NHS + NH₂OH para una concentración máxima de AptOTA la absorbancia es elevada (0,35) por lo que corresponde a una unión inespecífica considerable.

Uso de diferentes bloqueantes

Con el uso de dos bloqueantes diferentes para bloquear las MBs-NH₂ y evitar que se produzca reacción de afinidad con el AptOTA se obtuvieron absorbancias menores para las uniones específicas entre AptOTA y OTA inmovilizada sobre las MBs-NH₂.

Se repitió el ensayo anterior en las mismas condiciones, pero adicionando el siguiente punto que irá a continuación de [15] con respecto al protocolo inicial de trabajo que se recoge en el *Anexo II apartado B: De cada uno de los bloqueantes se añaden 50 µl de bloqueante en tampón J durante 30 minutos con agitación suave, constante y a temperatura ambiente.* Se adiciona antes de añadir el AptOTA con el fin de evitar su unión no específica sobre la superficie de las MBs-NH₂.

En el estudio de la BSA se trabajó con una concentración de 0 y 0,5 µM de AptOTA:

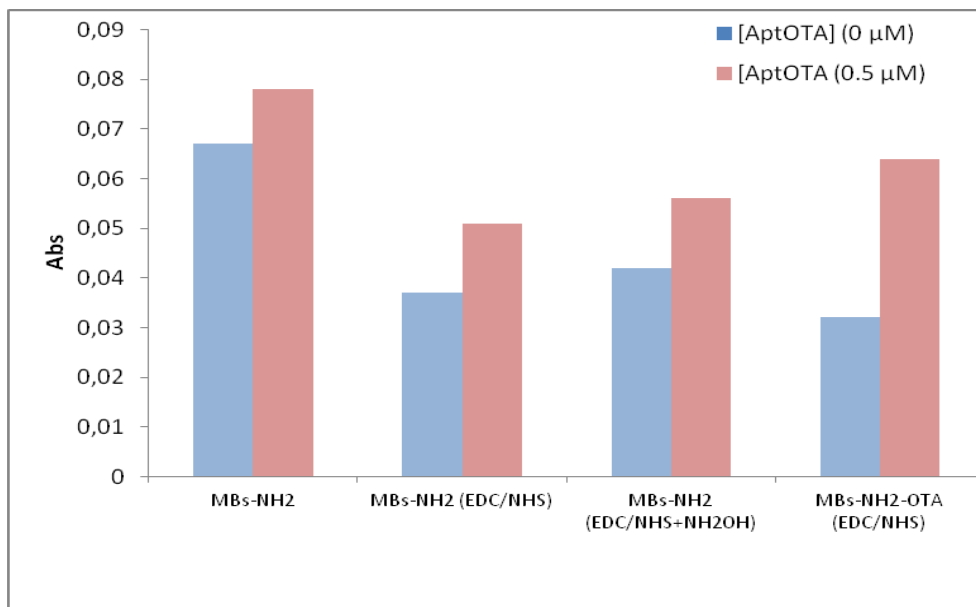


Figura 20: Resultados experimentales de estudio de afinidad con el uso de BSA como bloqueante por ELISA. 2 horas de incubación de MBs-NH₂-OTA y MBs-NH₂ activadas con EDC o con EDC/NHS + NH₂OH .30 minutos de inmovilización de AptOTA Concentraciones de AptOTA (0 y 0,5 µM). Adición ea-HRP 1/100000. Tiempo incubación 30 min.

Para el caso de la experiencia con la etanolamida se usan concentraciones de 0 y 2 μM de AptOTA:

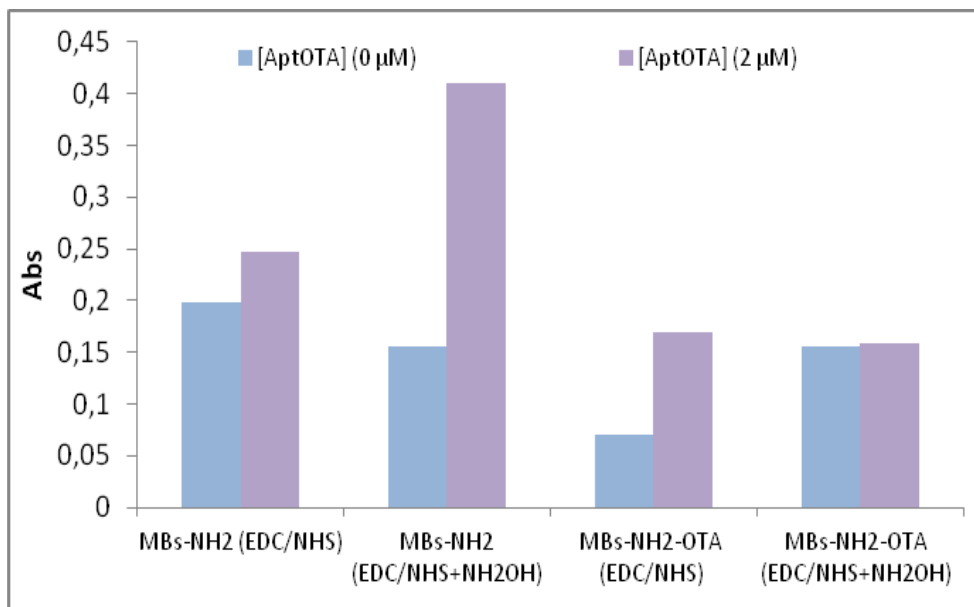


Figura 21: Resultados experimentales de estudio de afinidad con el uso de etanolamida como bloqueante por ELISA. 2 horas de incubación de MBs-NH₂-OTA y MBs-NH₂ activadas con EDC o con EDC/NHS + NH₂OH. 30 minutos de inmovilización de AptOTA. Concentraciones de AptOTA (0 y 0,5 μM). Adición ea-HRP 1/100000. Tiempo incubación 30 min.

En el caso de utilizar estos dos bloqueantes, el efecto que se ha conseguido es el bloquear la OTA inmovilizada sobre las MBs-NH₂, de manera que **el aptámero es incapaz de unirse selectivamente a la OTA inmovilizada.**

3.2 ESTUDIO DE LA REACCIÓN DE AFINIDAD ENTRE OCRATOXINA A-BSA Y APTÁMERO BIOTINILADO POR RESONANCIA DE PLASMÓN SUPERFICIAL (SPR)

Se llevó a cabo el estudio de la reacción de afinidad entre los diferentes elementos de biorreconocimiento y la OTA mediante la técnica de **Resonancia de Plasmón Superficial (SPR)**. De los dos esquemas posibles de trabajo, se ha trabajado con el **esquema indirecto**, la OTA-BSA se inmoviliza sobre la superficie del chip y una vez inmovilizado se estudia la interacción con el AptOTA y con el AptOTA-bi.

3.1.3 Materiales e instrumentación

Todas las reacciones de afinidad se llevan a cabo en el instrumento de Resonancia de Plasmón Superficial Biacore T200 (GE Healthcare UK Ltd, Buckinghamshire, England)



Figura 22: Instrumento de Resonancia de Plasmón Superficial (Biacore T200)

En el caso de llevar a cabo las inmobilizaciones se usa un chip Serie S CM5 con una superficie de oro recubierta de dextrano (figura 23. Apt. a) que se coloca directamente en el equipo (figura 23. Apt. b)



Figura 23. Apt a) chip Serie S CM5. Apt b) Introducción del chip en el instrumento de Resonancia de Plasmón Superficial (SPR).

También fueron necesarias micropipetas de volúmenes comprendidos entre 5 y $\mu\text{l}1000$ (Crison, Barcelona, España) y un agitador tipo vortex para homogenizar los reactivos (Reax-control).

3.1.4 Reactivos y tampones

Tampones

- *Running buffer*: HBS-E, pH 7.4 (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005 % polysorbate 20 (surfactante).
- Tampón de inmobilización: Acetato (0,1 M, pH 4)
- Tampón SB: (10 mM HEPES, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM MgCl_2 pH 7)
- Tampón BB: (10 mM Tris pH 8,5, 120 mM NaCl, 5 mM KCl y 20 mM CaCl_2)

Reactivos generales

- 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) (Fluka)
- Biotina(Sigma Aldrich)
- Ácido acético al 25 %
- Glicina-HCl
- N-hidroxisuccinimida (NHS) (Sigma-Aldrich)
- Etanolamida (Sigma Aldrich)
- Agua Milli Q

Reactivos de inmunoensayo

- Aptámero de OTA (AptOTA, AptaRes)
- Aptámero de OTA biotinilado (AptOTA-bi, AptaRes)
- Aptámero de OTA (AptOTA, IBA)
- Albúmina serica bovina (BSA) EC N° 232-936-2 (Sigma-Aldrich)
- OTA-BSA (sintetizada laboratorio)

3.1.5 Procedimiento experimental

Inmovilización de la BSA y OTA-BSA sobre la superficie del microchip de dextrano.

Las condiciones que se fijaron en el equipo fueron:

- *Running buffer*: HBS-E, pH 7.4 (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005 % polysorbate 20 (surfactante)).
- Flujo : 5 $\mu\text{l min}^{-1}$
- Temperatura de análisis: 25 °C
- Temperatura del compartimento de muestra: 25 °C

El microchip presenta cuatro canales donde se puede realizar cada una de las inmovilizaciones, en un canal se inmoviliza la OTA-BSA y en otro la BSA. La inmovilización de los diferentes ligandos nombrados anteriormente sobre la superficie del microchip requiere un total de tres etapas.

1ª etapa: Activación del grupo carboxilo del dextrano de la superficie del microchip mediante la química de las aminas primarias, para ello se requiere la inyección de 50 μl de la mezcla EDC (200 mM) + NHS (50 mM).

2ª etapa: Unión del ligando sobre la superficie activada del microchip. Las condiciones de inyección dependen del ligando.

OTA-BSA: Inyección de 100 μl de OTA -BSA (50 mg/l) en tampón acetatos pH 9,6 + 100 μl de ácido acético al 25 %.

BSA: Inyección de 60 μl de 50 mg/l de BSA en tampón acetatos pH 4.

3ª etapa: Bloqueo de los sitios de unión inespecífica del microchip con etanolamina mediante la inyección de 60 μl de etanolamina (1 M, pH 8.5).

- Estudio de la reacción de afinidad entre AptOTA-bi y AptOTA con la OTA-BSA y la BSA

Una vez que el ligando ha sido inmovilizado sobre la superficie del microchip se debe añadir el elemento de biorreconocimiento (AptOTA) para poder estudiar la reacción de afinidad entre estas dos moléculas. Para dicho estudio hace falta inyectar 60 μl de cada uno de los distintos elementos de biorreconocimiento (AptOTA-bi, AptOTA de dos casas comerciales diferentes) a diferentes caudales (5-20 $\mu\text{l min}^{-1}$) y en diferentes tampones (SB y BB). También se estudia el efecto de la temperatura a un caudal menor (2 $\mu\text{l min}^{-1}$).

3.1.6 Resultados y discusión

- Inmovilización de la OTA-BSA y BSA en diferentes canales

Una vez terminada la etapa de activación de la superficie del microchip y la etapa de inmovilización de la OTA-BSA y de la BSA cada uno en su canal se obtuvieron unas señales de **2698,4 RU** y de **6313,1 RU** respectivamente. Los sensorgramas correspondientes se muestran a continuación:

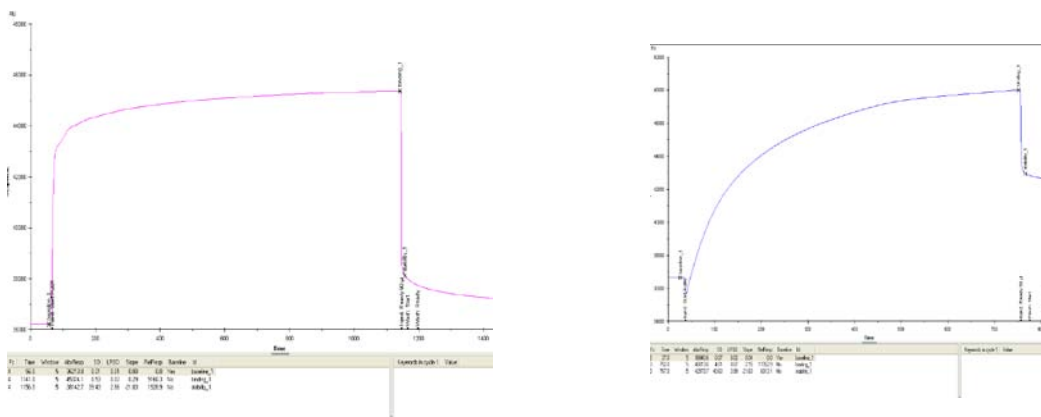


Figura 24: Sensorgrama obtenido en el proceso de inmovilización del ligando. Figura 5.a: inmovilización de OTA-BSA sobre dextrano del chip CM5. Figura 5.b inmovilización de BSA sobre dextrano del chip CM5

Por lo que se puede concluir que ha sido más satisfactoria la inmovilización de la BSA (más RU) sobre la superficie del dextrano que la OTA-BSA considerándose dicho valor como una buena inmovilización sobre el microchip.

- Estudio de la reacción de afinidad entre los diferentes ligandos y aptámeros.

Una vez concluida las tres etapas indicadas con anterioridad donde tanto la OTA-BSA como la BSA han quedado previamente inmovilizadas sobre la superficie del microchip, se estudian las diferentes reacciones de afinidad, para ello se estudian tres aptámeros diferentes, uno de ellos es biotinilado en el extremo 5' y los otros dos sin biotinilar siendo de diferentes casas

comerciales pudiéndose así realizar una comparativa entre ellos y saber cuál presenta una mayor afinidad hacia la OTA.

Para cada uno de los aptámeros se intentó estudiar las condiciones óptimas de trabajo para lograr una reacción de afinidad óptima. Los resultados se muestran a continuación:

	CONCENTRACIÓN (μM)	TAMPÓN	CAUDAL (μl min ⁻¹)	T° (°C)	RESULTADO (RU)
AptOTA-bi (AptaRes)	5	SB	20		-24,9
	5	BB	20		-0,6
	5	BB	5		-2,1
	5	BB	5	37	-29,3
AptOTA (IBA)	5	SB	20		-35,5
	5	BB	20		-1,2
	5	BB	5		-0,8
	5	SB	2	37	-32,3
AptOTA (AptaRes)	5	SB	20		-42,7
	5	BB	20		-2,0
	5	BB	5		-0,7
	5	SB	2	37	-70,5
	5	BB	2	37	19,3

Tabla 2: Representación de la optimización de diferentes parámetros para diferentes aptámeros mediante la técnica SPR.

Vistos los resultados mostrados anteriormente se puede concluir que no hay ningún tipo de reconocimiento entre ninguno de los aptámeros estudiados con la OTA-BSA inmovilizada. Ninguno de los cambios realizados en las diferentes variables ha mejorado considerablemente el reconocimiento.

Esto nos sirve para poder confirmar que el aptámero no es el elemento de biorreconocimiento adecuado para nuestro analito, por ello se decide continuar el estudio con un anticuerpo monoclonal específico de OTA.

3.3 ESTUDIO DE LA REACCIÓN DE AFINIDAD ENTRE LA OCRATOXINA A Y UN ANTICUERPO MONOCLONAL SOBRE PARTÍCULAS MAGNÉTICAS: ESQUEMA DIRECTO

En este apartado se va a llevar a cabo la optimización de todos los parámetros experimentales que pueden influir en la reacción de afinidad entre la OTA y un anticuerpo monoclonal específico y selectivo a esta molécula. Además se ha optimizado la reacción de competición entre la OTA y el conjugado enzimático OTA-HRP por los sitios libres de unión del anticuerpo monoclonal mediante la técnica espectrofotométrica ELISA. El esquema de trabajo planteado es un esquema directo competitivo usando la superficie sólida de las MBs funcionalizadas con proteína G (MBs-prG) para llevar a cabo la inmovilización del anticuerpo monoclonal.

3.1.7 Materiales e instrumentación

Tanto los materiales como la instrumentación requerida se indico previamente en el apartado 3.1.1, exceptuando el equipo de fluorescencia y de absorción molecular UV-Vis.

3.1.8 Reactivos y tampones

Tampones

- Tampón fosfato (PBS): $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ (0,1 M) y NaCl (0,138 M) pH=7,4
- Tampón lavado (PBST): PBS con Tween20 (0,02% m/v)

Reactivos generales

- Superblock Blocking buffer (Thermo Scientific)
- NaCl (Scharlau, Barcelona, España)
- Na_2HPO_4 (Sigma Aldrich)
- NaH_2PO_4 (Scharlau, Barcelona, España)
- 3,3',5,5'- Tetrametilbencidina, TMB (Sigma-Aldrich)
- H_2SO_4 95% (Merck, Madrid, España)
- Tween 20 (Sigma Aldrich)

Reactivos de inmunoensayo

- Partículas magnéticas Dynabeads protein G, MBs-prG (30 mg ml⁻¹, Novex, Life Technologies, Oslo, Noruega)
- Ocratoxina A (ACROS ORGANICS)
- Anticuerpo monoclonal selectivo a OTA (DE 4, R-Biopharm)
- Conjugado OTA-HRP (Europroxima, BN Arnhem, Bélgica)

3.1.9 Procedimiento experimental

Se pretende llevar a cabo, en primer lugar, el estudio de la unión inespecífica de la OTA-HRP sobre las MBs-prG, donde tiene lugar la reacción de inmovilización del anticuerpo monoclonal (mAbOTA) , y en segundo lugar el estudio de la afinidad entre la OTA y OTA-HRP con el anticuerpo monoclonal específico de OTA inmovilizado previamente en la superficie sólida de dichas MBs-prG, por último se optimizará la reacción de competición entre la OTA y la OTA-HRP por los sitios libres de unión del anticuerpo monoclonal inmovilizado

Se usa la técnica ELISA espectrofotométrico para estudiar y optimizar dichas reacciones, tanto la unión específica como inespecífica. Para conseguir las condiciones adecuadas para que se produzca una afinidad óptima se llevó a cabo una serie de optimizaciones que se mostrarán a continuación.

El esquema de trabajo para el estudio de la unión específica es por tanto un esquema directo competitivo, **MBS-prG-mAbOTA-(OTA/OTA-HRP)** donde se llevan a cabo las siguientes etapas:

- Inmovilización del anticuerpo monoclonal sobre las partículas magnéticas funcionalizadas con proteína G.
- Etapa de competición entre OTA y OTA-HRP por los sitios libres del mAbOTA.
- Etapa de revelado.
- Medida espectrofotométrica a 450 nm.

Entre las diferentes etapas se incluye una etapa de lavado de las partículas magnéticas para eliminar el exceso de reactivos que no hayan reaccionado

El protocolo de trabajo para ambos estudios de especificidad se muestra en el **Anexo V**.

3.1.10 Resultados y discusión:

Comparativa unión específica e inespecífica.

En primer lugar se estudió, como se indicó en el punto anterior, la posible unión inespecífica de las MBS-prG con la OTA-HRP con y sin competición con la OTA y compararlo con la unión específica que existe con la MBS-prG-mAbOTA en la misma situación anterior.

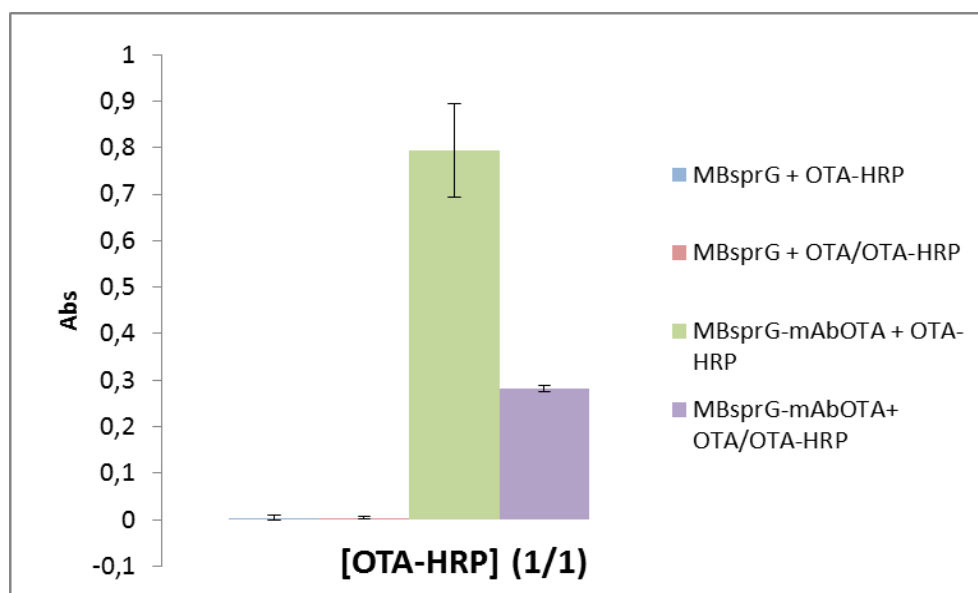


Figura 25: Resultados experimentales de absorbancia ELISA. Estudio de unión inespecífica 8, 33 µl de MBsprG, 25 µl OTA-HRP y 25 µl OTA (300 mg/l) o 25 µl de tampón PBS. Estudio de unión específica 8, 33 µl de MBsprG-mAbOTA, 25 µl OTA-HRP y 25 µl OTA (300 mg/l) o 25 µl de tampón PBS. Tiempo competición= 30 min.

A la vista de los resultados recogidos en la figura 25 se puede observar la elevada reacción de afinidad entre el anticuerpo monoclonal inmovilizado y el conjugado enzimático OTA-HRP.

La barra de color morado es el valor de absorbancia medido tras llevar a cabo la etapa de competición, la OTA es capaz de desplazar al conjugado enzimático OTA-HRP y no permite su unión al anticuerpo monoclonal inmovilizado, con lo que se consigue una buena reacción de competición y una disminución de la señal analítica medida.

En el caso de las dos señales que prácticamente no se aprecian en la gráfica, corresponden a la unión no específica que existe entre la OTA-HRP y la superficie de las MBs-prG sin anticuerpo monoclonal inmovilizado, con lo que se puede ver que el valor de unión no específica es prácticamente despreciable.

Una vez que se ha estudiado que no hay unión inespecífica, que hay competición entre la OTA/OTA-HRP y que hay unión específica hay que optimizar las condiciones de trabajo.

- **Tiempo de la reacción de competición:**

Es importante estudiar cuál es el tiempo óptimo necesario para llevar a cabo la etapa de competición entre la OTA/OTA-HRP por los sitios libres de unión del anticuerpo inmovilizado sobre las MBs-prG, por ello se estudiaron diferentes tiempos: 15, 30 y 60 minutos. La concentración de OTA-HRP se mantuvo fija y la de OTA se modificó desde **0,01 ng.ml⁻¹ hasta 100 ng.ml⁻¹**.

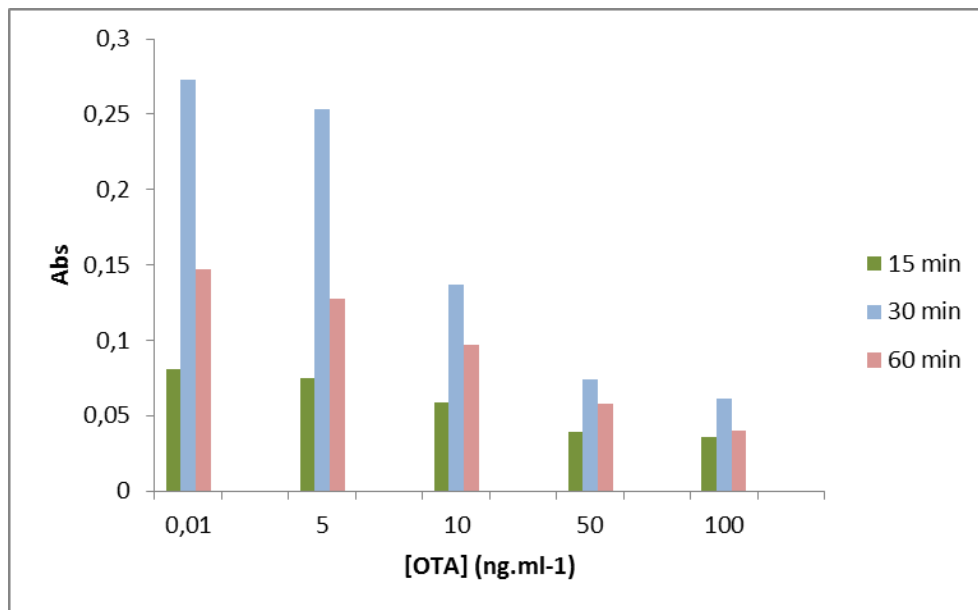


Figura 26. Resultados experimentales de absorbancia ELISA. Trabajo con $[mAbOTA]= 5 \text{ mg/l}$, $[OTA\text{-}HRP]= 1/3$ y $[OTA]= 0,01\text{-} 100 \text{ ng.ml}^{-1}$. Tiempo competición= 15, 30 y 60 min.

Se representó la absorbancia medida frente a la concentración de OTA y se ajustó a una curva sigmoidea haciendo uso de la ecuación de los cuatro parámetros logísticos (ajuste típico en experiencias competitivas de este tipo) se obtiene los siguientes resultados:

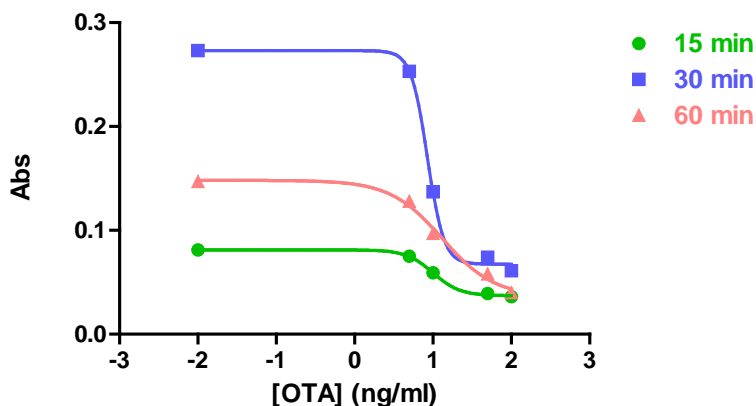


Figura 27. Ajuste sigmoideo de calibrados competitivos a diferentes tiempos de competición. Trabajo con $[mAbOTA]=5\text{ mg/l}$, $[OTA\text{-HRP}]=1/3$ y $[OTA]=0,01\text{-}100\text{ ng.ml}^{-1}$. Tiempo competición= 15, 30 y 60 min.

Los parámetros obtenidos en el ajuste sigmoideo de las tres curvas son:

Tiempo (min)	Abs máx	Abs mín	Pendiente	EC_{50} (ngml^{-1})	R
15	0,08116	0,03702	-2,531	10,04	0,999
30	0,2731	0,06743	-4,167	8,516	0,9989
60	0,1481	0,03610	-1,303	13,17	0,995

Tabla 3: Parámetros obtenidos en el ajuste sigmoideo

El mejor ajuste sigmoideo se obtuvo para un tiempo de competición de **30 minutos**, donde el valor de IC_{50} fue de $8,516\text{ ngml}^{-1}$ y la sensibilidad (pendiente del tramo recto) de $-4,167$.

Por lo tanto, viendo los resultados obtenidos podemos concluir que realizando un calibrado competitivo con concentraciones crecientes de OTA, una dilución **1/3 de OTA-HRP** y **5 μg de MBs-prG-mAbOTA** con concentración de **mAbOTA de 5 mg/l**, la mayor sensibilidad se obtiene a un tiempo de competición de **30 minutos**.

- **Optimización de la concentración de mAbOTA y de OTA-HRP:**

Se estudiaron y compararon varias concentraciones de ambos bioreactivos. Para el caso del anticuerpo monoclonal se comenzó la optimización teniendo en cuenta la capacidad de unión de las MBs utilizadas.

En el caso del conjugado enzimático OTA-HRP se debe tener en cuenta que no debe estar en exceso con respecto al anticuerpo, ya que en el caso de ausencia de competición, la señal sólo será debida a la unión de la OTA-HRP al anticuerpo monoclonal, y si este bioreactivo está en un gran exceso no se observará la disminución de la señal para concentraciones crecientes de OTA.

Por ello se decide hacer una experiencia donde se recoge dicho estudio, para la concentración de mAbOTA se puso la concentración estequiométrica y un exceso y defecto, los resultados obtenidos se muestran en la figura 28:

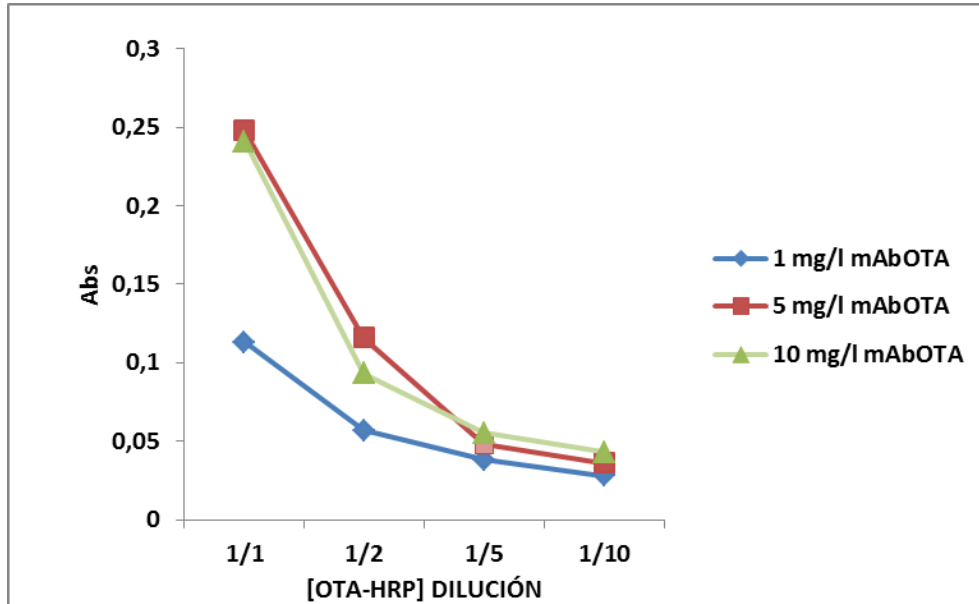


Figura 28. Resultados experimentales de absorbanza ELISA. Trabajo con [mAbOTA]= 1; 5 y 10 mg/l y diferentes diluciones de [OTA-HRP]= 1/1, 1/2, 1/5 y 1/10. Tiempo competición= 30 min.

Al trabajar con una concentración de mAbOTA de 10 mg/l los valores de absorbanza no son más elevados que los obtenidos para una concentración de 5 mg/l por lo que dicha concentración sería más adecuada ya que así no se hace un uso innecesario de mAbOTA.

Teniendo en cuenta las diferentes diluciones de OTA-HRP la óptima sería aquella que no se diluye (1:1), debido a que se consigue la máxima señal, las diluciones de 1/5 y 1/10 no aportan señales concluyentes ya que son muy pequeñas.

Por tanto las mayores señales las conseguimos para una concentración de **mAbOTA de 5 mg l⁻¹** y una dilución de OTA-HRP de **1:1**.

- **Optimización cantidad de MBS-prG-mAbOTA:**

Una vez que se ha estudiado la concentración óptima de mAbOTA a inmovilizar hay que optimizar cuanta cantidad de MBS-prG-mAbOTA que hay que añadir para una concentración de OTA-HRP constante. Es importante optimizar la cantidad de partículas magnéticas ya que influye directamente en la cantidad de sitios de unión del anticuerpo y en su relación con la concentración necesaria de la enzima OTA-HRP, hasta ahora la cantidad utilizada ha sido de 5 µg por lo que se va a probar también con cantidades mayores (5, 15 y 25 µg). La condición óptima obtenida anteriormente para la OTA-HRP permanece invariable pero en el caso del mAbOTA se estudia nuevamente para unas concentraciones de 1, 5 y 10 mg/ml.

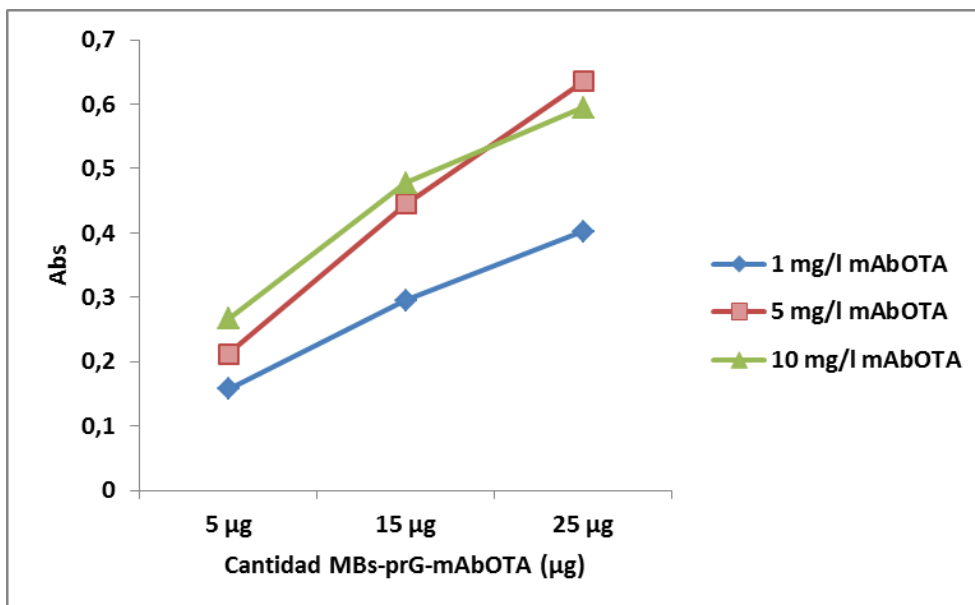
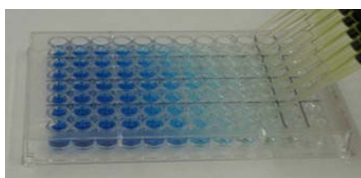


Figura 29. Resultados experimentales de absorbancia ELISA. Trabajo con [mAbOTA]= 1; 5 y 10 mg/l y diferentes diluciones cantidades de MBs-prG-mAbOTA para 1/1 de OTA-HRP. Tiempo competición= 30 min.

Observando los resultados se puede indicar que para las tres concentraciones diferentes de anticuerpo la máxima señal de absorbancia se obtiene para una cantidad de partículas de **25 µg**, para esta cantidad, los valores para 5 y 10 mg l⁻¹ son similares por lo que sería suficiente trabajar con una concentración de 5 mg l⁻¹.

- **Calibrado competitivo de OTA**

Una vez optimizados los parámetros anteriores, se realiza un calibrado para concentraciones crecientes de OTA en el rango de 0,01 – 100 ng ml⁻¹ para una concentración de mAbOTA de 5 mg l⁻¹ como se optimizó anteriormente. Antes de realizar las medida mediante ELISA se observa la placa de tal manera que se puede observar la recta de calibrado a simple vista.



Donde los colores más intensos corresponden a concentraciones bajas de OTA y los colores menos intensos corresponden a concentraciones altas de OTA. La representación sigmoidea final se muestra a continuación:

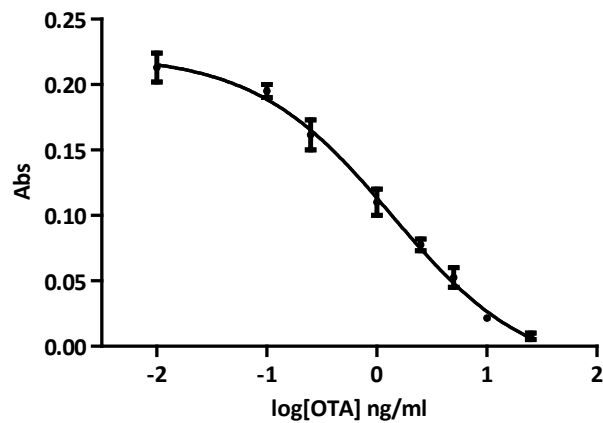


Figura 30. Ajuste sigmoideo de calibrado competitivo. Trabajo con $[mAbOTA]= 5 \text{ mg/l}$, $[OTA\text{-HRP}]= 1/1$ y $[OTA]= 0,01\text{-} 100 \text{ ng.ml}^{-1}$. Tiempo competición= 30 min.

Los parámetros obtenidos en el ajuste de las cuatro curvas son:

Abs máx	Abs mín	Pendiente	$EC_{50} (\text{ngml}^{-1})$	R
0,2228	-0,02200	-0,6978	1,357	0,993

Tabla 4: Parámetros obtenidos en el ajuste sigmoideo

El ajuste sigmoideo obtenido es adecuado consiguiendo un valor de IC_{50} de **1,357**, se consigue una adecuada sensibilidad y competición entre OTA y OTA-HRP.

Por lo tanto, viendo los resultados obtenidos podemos concluir que realizando un calibrado competitivo utilizando **25 μg de MBs-prG-mAbOTA de 5 mg l^{-1} de mAbOTA y 1/1 de OTA-HRP para un rango de concentraciones de OTA de 0,01 – 100 ng ml^{-1}** se obtiene una buena competición entre OTA/OTA-HRP por los sitios de unión del mAbOTA.

Capítulo 4: CONCLUSIONES

En este Trabajo Fin de Máster se ha realizado un estudio previo, en primer lugar de la afinidad entre dos elementos de biorreconocimiento (aptámero y anticuerpo) y la OTA y una posterior optimización de las condiciones óptimas de trabajo con el objetivo de elegir el elemento de biorreconocimiento óptimo.

Las conclusiones de cada apartado del trabajo se resumen a continuación:

I) Estudio de la reacción de afinidad entre Aptámero (AptOTA y AptOTA-bi) y OTA sobre partículas magnéticas: Esquema directo e indirecto.

En el caso del esquema directo:

- En el caso de estudiar la especificidad usando M-270, M-280, C1 y T1 como partículas magnéticas donde se adicionó un exceso de OTA-HRP se obtiene una alta unión inespecífica, la HRP es reconocida tanto por el AptOTA-bi como por las eaMBs y baja unión específica entre el elemento de biorreconocimiento con la OTA.

En el caso del esquema indirecto:

Estudio ELISA espectrofotométrico:

- En el caso del estudio de las MBs-NH₂-OTA y de las MBs-NH₂ (Nanomyp y Dynal) se observa una muy baja unión no específica de la eaHRP (1:10000) sobre éstas. En el caso de las MBs-NH₂ modificadas se observa una unión inespecífica del AptOTA-bi (0,14), en el caso de usar MBs de Nanomyp siendo prácticamente despreciable al usar las MBs de Dynal.

Estudio de fluorescencia:

- En el caso del estudio de la inmovilización de la OTA a las partículas de Nanomyp se podría concluir que usando EDC como activante de las MBs-NH₂ se obtienen porcentajes de inmovilización mayores que si no se usa, de hasta un **50 %**, no ocurriendo lo mismo en el caso de las MBs de Dynal donde el porcentaje de inmovilización de la OTA es tan sólo del **11%**.

Estudio de absorbancia:

- En el estudio de especificidad mediante absorbancia se puede concluir que el AptOTA es capaz de reconocer a la OTA inmovilizada sobre las MBs (Nanomyp) en un mayor % (**82,2 %**) que el AptOTA-bi (**67,1 %**).
No se observó prácticamente unión inespecífica del aptámero sobre las MBs-NH₂. En el estudio con MBs (Dynal) el porcentaje de afinidad específica del AptOTA fue de **64 %** y el de afinidad inespecífica del **15 %**.

II) Estudio de la reacción de afinidad entre AptOTA y OTA-BSA por Resonancia de Plasmón Superficial (SPR)

- Se produce una correcta inmovilización de los diferentes ligandos sobre la superficie de dextrano de los canales del chip, en el caso de la BSA el valor de medida del proceso es de

6313,1 RU y en el caso de la OTA-BSA es de **2698,4 RU** por lo que se puede concluir que la BSA ha sufrido una mejor inmovilización sobre el chip.

- Con las modificaciones llevadas a cabo en el estudio de afinidad de los diferentes aptámeros no se consiguió obtener señales representativas por lo que se puede concluir que no hay ningún tipo de reconocimiento entre ninguno de los aptámeros estudiados con la OTA-BSA inmovilizada.
- Esto nos sirve para poder confirmar que el aptámero no es el elemento de biorreconocimiento adecuado para nuestro analito.

III) Estudio de la reacción de afinidad entre mAbOTA y OTA sobre partículas magnéticas: Esquema directo.

- Elevada unión específica entre mAbOTA y la OTA/OTA-HRP y despreciable unión inespecífica entre la OTA/OTA-HRP por las partículas magnéticas es ausencia de elemento de biorreconocimiento.
- Se ha llevado a cabo la optimización de las condiciones de trabajo para el inmunoensayo competitivo directo entre OTA y OTA-HRP con ELISA espectrofotométrico, las condiciones óptimas son:
 1. mAbOTA de concentración 5 mg l^{-1} , que es la estequiométrica respecto a la cantidad de partículas magnéticas, teniendo en cuenta su capacidad de unión.
 2. La cantidad de MBs-prG-mAbOTA es de $25 \text{ } \mu\text{g}$.
 3. La dilución de 1/1 de OTA-HRP para poder competir con un rango de concentración de OTA entre $0,01\text{-}100 \text{ ng ml}^{-1}$
 4. La sensibilidad del inmunosensor en las condiciones óptimas anteriores fue: **IC_{50} de $1,357 \text{ ng ml}^{-1}$ y la sensibilidad es de $-0,6978 \text{ ml ng}^{-1}$ de OTA.**

Como conclusiones generales relevantes se quiere remarcar que el uso de AptOTA no es viable como elemento de biorreconocimiento debido a su elevada unión inespecífica, no suficiente unión específica y al bajo porcentaje de inmovilización de la OTA sobre las diferentes partículas magnéticas con grupo amino terminal. El aptámero no es capaz de reconocer a la OTA y esto puede ser debido a que no es capaz de plegarse adecuadamente sobre el analito, indicando como inconveniente el bajo peso molecular de la OTA.

Por todo lo anterior indicar que el anticuerpo monoclonal sí que es considerado como un elemento de reconocimiento óptimo, mediante el esquema directo donde es inmovilizado sobre las MBs y es capaz de reconocer a la OTA donde ha quedado reflejado en todos los ensayos realizados, muestra una elevada unión específica y una baja unión inespecífica comportándose claramente como un ensayo competitivo donde a mayor concentración de analito se obtiene señales medidas menores.

ANEXO I. PROTOCOLOS DE TRABAJO CON M-270, M-280, C1 Y T1 POR ELISA

A continuación se recogen los tampones específicos necesarios para trabajar con eaMBs (M-270, M-280, C1 Y T1):

Tampón A: 5 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA, 1M NaCl, pH 7,5.

Tampón B: 10 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM CaCl₂, pH 8,5.

Tampón C: 10 mM PBS, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM CaCl₂ pH 7.

Tampón D: 10 mM PBS, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM CaCl₂, Tween 20 (0,1%) pH 7.

Tampón E: 10 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM CaCl₂, Tween 20 (0,1%) pH 8,5.

Tampón F: 10 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM CaCl₂, pH 6,5.

1º Inmovilización AptOTA sobre las diferentes eaMBs (para ello se tiene en cuenta la capacidad de unión de cada una de ellas por el oligonucleótido):

1. Agitar 5 minutos las eaMBs y se toma la cantidad deseada (**50 µl, 10 mg/ml**).
2. Lavar con tampón B, **3 lavados**.
3. Añadir la cantidad requerida de **AptOTA-bi**
4. Para M-270 y M-280: 100 µl (1 µM) en tampón B.
5. Para C1: 250 µl (1 µM) en tampón B
6. Para T1: 200 µl (1 µM) en tampón B
(Estas cantidades son en función de la capacidad de unión de las eaMBs).
7. Incubación **10-15 minutos** con agitación a temperatura ambiente.
8. Colocar en el separador magnético.
9. Lavar con tampón B, **3 veces**.
10. Adición de biotina (100 ppm) en tampón B.
11. Incubación durante 30 minutos con agitación suave, constante y a temperatura ambiente.
12. Lavar 3 veces con tampón B.
13. Re-suspender en 500 µl con tampón B y almacenar a 4 ° C hasta su uso.

Una vez que el aptámero ha sido inmovilizado sobre las partículas se lleva a cabo el siguiente protocolo de trabajo:

14. Añadir de 300 µl de tampón de bloqueo libre de proteína en cada pocillo durante 60 minutos.
15. Eliminar el tampón de bloqueo
En diferentes eppendorfs (uno por cada experiencia).
16. Adición de un volumen fijo **eaMBs--5'-biAptOTA** de cada una de las diferentes partículas.
17. Lavado de las **eaMBs--5'-biAptOTA** con tampón B.

18. Añadir concentraciones diferentes del conjugado enzimático OTA-HRP según la experiencia o de tampón B en su defecto.
19. Incubación de la OTA-HRP durante 30 minutos con agitación suave, constante y a temperatura ambiente.
20. Lavar dos veces con tampón D
21. Lavar una vez con tampón C
22. Re-suspender en 30 μ l de tampón F.
23. Colocar en cada pocillo de la placa ELISA 10 μ l de partículas.
24. Añadir 50 μ l de TMB.
25. Reacción durante 20 minutos con agitación suave constante y a temperatura ambiente.
26. Adición 50 μ l H_2SO_4 0,5 M que actúa como reactivo de parada entre la HRP y el TMB.
27. Medir el valor de absorbancia en el lector ELISA a una longitud de onda de 450 nm.

ANEXO II. PROTOCOLOS DE TRABAJO CON MBs-NH₂ POR ELISA

A. MBs-NH₂ (*nanomyp*)

A continuación se recogen los tampones específicos necesarios para trabajar con MBs-NH₂ (*nanomyp*):

Tampón G: 50 mM MES pH= 6.

Tampón H: 5 mM Tris-HCl pH= 7.5, 0.5 M EDTA, 1 M NaCl.

Tampón I: 40 mM Tris pH= 7.

Tampón B: 10 mM de Tris-HCl pH 8.5, 120 mM de NaCl, 5mM de KCl y 20 mM de CaCl₂.

1ª Inmovilización aptOTA sobre las diferentes eaMBs (para ello se tiene en cuenta la capacidad de unión de cada una de ellas por el oligonucleótido):

1. Agitar 5 minutos las MBs y se toma la cantidad deseada (17,9 µl, 28 mg/ml, 500 µg).
2. Lavar con tampón G dos veces.
3. Añadir la cantidad calculada de OTA o en su defecto adicionar tampón G (según estudio de especificidad).
4. Añadir 100 µl de EDC de concentración 10 mg/ml en agua milli-Q.
5. Añadir tampón G hasta un volumen final de 500 µl.
6. Incubación durante 3 horas con agitación suave, constante y a temperatura ambiente.
7. Colocar en el separador magnético.
8. Lavar dos veces con tampón I durante 10 minutos.
9. Re-suspender en 500 µl con tampón B y almacenar a 4 ° C hasta su uso
Una vez que la OTA ha sido inmovilizado sobre las partículas se lleva a cabo el siguiente protocolo de trabajo:
10. Añadir de 300 µl de tampón de bloqueo libre de proteína en cada pocillo durante 60 minutos.
11. Eliminar el tampón de bloqueo
12. Añadir en los pocillos de la placa ELISA 5 µl de MBs-NH₂-OTA o MBs-NH₂ (5 µg).
13. Lavar con tampón B dos veces.
14. Añadir en cada uno de los pocillos 100 µl de las concentraciones deseadas de AptOTA-bi o en su defecto tampón B (según estudio de especificidad).
15. Incubación durante 30 minutos con agitación y a temperatura ambiente.
16. Lavar con tampón H dos veces.
17. Añadir 100 µl de la disolución eaHRP 1:10000 en tampón H.
18. Incubación durante 30 minutos con agitación suave, constante y a temperatura ambiente.
19. Lavar con tampón H dos veces.
20. Añadir 50 µl de TMB
21. Reacción durante 20 minutos con agitación suave, constante y a temperatura ambiente.

22. Adición 50 μl H_2SO_4 0,5 M que actúa como reactivo de parada entre la HRP y el TMB.
23. Medir el valor de absorbancia en el lector ELISA a una longitud de onda de 450 nm.

B. MBs-NH₂ (M-270, Dynal)

A continuación se recogen los tampones específicos necesarios para trabajar con MBs-NH₂ (Dynal M-270):

Tampón K: 0,1 M MES, 0,5 M NaCl pH= 6.

Tampón J: 10 mM HEPES pH 7, 120 mM NaCl, 5mM KCl y 5 mM MgCl₂.

Tampón L: 10 mM de HEPES pH 7, 120 mM NaCl, 5mM KCl y 5 mM MgCl₂, Tween 20 (0,1%).

1^º Inmovilización aptOTA sobre las diferentes eaMBs (para ello se tiene en cuenta la capacidad de unión de cada una de ellas por el oligonucleótido):

1. Agitar 5 minutos las MBs y se toma la cantidad deseada (10 μl , 30 mg/ml).
 2. Lavar con tampón K dos veces.
 3. Añadir la cantidad calculada de OTA en tampón K o en su defecto adicionar tampón K (según estudio de especificidad).
 4. Añadir el volumen requerido de EDC (10 mg ml⁻¹) o de EDC (10 mg ml⁻¹) y de NHS (15 mg ml⁻¹) en agua milli-Q.
 5. Añadir tampón K hasta un volumen final de 500 μl .
 6. Incubación durante 2 horas con agitación suave, constante y a temperatura ambiente.
 7. Colocar en el separador magnético.
 8. Eliminar el sobrenadante y añadir si es preciso 500 μl de NH₂OH (10 mM)
 9. Incubación durante 15 minutos con agitación a temperatura ambiente
 10. Lavar con tampón L durante 5 minutos cuatro veces.
 11. Re-suspender en 500 μl con tampón L y almacenar a 4 ° C hasta su uso.
- Una vez que las partículas magnéticas están preparadas, tanto habiendo inmovilizado OTA como únicamente habiendo sido acondicionadas se lleva a cabo el siguiente protocolo de trabajo:

12. Añadir de 300 μl de tampón de bloqueo libre de proteína en cada pocillo durante 60 minutos.
13. Eliminar el tampón de bloqueo.
14. Añadir en los pocillos de la placa ELISA el volumen requerido de MBs-NH₂-OTA o MBs-NH₂ (5 μg).
15. Lavar con tampón J dos veces.
16. Añadir en cada uno de los pocillos 50 μl de concentraciones crecientes de AptOTA-bi (0; 0,02; 0,2 y 0,5 μM) o en su defecto tampón J (según estudio de especificidad).
17. Incubación durante 30 minutos con agitación suave, constante y a temperatura ambiente.
18. Lavar con tampón L dos veces.

19. Añadir 50 µl de la disolución eaHRP 1:100000 en tampón J.
20. Incubación durante 30 minutos con agitación suave, constante y a temperatura ambiente.
21. Lavar con tampón J dos veces.
22. Añadir 50 µl de TMB
23. Reacción durante 20 minutos con agitación suave, constante y a temperatura ambiente.
24. Adición 50 µl H₂SO₄ 0,5 M que actúa como reactivo de parada entre la HRP y el TMB.
25. Medir el valor de absorbancia en el lector ELISA a una longitud de onda de 450 nm.

ANEXO III. PROTOCOLOS DE TRABAJO CON MBs-NH₂ POR FLUORESCENCIA

A. MBs-NH₂ (*nanomyp*) y MBs-NH₂ (*M-270, Dynal*)

A continuación se recogen los tampones específicos necesarios para trabajar con MBs-NH₂:

Tampón G: 50 mM MES pH= 6.

Protocolo de trabajo:

1. Preparación de las diferentes concentraciones de OTA en tampón G
2. **Realizar medida por fluorescencia.**
3. Preparación de las diferentes concentraciones de OTA + 100 μ l de 10 mg ml⁻¹ de EDC en tampón G.
4. Activación durante 30 minutos a temperatura ambiente.
5. **Realizar medida por fluorescencia.**
6. Inmovilizar la OTA o OTA + EDC sobre las partículas magnéticas según el protocolo de trabajo indicado en el ANEXO 2 apartado A.
7. Una vez terminada la incubación eliminar el sobrenadante y **realizar medidas por fluorescencia.**

ANEXO IV. PROTOCOLOS DE TRABAJO CON MBs-NH₂ POR ESPECTROSCOPÍA DE ABSORCIÓN MOLECULAR UV-VIS

A. MBs-NH₂ (*nanomyp*) y (*M-270, Dynal*)

A continuación se recogen los tampones específicos necesarios para trabajar con MBs-NH₂:

Tampón J: 10 mM de HEPES pH 7, 120 mM de NaCl, 5mM de KCl y 5 mM de MgCl₂.

Protocolo de trabajo:

1. Preparación de las alícuotas de AptOTA-bi y AptOTA en tampón J de la concentración requerida.
2. Medida por espectroscopía de absorción UV-Vis en el máximo de absorción.
3. Guardar alícuotas para su posterior uso.
4. Tomar 30 µl de MBs-NH₂-OTA o de MBs-NH₂ en diferentes eppendorfs.
5. Lavar con tampón J dos veces
6. Añadir a cada eppendof 500 µl de AptOTA-bi y AptOTA
7. Incubar durante 15 minutos con agitación suave, constante y a temperatura ambiente.
8. Medir el sobrenadante por absorbancia en el máximo.
9. Fitrar el sobrenadante mediante filtros de 0,22 µm.
10. Medir el sobrenadante por absorbancia en el máximo.

ANEXO V. PROTOCOLOS DE TRABAJO EN INMUNOENSAYOS POR ELISA

1º Inmovilización mAbOTA sobre MBs-prG (para ello se tiene en cuenta la capacidad de unión, 8 µg de mAbOTA por mg de MBs-prG):

1. Adicionar 10 µl (300 µg) de partículas magnéticas MBs-prG *mouse*.
2. Lavar 2 veces con 500 µl de tampón PBST y 1 vez con 500 µl de tampón PBS.
3. Se adiciona 500 µl de anticuerpo (MAbOTA)_{mouse} de la concentración precisa, en el caso de estudiar la unión inespecífica se añade 500 µl de PBS.
4. Se realiza la incubación durante 10 minutos en agitación y a temperatura ambiente.
5. Lavar 2 veces con 500 µl de tampón PBST y 1 vez con 500 µl de tampón PBS.
6. Una vez inmovilizado el anticuerpo sobre las MBs-*algG* y resuspendido en tampón PBS es requerido su almacenamiento 4°C.

Una vez que las partículas están modificadas con el mAbOTA (unión específica) o simplemente han sido acondicionadas (unión inespecífica) se lleva a cabo el siguiente protocolo de trabajo:

1. Bloquear la placa ELISA 3 veces x 300 µl de Superblock Blocking buffer.
2. Añadir un volumen fijo de MBsprG-mAbOTA o de MBsprG.
3. Añadir concentraciones diferentes de OTA-HRP según la experiencia (y OTA si es una experiencia competitiva)
4. Tiempo de reacción de competición de 30 minutos (excepto en el caso del estudio de los tiempos de competición ya que fueron a 15, 30 y 60 min) con agitación constante.
5. Eliminar sobrenadante
6. 2 lavados con PBST y 1 lavado de PBS
7. Añadir 50 µl de TMB
8. Reacción durante 20 min.
9. Adición 50 µl H₂SO₄ 0,5 M que actúa como reactivo de parada entre la HRP y el TMB.
10. Medir el valor de absorbancia en el lector ELISA a una longitud de onda de 450 nm.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] J. W. Bennett, M. Klich, *Clinical Microbiology Reviews* **2003**, 16(3), 497-+.
- [2] V. Sirot, J.-M. Fremy, J.-C. Leblanc, *Food and Chemical Toxicology* **2013**, 52, 1-11.
- [3] FAO, *Food and Agriculture Organization*.
- [4] L. B. Juan C. Vidal, Alba, S. H. Ezquerra, Juan R Bertolin,, Carlota, J. R. C. Cubel, *Biosensors and Bioelectronics* **2013**.
- [5] EMAN, European Mycotoxin Awareness Netwoek, <http://www.mycotoxins.org>.
- [6] J. L. Richard, *International Journal of Food Microbiology* **2007**, 119(1-2), 3-10.
- [7] M. M. Ngundi, L. C. Shriver-Lake, M. H. Moore, M. E. Lassman, F. S. Ligler, C. R. Taitt, *Analytical Chemistry* **2005**, 77(1), 148-154.
- [8] M. A. Fernandez-Baldo, F. A. Bertolino, G. A. Messina, M. I. Sanz, J. Raba, *Talanta* **2010**, 83(2), 651-657.
- [9] H. Xiao, S. Madhyastha, R. R. Marquardt, S. Z. Li, J. K. Vodela, A. A. Frohlich, B. W. Kempainen, *Toxicology and Applied Pharmacology* **1996**, 137(2), 182-192.
- [10] A. Pfohl-Leszkwicz, R. A. Manderville, *Molecular Nutrition & Food Research* **2007**, 51(9), 1192-1192.
- [11] Commission Regulation (EC) No 594/2012 of 5 July 2012 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, Official Journal of the European Union (2012).
- [12] R. Krska, A. Molinelli, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2007**, 387(1), 145-148.
- [13] R. Koeppen, M. Koch, D. Siegel, S. Merkel, R. Maul, I. Nehls, *Applied Microbiology and Biotechnology* **2010**, 86(6), 1595-1612.
- [14] A. E. Urusov, A. V. Zherdev, B. B. Dzantiev, *Applied Biochemistry and Microbiology* **2010**, 46(3), 253-266.
- [15] N. W. Turner, S. Subrahmanyam, S. A. Piletsky, *Analytica Chimica Acta* **2009**, 632(2), 168-180.
- [16] B. Prieto-Simon, M. Campas, *Monatshefte Fur Chemie* **2009**, 140(8), 915-920.
- [17] M. Z. Zheng, J. L. Richard, J. Binder, *Mycopathologia* **2006**, 161(5), 261-273.
- [18] ELISA technical guide and protocols, (Ed.: T. SCIENTIFIC).
- [19] E. Anklam, J. Stroka, A. Boenke, *Food Control* **2002**, 13(3), 173-183.
- [20] S.-H. Wang, X.-Y. Du, Y.-M. Huang, D.-S. Lin, P. L. Hart, Z.-H. Wang, *Fems Microbiology Letters* **2007**, 272(2), 214-219.
- [21] A. Zhang, Y. Ma, L. Feng, Y. Wang, C. He, X. Wang, H. Zhang, *Food Control* **2011**, 22(11), 1723-1728.
- [22] I. K. Cigic, H. Prosen, *International Journal of Molecular Sciences* **2009**, 10(1), 62-115.
- [23] *Label free biosensor, tecniques and aplicaciones*, CAMBRIDGE, **2009**.
- [24] C. dos Santos Riccardi, P. I. da Costa, H. Yamanaka, *Quimica Nova* **2002**, 25(2), 316-320.
- [25] *Recognition receptors in biosensor*, SPRINGER, **2009**.
- [26] I. Y. Goryacheva, T. Y. Rusanova, N. A. Burmistrova, S. De Saeger, *Journal of Analytical Chemistry* **2009**, 64(8), 768-785.
- [27] C. M. Maragos, *Journal of Toxicology-Toxin Reviews* **2004**, 23(2-3), 317-344.
- [28] Y. Li, X. Liu, Z. Lin, *Food Chemistry* **2012**, 132(3), 1549-1554.
- [29] J. Yuan, D. Deng, D. R. Lauren, M.-I. Aguilar, Y. Wu, *Analytica Chimica Acta* **2009**, 656(1-2), 63-71.
- [30] B. van der Gaag, S. Spath, H. Dietrich, E. Stigter, G. Boonzaaijer, T. van Osenbruggen, K. Koopal, *Food Control* **2003**, 14(4), 251-254.
- [31] J. C. C. Yu, E. P. C. Lai, *Reactive & Functional Polymers* **2005**, 63(3), 171-176.

- [32] L.-G. Zamfir, I. Geana, S. Bourigua, L. Rotariu, C. Bala, A. Errachid, N. Jaffrezic-Renault, *Sensors and Actuators B-Chemical* **2011**, 159(1), 178-184.
- [33] D. R. Shankaran, K. V. A. Gobi, N. Miura, *Sensors and Actuators B-Chemical* **2007**, 121(1), 158-177.
- [34] K. Ikebukuro, W. Yoshida, K. Sode, *Nucleic acids symposium series (2004)* **2005**(49), 83-84.
- [35] L. Anfossi, G. D'Arco, C. Baggiani, C. Giovannoli, G. Giraudi, *Food Control* **2011**, 22(12), 1965-1970.
- [36] L. Bonel, J. C. Vidal, P. Duato, J. R. Castillo, *Biosensors & Bioelectronics* **2011**, 26(7), 3254-3259.
- [37] P. Rene Perrotta, F. Javier Arevalo, N. Roberto Vettorazzi, M. Alicia Non, H. Fernandez, *Sensors and Actuators B-Chemical* **2012**, 162(1), 327-333.
- [38] M. Heurich, M. K. A. Kadir, I. E. Tothill, *Sensors and Actuators B-Chemical* **2011**, 156(1), 162-168.
- [39] J. C. Vidal, L. Bonel, A. Ezquerro, P. Duato, J. R. Castillo, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2012**, 403(6).
- [40] J. C. Vidal, L. Bonel, P. Duato, J. R. Castillo, *Analytical Methods* **2011**, 3(4).
- [41] A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1990**, 346(6287), 818-822.
- [42] R. Stoltenburg, C. Reinemann, B. Strehlitz, *Biomolecular Engineering* **2007**, 24(4), 381-403.
- [43] A. Hayat, N. Paniel, A. Rhouati, J.-L. Marty, L. Barthelmebs, *Food Control* **2012**, 26(2), 401-415.
- [44] J. A. Cruz-Aguado, G. Penner, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, 56(22), 10456-10461.
- [45] J. A. Cruz-Aguado, G. Penner, *Analytical Chemistry* **2008**, 80(22), 8853-8855.
- [46] C. Yang, Y. Wang, J.-L. Marty, X. Yang, *Biosensors & Bioelectronics* **2011**, 26(5), 2724-2727.
- [47] L. Barthelmebs, A. Hayat, A. W. Limiadi, J.-L. Marty, T. Noguier, *Sensors and Actuators B-Chemical* **2011**, 156(2), 932-937.
- [48] S. Centi, A. I. Stoica, S. Laschi, M. Mascini, *Electroanalysis* **2010**, 22(16), 1881-1888.
- [49] M. A. Fernandez-Baldo, F. A. Bertolino, G. Fernandez, G. A. Messina, M. I. Sanz, J. Raba, *Analyst* **2011**, 136(13), 2756-2762.
- [50] G. Volpe, U. Sozzo, S. Piermarini, E. Delibato, G. Palleschi, D. Moscone, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2013**, 405(2-3), 655-663.

