

Selección e avaliación de aptámeros de alta especificidade para a detección de parvalbúmina-beta

Ana G. Abril^{1,2}, Rui Campos³, Lorena Barros², Pilar Calo-Mata⁴, Jorge Barros-Velázquez⁴, Manuel Pazos², Mónica Carrera², Marta Prado^{3,4}

¹Departamento de Microbioloxía e Parasitoloxía, Facultade de Farmacia, Universidade de Santiago de Compostela, España.

²Departamento de Tecnoloxía dos Alimentos, Instituto de Investigacións Mariñas (IIM-CSIC), Consello Superior de Investigacións Científicas (CSIC), España

³Grupo de Investigación en Calidade e Seguridade Alimentaria, Laboratorio Ibérico Internacional de Nanotecnoloxía (INL), Portugal

⁴Departamento de Química Analítica, Nutrición e Bromatoloxía, División de Tecnoloxía dos Alimentos, Facultade de Ciencias Veterinarias, Universidade de Santiago de Compostela, Campus Lugo, España

Introdución

A beta-parvalbúmina (β -PRVB) considérase o principal alérxeno do peixe. O constante aumento da prevalencia de alerxias alimentarias leva á necesidade urxente de mellores métodos de prevención, diagnóstico e tratamento destas alerxias. Recentemente, como alternativa aos anticorpos, o uso de aptámeros baseados en secuencias de ADN monocatenario como ligandos en biosensores destacou pola súa alta estabilidade, versatilidade e pequeno tamaño que permite unha inmovilización eficiente en diferentes substratos, factor moi importante para o desenvolvemento de sistemas miniaturizados, de baixo custo e fáciles de fabricar.

O obxectivo principal é o desenvolvemento dun nanosensor para a detección de β -PRVB en alimentos baseado na combinación de dispositivos microfluídicos sobre papel, tamén denominados μ PADs (Microfluidic Paper-based Analytical Device), e o uso de nanomateriais para promover a detección. Nesta primeira parte do traballo realízase o deseño, selección e avaliación de aptámeros específicos de β -PRVB e estudos de especificidade coa proteína.

Materiais e Métodos

Realízase o deseño de aptámeros con gran afinidade pola β -PRVB *in silico* na empresa *Dianox*. Dous deles foron seleccionados (APT1 e APT10) para realizar o estudo da interacción entre o aptámero e a proteína. Para este estudo tamén se seleccionou un aptámero (AP19) descrito anteriormente por Wang et al. (2020). Utilizáronse técnicas baseadas en electroquímica. Funcionalizáronse eléctrodos de ouro cunha monocapa de dodecanotiol (DDT) seguido da inmovilización da β -PRVB (Wadu-Mesthrige et al. 2000) e finalmente engadiuse o aptámero, e mediante o estudo da voltametría cíclica e da espectroscopía de impedancia electroquímica púidose determinar a interacción aptámero- β -PRVB.

Taboa 1. Características dos aptámeros seleccionados.

Aptámero	Tamaño (KD)	KD(Nm)	Orixen
Apt1	12,52	766	<i>in silico</i>
Apt10	12,08	13,42 (predictivo)	<i>in silico</i>
Apt19	12,41	13,42 (predictivo)	Wang et al (2020).

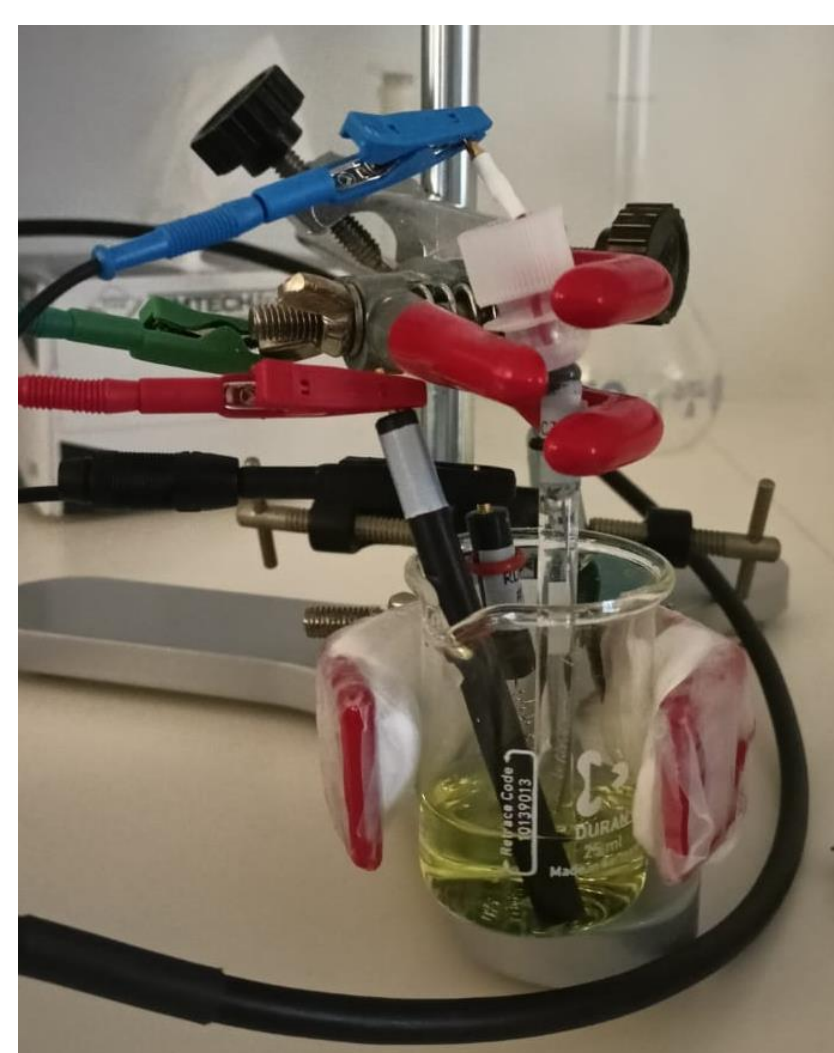


Figura 2. Instrumentación para electroquímica sobre electrodos de ouro.

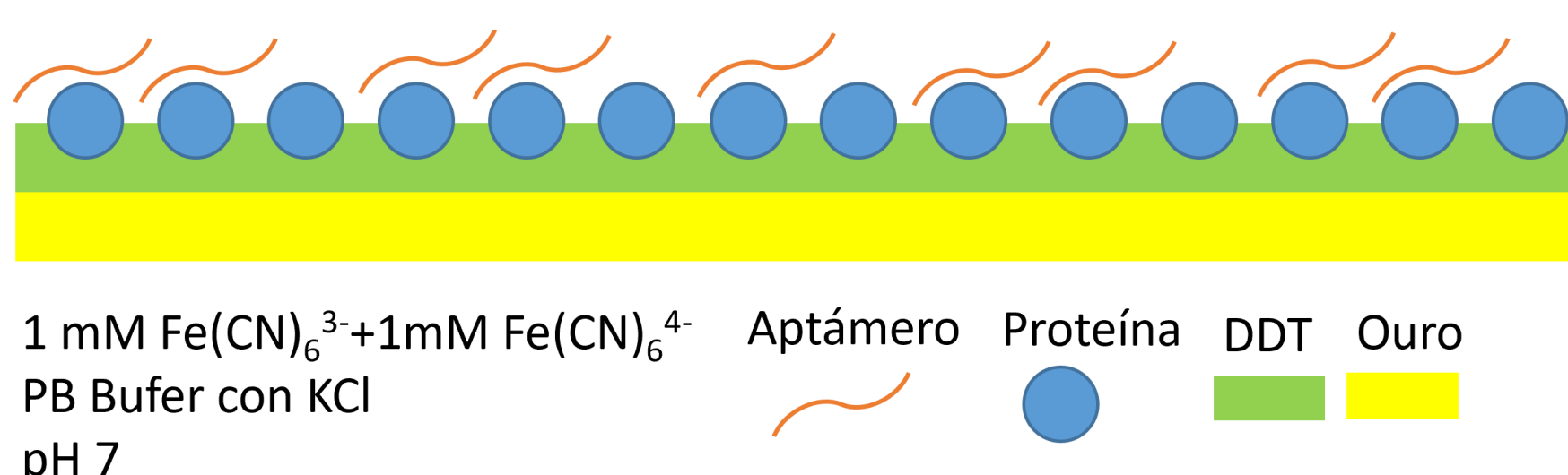


Figura 1. Representación gráfica da metodoloxía empregada sobre o eléctrodo de ouro.

Resultados

A través do estudo da voltametría cíclica e da espectroscopía de impedancia electroquímica, foi posible determinar a interacción aptámero- β -PRVB, o que suxire que o APT10 ten unha maior afinidade coa β -PRVB (Figura 3 e 4).

A voltametría cíclica (Figura 3) mostra que a corrente diminúe con cada un dos compoñentes do biosensor (DDT+ β -PRVB+APT10) debido ao crecente bloqueo da superficie do electrodo, o que significa que están interactuando entre si.

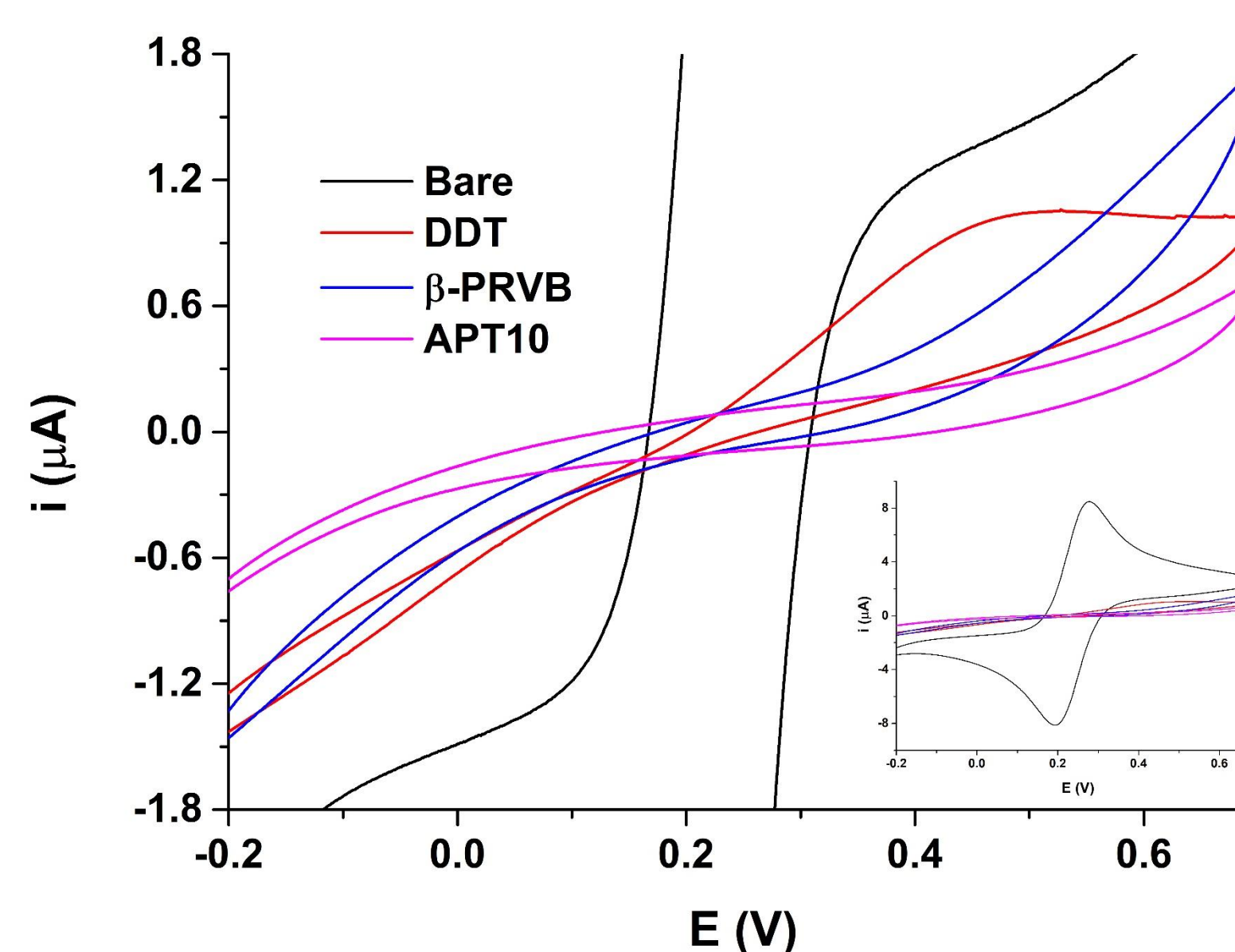


Figura 3. Voltamogramas cíclicos da β -PRVB inmovilizado (azul), sobre monocapa de DDT (vermello) nun electrodo de ouro, e despois da exposición do APT10 (rosa). As medicións realizáronse en 1 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ en tampón fosfato 150 mM.

Empregando espectroscopía de impedancia pódese ver que a resistencia de transferencia de carga (R_{ct}) aumenta a medida que se van sumando os diferentes compoñentes. Este aumento de R_{ct} suxire que a β -PRVB está inmovilizada na monocapa de DDT e que o APT10 é capaz de unirse a ela (Figura 4).

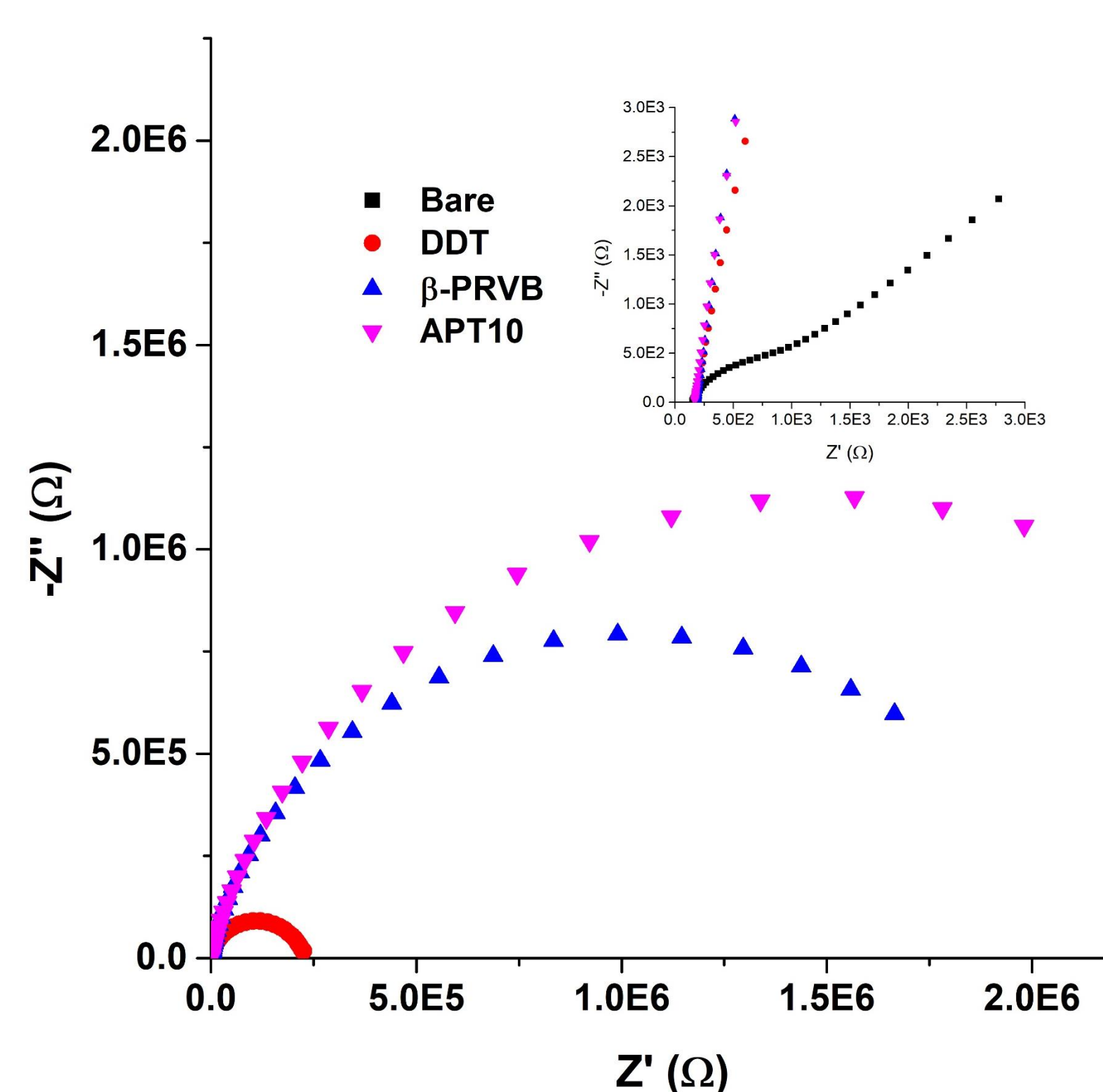


Figura 4. Gráfico de Nyquist para as diferentes condicións experimentais, desde o electrodo nu (gris) ata a adición do APT10 (rosa). Os datos experimentais equipáronse cun circuito equivalente de Randles para extraer o R_{ct} . O aumento da resistencia cando se engade o APT10 suxire a interacción entre β -PRVB e o APT. As medicións realizáronse en 1 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ en tampón fosfato 150 mM.

Conclusións

Os resultados obtidos e a selección do aptámero con maior afinidade polo β -PRVB poden permitir a futura fabricación dun dispositivo microfluídico baseado en papel, tamén chamado μ PADs

Referencias e Financiación

Wang, Y., Li, H., Zhou, J., Qi, Q., & Fu, L. (2020). A colorimetric and fluorescent gold nanoparticle-based dual-mode aptasensor for parvalbumin detection. *Microchemical Journal*, 159, 105413.

Wadu-Mesthrige, K., Amro, N. A., & Liu, G. Y. (2000). Immobilization of proteins on self-assembled monolayers. *Scanning*, 22(6), 380-388.

A.G.A. agradece á USC a bolsa postdoctoral "Convocatoria de Recualificación do Sistema Universitario Español-Margarita Salas" no marco do programa "Plan de Recuperación Transformación" financiada polo Ministerio de Universidades de España a través dos fondos NextGeneration EU da Unión Europea. Esta obra contou co apoio económico da Xunta de Galicia e da Unión Europea (Fondo Social Europeo 2013FSE), o Proxecto AGL 2.013-48.244-R do Ministerio de Economía e Competitividade e o Fondo Europeo de Desenvolvemento Rexional (FEDER) (2007-2013). Este estudo tamén foi financiado polo Proxecto GAIN-Xunta de Galicia (IN607D 2017/01) e o proxecto español AEI/EU-FEDER PID2019-103845RB-C21. Tamén contou co apoio do Plan Complementario en Ciencias Marinas (PCCM) financiado polo Ministerio de Ciencia e Innovación (Actividade 3.6.B. NANOSEAOMICS).