

DNAZIMAS: ADN CON ACTIVIDAD CATALÍTICA PARA EL DESARROLLO DE BIOSENSORES

Longinotti, G.¹, Montserrat J.^{2,3}, Ybarra G.¹

INTI-Procesos Superficiales¹, Universidad Nacional de General Sarmiento², INGEBI-CONICET³
glorial@inti.gov.ar

OBJETIVO

El objetivo de nuestro trabajo es desarrollar un biosensor¹ para detectar el gen de shiga toxina I de *Escherichia coli* enterohemorrágica que produce síndrome urémico hemolítico².

INTRODUCCIÓN

El ADN no sólo almacena la información genética necesaria para el desarrollo y funcionamiento de los organismos vivos sino que además puede formar estructuras complejas que presentan propiedades de reconocimiento específico similares a los anticuerpos (aptámeros) o propiedades catalíticas similares a las enzimas (DNAzimas). Los aptámeros y las DNAzimas no se encuentran en la naturaleza sino que son obtenidas a través de procesos de selección molecular *in vitro*³.

En particular, las DNAzimas peroxidadas son secuencias de ADN simple cadena ricas en guanina (G) que tienden a formar estructuras complejas denominadas cuartetos de guaninas⁴. Estos cuartetos son arreglos cíclicos que forman alternativamente apareamientos tipo Watson-Crick y tipo Hoogsteen (figura 1).

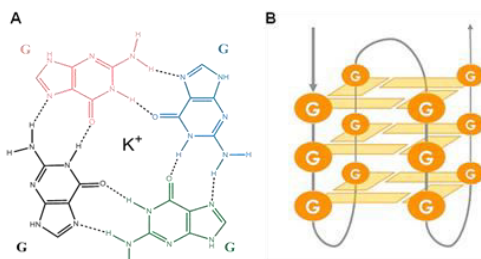


Figura 1. (A) Estructura de un cuarteto de guaninas. (B) Representación esquemática de una conformación de ADN unimolecular con tres cuartetos de G paralelos.

Estos cuartetos tienen la habilidad de unir hemina (protoporfirina), la cual le confiere actividad catalítica peroxidasa (figura 2). La hemina también presenta actividad catalítica por sí misma, pero en las condiciones adecuadas esta actividad es despreciable frente a la del complejo ADN-hemina.

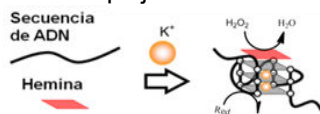


Figura 2. Representación esquemática de la formación del complejo ADN-hemina.

Las técnicas de detección de biomoléculas dependen en general de un marcador (fluoróforo, enzima, compuesto radiactivo, etc) para informar que un evento de reconocimiento molecular ha sucedido. En general este marcador debe ser agregado en un paso adicional, lo cual alarga los tiempos de ensayo, aumenta los costos y puede bajar la sensibilidad del método.

Para armar el sensor sin la necesidad del agregado externo de marcadores diseñamos una molécula de ADN que consta de dos regiones: una que reconoce específicamente el analito que queremos detectar y otra que genera una señal cuando se produce el evento de reconocimiento (DNAzima).

Mediante este sistema se pueden detectar, por ejemplo, secuencias de ADN complementarias, cationes metálicos (Ag^+ , K^+ , Hg^{+2} , Pb^{+2} , Cu^{+2}), moléculas sencillas (adenosina, AMP, cocaína, ATP), proteínas (lisozima, trombina), etc⁵.

La secuencia diseñada tiene una estructura de horquilla de ADN (o *stem-loop*), que incluye una secuencia complementaria al gen de shiga toxina I de *Escherichia coli* enterohemorrágica y una secuencia que forma una DNAzima sólo al producirse el evento de reconocimiento. En ausencia de la secuencia blanco a detectar la horquilla se encuentra plegada lo cual impide que se forme la DNAzima. Cuando la secuencia blanco este presente se producirá la hibridización con la zona complementaria en la horquilla, lo cual permitirá que ésta se abra y con ello que se pueda formar la DNAzima. De esta manera, la DNAzima producirá la oxidación de un cromóforo (ABTS) en presencia de peróxido de hidrógeno (figura 3).

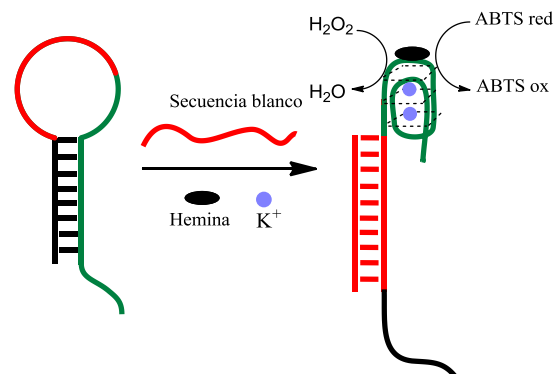


Figura 3. Representación esquemática del principio de funcionamiento del sensor.

En una primera instancia, pusimos a punto las condiciones óptimas para detectar ópticamente la actividad catalítica de la DNAzima con actividad peroxidasa. Se optimizaron el pH, la fuerza iónica, la dependencia frente a iones metálicos, la composición del buffer, la concentración del sustrato de la DNAzima (peróxido de hidrógeno) y la relación ADN-hemina⁶.

En una segunda instancia, diseñamos la secuencia de ADN que incluye la DNAzima propiamente dicha y otra secuencia que será complementaria a la que queremos detectar.

RESULTADOS

Se pusieron a punto las condiciones óptimas para medir la actividad catalítica de la DNAzima sin interferencia de la hemina libre.

Se calculó la velocidad inicial de reacción para la DNAzima y la hemina a partir de las curvas de absorbancia versus tiempo para distintas concentraciones de sustrato (peróxido de hidrógeno). Como se puede observar en la figura 4, la DNAzima presenta un comportamiento similar al de las enzimas proteicas, siguiendo una cinética de Michaelis-Menten, que describe el comportamiento de muchas reacciones enzimáticas.

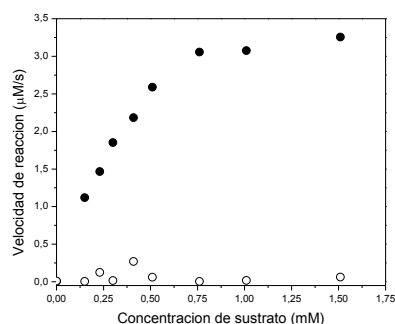


Figura 4. Velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato para la DNAzima (●) y la hemina (○), a 414 nm y 60 segundos de reacción. En buffer tris-HCl 100 mM pH 8, ADN 1 µM, hemina 2 µM, KCl 20 mM, triton x-100 0.05 % y ABTS 3.4 mM.

Se calcularon las constantes cinéticas K_M , k_{cat} y la eficiencia catalítica k_{cat}/K_M para la DNAzima. Se compararon estos resultados con los que presenta la enzima como la peroxidasa de rábano picante (tabla 1).

Tabla 1. Comparación con datos bibliográficos de los valores obtenidos de K_M y k_{cat} para la DNAzima.

	K_M /mM	k_{cat} /s ⁻¹	k_{cat}/K_M
DNAzima	0.5	30	60
DNAzima *	3.0	0.8	2
Peroxidasa de rábano picante*	0.3	200	670

(*) Datos de bibliografía⁶

Se probaron cuatro diseños de horquilla hasta lograr que la señal obtenida sea proporcional a la cantidad de secuencia blanco presente en la muestra (figura 5).

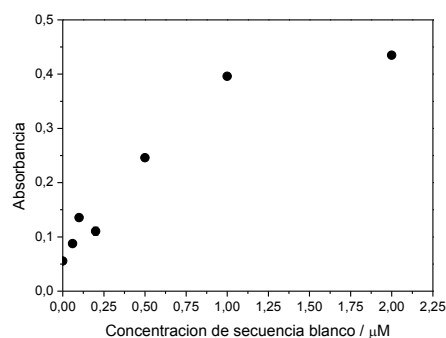


Figura 5. Variación de la absorbancia con la concentración de la secuencia blanco a 414 nm y 150 segundos de reacción. Para 0.5 µM de stem loop en buffer tris-HCl 25 mM pH 8, hemina 0.5 µM, KCl 20 mM, NaCl 200 mM, triton x-100 0.05%, ABTS 3.4 mM y H₂O₂ 0.5 mM.

CONCLUSIONES

En este trabajo logramos hacer uso de moléculas de ADN como elemento de reconocimiento y sensado. Pudimos detectar concentraciones de ADN de 50 nM, lo cual posibilita el desarrollo futuro de dispositivos ópticos sin la necesidad del agregado de marcadores externos.

BIBLIOGRAFIA

- Moina, C., Ybarra, G. "Fundamentals and applications of immunosensors" in "Advances in Immunoassay Technology", InTech, Zagreb, Croatia, (2012).
- Watterworth, L., Topp, E., Schraft, H. & Leung, K. T. Multiplex PCR-DNA probe assay for the detection of pathogenic Escherichia coli. *J. Microbiol. Methods* **60**, 93–105 (2005).
- Robaldo, L., Montserrat, J. M. & Iribarren, A. M. 10-23 DNAzyme modified with (2'R)- and (2'S)-2'-deoxy-2'-C-methyluridine in the catalytic core. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20**, 4367–70 (2010).
- Yaku H., Murashima T., Miyoshi D., Sugimoto N. Specific binding of anionic porphyrin and phthalocyanine to the G-Quadruplex. *Molecules* (2012).
- Kosman, J. & Juskowiak, B. Peroxidase-mimicking DNAzymes for biosensing applications: a review. *Anal. Chim. Acta* **707**, 7–17 (2011).
- Travascio P., Li Y., Sen D., DNA-enhanced peroxidase activity of DNA aptamer-Hemin complex. *Chemistry & Biology* **5**, 505-517 (1998).