

DESARROLLO DE UN NUEVO SISTEMA DE  
DETECCIÓN DE *KARLODINIUM ARMIGER* MEDIANTE  
UN *ENZYME-LINKED OLIGONUCLEOTIDE*  
ASSAY BASADO EN POLILISINA

**Iván Vera Gómez**



Trabajo de Fin de Grado

Grado de Biotecnología

Tutor académico: Lluís Masip Vernis

Tutor profesional: Ioanis Katakis

17/06/2019 Tarragona

## Índice

1. Datos del centro.....	3
2. Resumen.....	4
3. Introducción .....	5
3.1. Floración de algas nocivas. <i>Karlodinium armiger</i> .....	5
3.2. Dispositivos ASSURED.....	6
3.3. Recombynase Polymerase Amplification (RPA) .....	7
3.4. RPA-ELONA.....	9
3.5. ELONA-PLL.....	10
4. Objetivos .....	12
5. Materiales y métodos.....	13
5.1. Reactivos y materiales .....	13
5.2. Recombinase polymerase amplification (RPA) .....	14
5.3. Purificación de los productos de RPA .....	14
5.4. Detección de los productos de RPA mediante electroforesis en gel.....	15
5.5. Enzyme linked oligonucleotide assay (ELONA) en placas de maleimida .....	15
5.5.1. Funcionalización de las placas .....	15
5.5.2. Detección de secuencias de Poli T/Poli A .....	15
5.5.3. Detección de productos de RPA (RPA-ELONA).....	16
5.6. <i>Enzyme linked oligonucleotide assay</i> en placas de polilisina (ELONA-PLL) .	16
5.6.1. Funcionalización de las placas .....	16
5.6.2. Exclusión de la interacción electrostática .....	17
5.6.3. Detección de secuencias de Poli T/Poli A .....	17
5.6.4. Detección de productos de RPA (RPA-ELONA-PLL).....	17
5.7. Análisis de datos .....	18

6. Resultados y discusión.....	19
6.1. Optimización del sistema ELONA-PLL .....	19
6.1.1. Verificación del sistema ELONA en placas de maleimida .....	20
6.1.2. Optimización de la concentración de PLL.....	21
6.1.3. Optimización de la concentración de PEGDE .....	22
6.1.4. Optimización de la concentración de DNA <i>Capture Probe</i> .....	23
6.1.5. Exclusión de la interacción electrostática .....	24
6.1.6 Prueba de concepto .....	25
6.2. Detección de <i>K. armiger</i> vía RPA-ELONA .....	26
6.2.1. Detección ELONA-Maleimida.....	26
6.2.2 Detección mediante RPA-ELONA-PLL.....	28
6.2.3. Rastreo de sustancias bloqueadoras para evitar absorción no específica	30
6.2.4. Comparación de RPA-ELONA en placas con PLL y con Maleimida. ....	31
7. Conclusiones .....	32
8. Bibliografía.....	33
9. Autoevaluación.....	35

## 1. Datos del centro

Las prácticas a partir de las cuales se ha realizado este trabajo se han realizado en la Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Química (ETSEQ) de la Universitat Rovira i Virgili (URV). El grupo de investigación donde se realizó el trabajo es *Interfibio*, donde fue supervisado por el Dr. Ioanis Katakis.

## 2. Resumen

*Karlodinium armiger* es una microalga tóxica que genera un fuerte impacto en muchos ambientes marinos. Por este motivo, es necesario un método de detección de esta microalga. Aunque existen métodos de detección en laboratorio, estos son muy costosos y necesitan personal especializado. Para una rápida detección que se pueda llevar a cabo en cualquier lugar, es necesario el desarrollo de un biosensor ASSURED (*Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid and Robust, Equipment free, Deliverable to all end-users*). Para desarrollar este biosensor es necesario establecer un sistema de detección estándar en que basar los estudios. Hasta ahora, se está trabajando con sistemas de detección colorimétricos como RPA-ELONA. Sin embargo, los ensayos ELONA actuales se realizan en placas activadas con Maleimida, lo que supone un gasto más grande y una manipulación compleja. Por este motivo, este trabajo se centra en el desarrollo de un sistema de detección RPA-ELONA basado en el uso de polilisina. Este nuevo sistema, sería más económico, por el precio de las placas y de los reactivos que se necesitan. Los resultados obtenidos muestran que este sistema permite una detección de *K. armiger* con una sensibilidad muy cercana a la de los ensayos ELONA en placas de maleimida. Por tanto, este sistema de detección es muy prometedor. Sin embargo, posteriores estudios podrían optimizar este sistema haciéndolo más sensible.

Palabras clave:

ASSURED, RPA, PLL, ELONA, Maleimida, *Karlodinium armiger*,

### 3. Introducción

#### 3.1. Floración de algas nocivas. *Karlodinium armiger*.

Muchas de las zonas marítimas del mundo son afectadas por la floración de algas nocivas, fenómeno comúnmente conocido como “marea roja”. No obstante, no todas las algas nocivas producen esta coloración y es difícil identificar si las aguas se encuentran contaminadas (Anderson et al., 2012). Estas algas generan un gran impacto en los ecosistemas que infectan, ya que producen una serie de toxinas que causan la muerte de la mayor parte de los peces. En consecuencia, esto puede influir a la salud de las personas, que podrían enfermar al ingerir peces infectados.

Entre las algas marinas que más se han relacionado con este fenómeno, destacan las del género *Karlodinium*. Estas son unas microalgas que producen una serie de compuestos nocivos llamados karlotoxinas (Place et al., 2014). Actualmente, se ha aislado en el mar Mediterráneo una nueva especie de *Karlodinium*, *K armiger*. *K. armiger* produce la karmitoxina, molécula que resulta tóxica para los peces, cuya estructura se ha caracterizado recientemente (Rasmussen et al., 2017).

En los últimos años se están optimizando las técnicas moleculares conocidas; como FISH (Fluorescence In-Situ Hybridization), SHA (Sandwich Hybridization Assay), microarrays y PCR cuantitativa; para su aplicación en la identificación, detección y cuantificación de estas microalgas tóxicas (Medlin et al., 2017). Entre estos métodos, el que más destaca para la identificación de *Karlodinium* es la PCR cuantitativa (Zhang et al., 2008). Sin embargo, estos métodos requieren el uso de instrumentos costosos y en ocasiones, de personal especializado. Esto supone un problema para llevar a cabo una detección rápida en el propio terreno, en lugar de en un laboratorio, o para países subdesarrollados donde no tienen los recursos para llevar a cabo dichas técnicas. Por este motivo, es necesario el desarrollo de dispositivos ASSURED (*Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid and Robust, Equipment free, Deliverable to all end-users*) para la detección de estas microalgas (McPartlin et al., 2017).

### 3.2. Dispositivos ASSURED

La Organización Mundial de la Salud (OMS) advierte del aumento de la mortalidad debida a infecciones microbianas. Si bien este hecho afecta a nivel mundial, su efecto es aún más notable en África, donde se encuentra la mayor parte de países subdesarrollados (WHO, 2019). Los motivos por los que estos países se encuentran tan afectados por las infecciones son muchos: la falta de seguridad alimentaria, la escasez de recursos sanitarios para el tratamiento, y la demora en la detección de dichas infecciones son algunas de las principales razones. Esto es debido a que, a menudo, los ensayos biomoleculares necesarios para la detección de los patógenos pueden resultar muy caros y laboriosos. Además, frecuentemente necesitan del uso de una maquinaria y personal especializado no disponible en los países subdesarrollados. Por este motivo, actualmente se están desarrollando biosensores considerados ASSURED (*Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid and Robust, Equipment free, Deliverable to all end-users*)(Smith et al., 2018).

Los biosensores ASSURED son dispositivos simples y económicos, que reúnen todos los componentes para analizar una muestra, procesar los datos obtenidos y dar un resultado fiable. Para ello se pueden combinar distintos métodos de tratado de muestra, detección, análisis y demás factores, que darán lugar a distintos tipos de biosensores. (Figura 1).



**Figura 1.** Gráfico de las funcionalidades que puede tener un dispositivo ASSURED (Smith, Korvink, Mager, & Land, 2018).

Muchas de las técnicas de detección de microalgas como *K. armiger* se basan en la amplificación y detección de ADN. En estos casos, los dispositivos ASSURED por los que más se apuesta son dispositivos microfluídicos basados en papel con sensores electroquímicos (Mahato et al., 2017).

### 3. 3. Recombinase Polymerase Amplification (RPA)

La amplificación del ADN es un paso clave para la detección de este. Para llevar a cabo dicha amplificación el método más conocido y usado es la PCR. Sin embargo, esta es una técnica que requiere el uso de un termociclador debido a los cambios de temperatura necesarios para llevar a cabo la amplificación (Figura 2). Esto supone un inconveniente para el desarrollo de un dispositivo ASSURED. Por este motivo, una posibilidad para evitar el uso de un termociclador es emplear un método de amplificación isotérmica de ADN. Existen múltiples métodos de amplificación

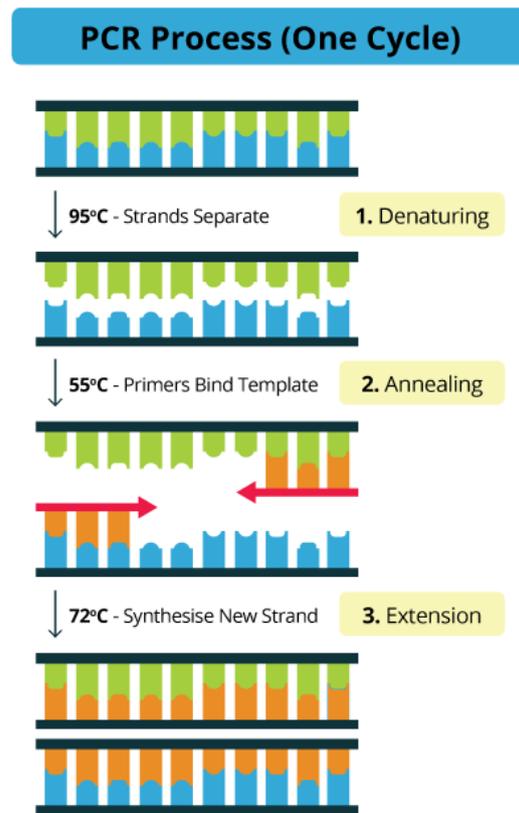
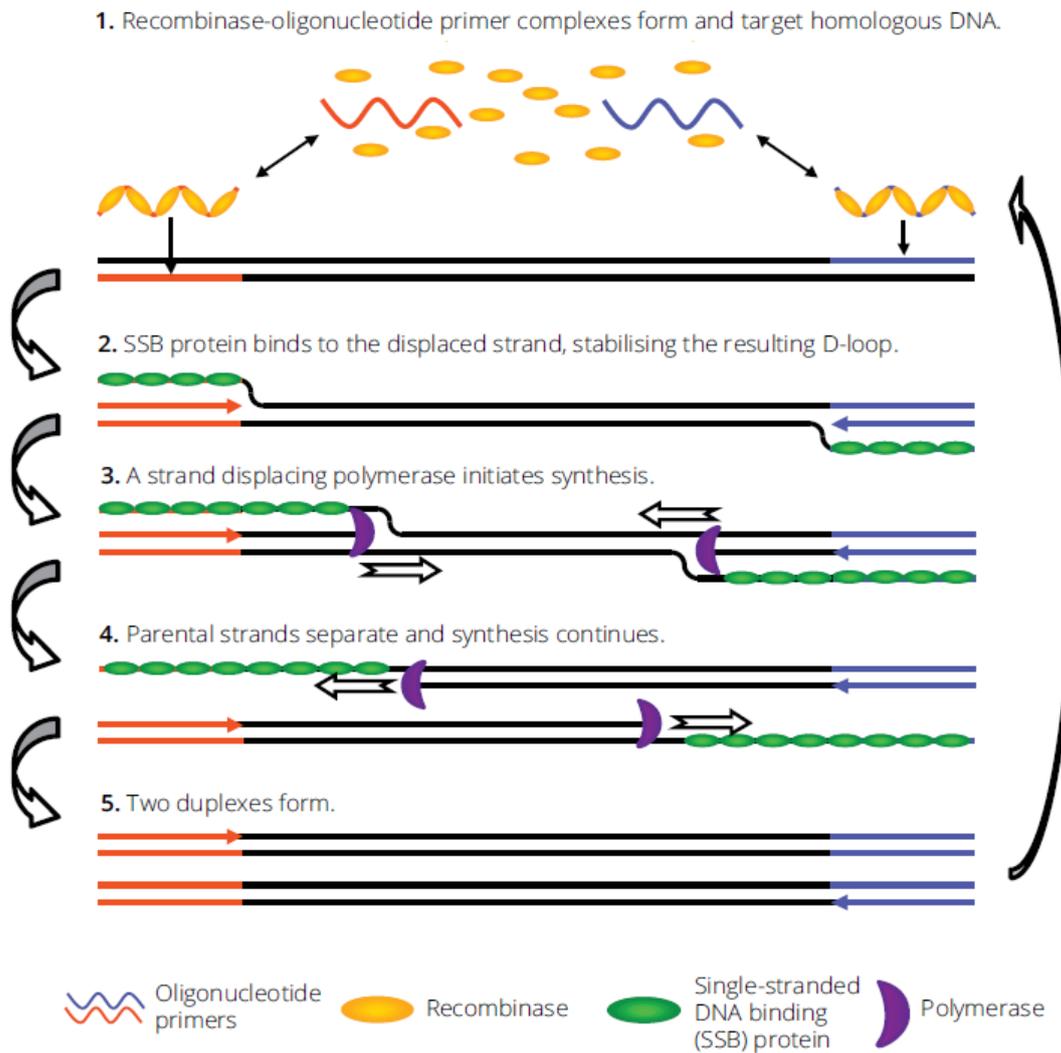


Figura 2. Descripción gráfica de un ciclo de PCR. (Bosterbio, 2018)

isotérmica; como *Nucleic Acid Sequence-Based Amplification* (NASBA), *Helicase-Dependent Amplification* (HDA), *Loop-Mediated Isothermal Amplification* (LAMP) o *Recombinase polymerase amplification* (RPA) (Zhao et al., 2015). Sin embargo, en el caso de LAMP se necesitan unos *primers* con un diseño muy meticuloso, y la temperatura óptima de HDA y NASBA es alrededor de 65°C. Por este motivo, ninguno de estos métodos se adecua a la función que debe desarrollar el biosensor. La *Recombinase polymerase amplification* (RPA) es una buena alternativa y se decide trabajar con esta técnica.

En la amplificación mediante RPA el termociclador que se usa en la PCR es substituido por tres enzimas que actúan entre los 37°C y los 42°C. Inicialmente, una recombinasa se une a los *primers* que pueden recombinarse con el ADN homólogo, desplazando la otra ebra de ADN y formando un *D-loop*. Seguidamente, las SSB, se unen a la cadena de ADN desplazada para estabilizarla. Finalmente una ADN-polimerasa se encarga de llevar a cabo la extensión de la cadena (Figura 3)(*TwistAmp @ Liquid DNA Amplification Kits Combined Instruction Manual, 2018*)

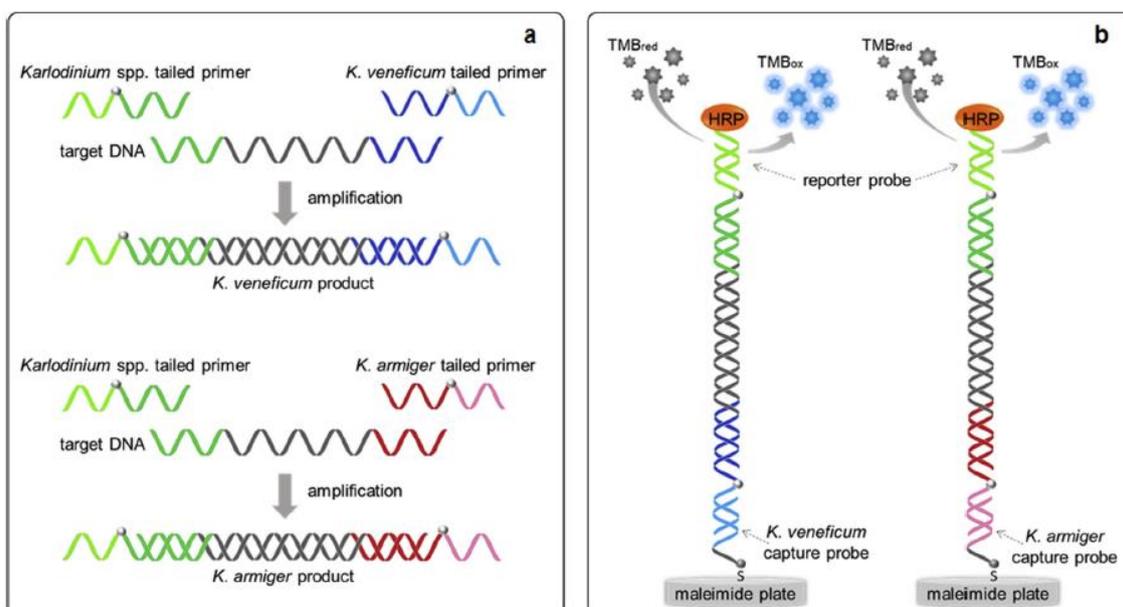


**Figura 3.** Descripción gráfica de un ciclo de RPA. (TwistAmp ® Liquid DNA Amplification Kits Combined Instruction Manual, 2018)

### 3.4. RPA-ELONA

El primer paso para el desarrollo de un biosensor ASSURED es establecer un sistema de detección de ADN que sirva como estándar para poder optimizar los resultados en el nuevo dispositivo. Para ello se emplea un método colorimétrico, *enzyme-linked oligonucleotide assay* (ELONA) tipo sándwich usando oligonucleótidos complementarios a los productos de RPA obtenidos.

Para poder realizar este ELONA, se realiza una modificación en la amplificación por RPA, utilizando *primers* con cola, que dará lugar a productos de RPA con esa misma cola (Figura 4 a). Estos *primers* contienen un espaciador entre el *primer* y la cola, esto hace que la RPA se detenga al llegar al espaciador y queden los productos con una cola ssDNA en 5' y otra en 3'. Esta cola de los *primers* es complementaria, en el caso del FwP, a un *Capture Probe* de *Karlodinium* inmovilizado mediante un grupo tiol a placas de maleimida; y en el RevP a un *reporter probe* conjugado con *horseradish peroxidase* HRP (Figura 4 b) (Toldrà et al., 2018). La HRP es una enzima que cataliza la oxidación de la TMB utilizando peróxido de hidrógeno. La TMB al oxidarse adquiere



**Figura 4.** Representación esquemática del RPA-ELONA para *K. veneticum* y *K. armiger*: (a) RPA con primers con cola (b) Detección ELONA. (Toldrà et al., 2018).

una coloración azul, lo que permite leer la absorbancia, que será proporcional a la cantidad de DNA presente.

Este método permite detectar y cuantificar la presencia de *K. armiger* en una muestra. Sin embargo, se utilizan placas de maleimida. Esto vuelve al método algo más costoso y complejo por distintos motivos:

1. Las placas activadas con maleimida tienen un coste más elevado que otro tipo de placas sin activar.
2. Se necesita más de una sustancia bloqueadora para evitar falsos positivos.
3. Necesita ser lavado con diferentes soluciones tampones para no dañar los tioles.

Por este motivo, el desarrollo de un nuevo sistema ELONA puede ser útil para estudios de detección de DNA.

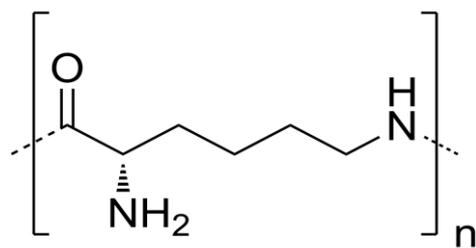
### 3.5. ELONA-PLL

Dada la necesidad de desarrollar un nuevo sistema basado en ELONA como alternativa al realizado en placas de maleimida, en este trabajo se trabaja la idea de realizar un ensayo ELONA con polilisina (PLL). Si en las placas de maleimida la función de la maleimida es la de fijar el *Capture probe* a las placas, en un sistema ELONA-PLL ese papel lo tendría la PLL.

La PLL es un polipéptido de lisina. Este polímero presenta carga positiva por los grupos amino de la lisina (Figura 5). Esto le proporciona una fuerte interacción electrostática con moléculas como el DNA que presentan carga negativa. Por este motivo, actualmente la PLL está siendo estudiada y utilizada como *Carrier* de genes

(Alipour et al., 2019), entre otras aplicaciones. Sin embargo, no se documenta ningún estudio para la utilización de PLL como fijador de DNA para ensayos como ELONA.

La idea del sistema ELONA-PLL es simple. La PLL se adhiere a una placa mediante un proceso de adsorción formando un hidrogel con carga positiva que interaccionará con



**Figura 5.** Estructura química de Poli-L-lisina

los DNA *Capture probes*. El resto del ensayo ELONA seguirá el procedimiento ya descrito en el apartado 3.4.

Sin embargo, dado que esta interacción electrostática puede resultar inestable, se plantea el uso de un *cross-linker*. Para ello se utilizará Polietilenglicol diglicidil éter (PEGDE) (Figura 6). Este

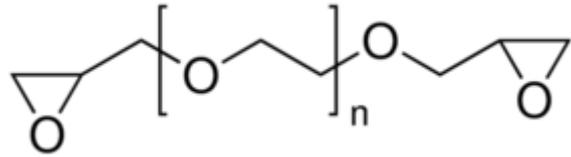


Figura 6. Estructura química del PEGDE

compuesto es altamente reactivo con los grupos aminos y enlazará el oxígeno de uno de los extremos con el grupo amino de la PLL. El otro extremo se enlazará con el grupo amino de los *DNA Capture Probes*, que habrán sido modificados con esta finalidad. Estos tres compuestos (DNA, PLL y PEGDE) funcionalizarán la placa en un único paso de adsorción, sirviendo así, como base de un nuevo sistema ELONA más económico y más simple debido a que no necesitará tampones para el lavado, este realizará con agua, y no necesitará dos pasos de bloqueo. El funcionamiento del sistema ELONA-PLL se muestra gráficamente en la Figura 7.

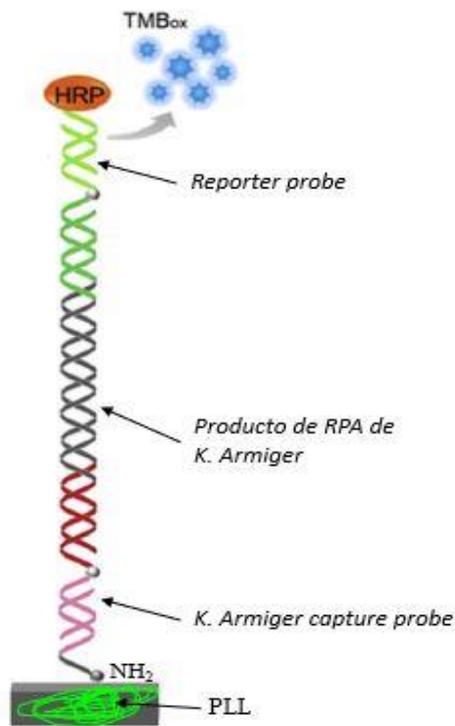


Figura 7. Representación esquemática del sistema ELONA-PLL.

## 4. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es el desarrollo de un nuevo sistema de detección de *K. armiger* basado en ELONA utilizando polilisina (PLL) como fijador de DNA a las placas.

Para lograr este objetivo principal se han planteado diferentes tareas:

- Optimización del sistema ELONA-PLL con secuencias Poli T
- Optimización del sistema RPA-ELONA-PLL para la detección de *K. armiger* y comparación con el sistema en placas de maleimida.

## 5. Materiales y métodos

### 5.1. Reactivos y materiales

Polyvinylpyrrolidone cross-linked, Phosphate buffered saline (50 mM) pH 7.4 (PBS), Phosphate buffered saline (50 mM) pH 7.4 (PBS) con 0.05% (v/v) de Tween 20 (PBS-Tween), 6 mercapto-1-hexanol (MCH) y 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina (TMB) fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Madrid, España). Las placas activadas Pierce™ Maleimide (con unión de sulfhidrilos) de 96 pocillos y placas Nunc™ de 384 pocillos fueron adquiridas por ThermoFisher-Scientific (Madrid, España). El ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y Cloruro sódico (NaCl) fueron suministrados por Scharlau (Barcelona, España). Polietilenglicol 200 diglicidil éter (PEGDE) fue comprado a Polysciences, Inc. (Heidelberg, Alemania). El polímero de Hidrobromuro de poli-L-lisina (PLL) (4 KDa) fue suministrado por Alamanda (Alabama, EE. UU.). Polietilenglicol 400 (PEG) y Skim Milk Powder fueron suministrados por Honeywell Fluka™. Agarose broad separation range for DNA/RNA, Genetic Analysis Grade fue suministrado por Fisher Bioreagents. Gel-red fue suministrado por Biotium. TwistAmp® Basic Kit se adquirió a TwistDx (Cambridge, Inglaterra). El kit de purificación DNA Clean & Concentrator-5 fue suministrado por Zymo Research.

Finalmente, todas las secuencias de oligonucleótidos fueron sintetizadas por Biomers (Ulm, Alemania). Las secuencias de oligonucleótidos utilizadas en este trabajo se muestran detalladas en la Tabla 1. Las modificaciones de oligonucleótidos (como la conjugación del *Reporter probe* con HRP o los *Capture Probe* modificados con algún

Nombre	Secuencia 5'-3'
<i>K. armiger thiolated capture probe</i>	ttc att gag ttc gtc gta at ttt ttt ttt ttt ttt-C6 tiol
<i>K. armiger aminated capture probe</i>	ttc att gag ttc gtc gta at ttt ttt ttt ttt ttt-C6 amino
<i>K. armiger Forward Primer (FwP)</i>	att acg acg aac tca atg aa-C3-ata gct tca cag cag agg tta caa c
<i>K. armiger Reverse Primer (RvP)</i>	tgt aaa acg acg gcc agt-C3-aca cac atc caa cca tyt cac tg
<i>Reporter probe</i>	HRP-act ggc cgt cgt ttt aca
<i>K. armiger ssDNA</i>	ata gct tca cag cag agg tta caa cac caa tgc tgc tcc gct acc cgc gat ctc atg cac cag gga gcg gca aga agc cag agc ttc aag aca ccc cta ccc ccg tgc agg agc tca caa aga aag ttc aca gtg aga tgg ttg gat gtg tgt

**Tabla 1.** Listado de las secuencias de oligonucleótidos utilizados.

grupo funcional, o los *primers* interespaciados) fueron realizadas directamente por Biomers (Ulm, Alemania). “C3” y “C6” hacen referencia al número de repeticiones de (CH<sub>2</sub>) del espaciador, es decir, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub> (C3) y (CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (C6).

## 5.2. Recombinase polymerase amplification (RPA)

La RPA se llevó a cabo siguiendo las indicaciones del kit de amplificación TwistAmp Basic salvo alguna modificación. Cada reacción RPA contenía 2.4 µL de FwP y RevP con una concentración 10 µM, 29.5 µL de 1x *rehydration Buffer*, 2 µL de dsDNA molde 10 nM (H<sub>2</sub>O en el caso del control negativo), 11 µL de H<sub>2</sub>O, un pellet liofilizado con las enzimas necesarias para llevar a cabo la reacción y los dNTPs y 2.5 µL MgAc 280 mM; constituyendo un volumen final de 50 µL en un tubo eppendorf de 0,2 mL. Posteriormente los tubos eppendorf se introdujeron en un T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad, California, EE. UU.) durante 40 minutos a 40°C. La amplificación se lleva a cabo a 40°C dado que el objetivo final del proyecto requerirá la amplificación del material genético en climas calurosos de muchos de los países africanos subdesarrollados.

## 5.3. Purificación de los productos de RPA

La purificación de los productos de RPA se realizó mediante el kit DNA Clean & Concentrator-5. Inicialmente se añade *Binding Buffer* a los productos de RPA en relación 5:1, se transfieren a una columna de purificación y se centrifugan durante 90s a 10000 rpm. Posteriormente se lavan las columnas dos veces con 200 µL de *Washing Buffer* y centrifugando de la misma forma. Acto seguido se incuba la columna durante 2 minutos con *Elution Buffer*, 90% del volumen de productos finales (dependerá de la cantidad de productos necesarios para el experimento, teniendo en cuenta después el factor de dilución correspondiente). Finalmente se centrifuga nuevamente en las mismas condiciones y a los productos eluidos se les añade un 10% PBS-10X del volumen final deseado.

## 5.4. Detección de los productos de RPA mediante electroforesis en gel

Para verificar una correcta amplificación, se detectan los productos de RPA mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 2%, a 110 V durante 30 minutos. Al gel se le ha añadido Gel-Red como agente intercalante de ADN para su detección.

## 5.5. Enzyme linked oligonucleotide assay (ELONA) en placas de maleimida

### 5.5.1. Funcionalización de las placas

Para funcionalizar las placas Pierce™ Maleimide se replica la metodología utilizada por (Toldrà et al., 2018). Los pocillos se lavaron tres veces con 200  $\mu$ L de PBS-Tween. A continuación, se transfiere a cada pocillo 50  $\mu$ L de *thiolated capture probe* 500 nM diluido en PBS (o secuencias de Poly T/Poly A, a determinar según el experimento) y se incuba por 24 horas a 4°C. Posteriormente se lavan los pocillos tres veces con 200  $\mu$ L de PBS-Tween y se añade a cada uno 200  $\mu$ L de MCH 100 $\mu$ M diluido en PBS para bloquear la placa. Se deja incubar durante 30 min a 350 rpm y temperatura ambiente. Acto seguido, se lavan los pocillos tres veces con 200  $\mu$ L de PBS-Tween y se añade a cada uno 200  $\mu$ L de Skim Milk Powder al 5% en PBS como segundo bloqueador de la placa. Posteriormente se lavan los pocillos tres veces con 200  $\mu$ L de PBS-Tween.

### 5.5.2. Detección de secuencias de Poli T/Poli A

Para comprobar una correcta optimización del proceso de funcionalización se realizó un experimento anclando a los pocillos secuencias de Poli T-C6 tiol, usando Poli-A-C6 tiol como control negativo. Para la detección de estas secuencias se realiza un ELONA directo usando Poli-A HRP como *reporter*.

Una vez funcionalizadas las placas se transfiere a cada pocillo 50  $\mu$ L de Poli-A-HRP 20 nM y se dejan hibridar durante 30min a temperatura ambiente y 350 rpm. Se lavan tres veces los pocillos con 200  $\mu$ L de PBS-Tween. Posteriormente se añade a cada pocillo 50  $\mu$ L de TMB y se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos a 350 rpm. Finalmente se detiene la reacción añadiendo 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se lee la absorbancia a 450nm.

### 5.5.3. Detección de productos de RPA (RPA-ELONA)

Para la detección de los productos de RPA se realizó un Sándwich-ELONA.

Después de la amplificación mediante RPA y la funcionalización de las placas de maleimida, se transfiere 50  $\mu\text{L}$  de los productos diluidos a cada pocillo y se dejan hibridar durante 30 minutos a temperatura ambiente y 350 rpm. Posteriormente se lavan tres veces con PBS-Tween. A continuación, se añade a cada pocillo 50  $\mu\text{L}$  de *reporter probe* 20 nM durante 30 minutos a temperatura ambiente y 350 rpm. Se lavan tres veces los pocillos con 200  $\mu\text{L}$  de PBS-Tween. Posteriormente se añade a cada pocillo 50  $\mu\text{L}$  de TMB y se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos a 350 rpm. Finalmente se detiene la reacción añadiendo 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y se lee la absorbancia a 450 nm.

## 5.6. Enzyme linked oligonucleotide assay en placas de polilisina (ELONA-PLL)

### 5.6.1. Funcionalización de las placas

Para la funcionalización de las placas Nunc<sup>TM</sup> se añade a cada pocillo 3  $\mu\text{L}$  de PLL 4KDa (la concentración se optimizará a lo largo del proceso, realizando ensayos con PLL en un rango de 0.05mM-0,5mM) , 3  $\mu\text{L}$  de PEGDE como *cross-linker* (la concentración se optimizará durante el proceso en un rango de 0-0.5mM) and 3  $\mu\text{L}$  de *aminated capture probe* (la concentración se optimizará durante el proceso en un rango de 0-100  $\mu\text{M}$ ). Después, las placas se dejan durante 24h en un desecador a temperatura ambiente. Posteriormente se lava tres veces con agua destilada (siempre que se lava con agua destilada se usan 50  $\mu\text{L}$  de esta en cada pocillo).

En algunos casos para finalizar la funcionalización se realiza un bloqueo. Para ello se usan diferentes sustancias bloqueadoras que se detallarán en el experimento pertinente. Estas soluciones bloqueadoras se incuban durante 1 hora. Posteriormente se lavan con agua destilada tres veces.

### 5.6.2. Exclusión de la interacción electrostática

Para excluir toda interacción electrostática, una vez funcionalizada la placa y antes de la detección, se añade a cada pocillo 8  $\mu\text{L}$  de NaOH 100 mM. Este se mantiene durante 90 segundos y acto seguido se lava con agua destilada 3 veces.

### 5.6.3. Detección de secuencias de Poli T/Poli A

Para optimización del sistema ELONA-PLL se realizaron varios experimentos anclando a los pocillos secuencias de Poli T-NH<sub>2</sub>, usando Poli-A-NH<sub>2</sub> como control negativo. Para la detección de estas secuencias se realiza un ELONA directo usando Poli-A HRP como *reporter*.

Una vez funcionalizadas las placas se transfiere a cada pocillo 8  $\mu\text{L}$  de Poli-A-HRP 20 nM y se dejan hibridar durante 30 min a temperatura ambiente y 350 rpm. Se lavan tres veces los pocillos con agua destilada. Posteriormente se añade a cada pocillo 8  $\mu\text{L}$  de TMB y se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos a 350rpm. Finalmente se detiene la reacción añadiendo 8  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se lee la absorbancia a 450nm.

### 5.6.4. Detección de productos de RPA (RPA-ELONA-PLL)

Para la detección de los productos de RPA se realizó un sándwich-ELONA.

Después de la amplificación mediante RPA y la funcionalización de las placas, se transfiere 8  $\mu\text{L}$  de los productos de RPA a cada pocillo y se dejan hibridar durante 30 minutos a temperatura ambiente y 350 rpm. Posteriormente se lavan tres veces con agua destilada. A continuación, se transfiere a cada pocillo 8  $\mu\text{L}$  de *reporter probe* 20 nM durante 30 minutos a temperatura ambiente y 350 rpm. Se lavan tres veces los pocillos con agua destilada. Posteriormente se añade a cada pocillo 8  $\mu\text{L}$  de TMB y se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos a 350 rpm. Finalmente se detiene la reacción añadiendo 8  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se lee la absorbancia a 450 nm.

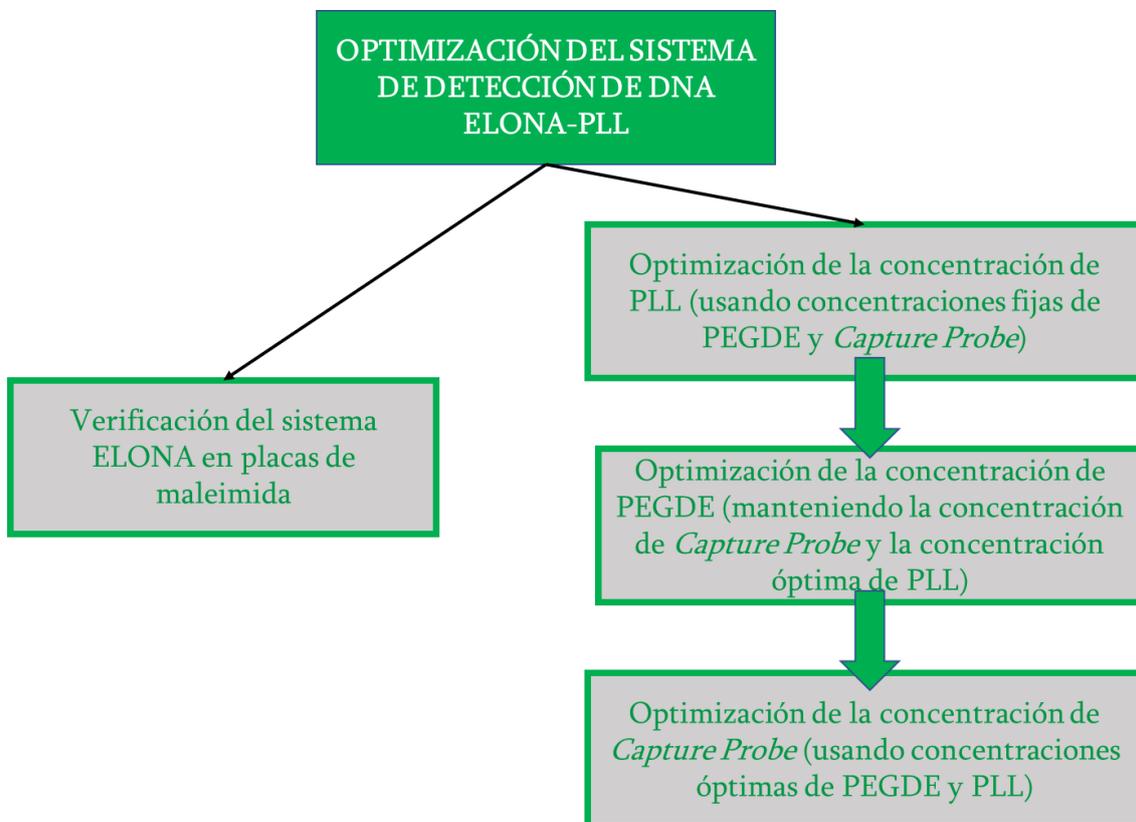
## 5.7. Análisis de datos

Todos los experimentos constaron de 3 réplicas. De los datos obtenidos se calculó el promedio y su desviación estándar. Todos los gráficos obtenidos a partir de los datos se realizaron con Microsoft Excel.

## 6. Resultados y discusión

### 6.1. Optimización del sistema ELONA-PLL

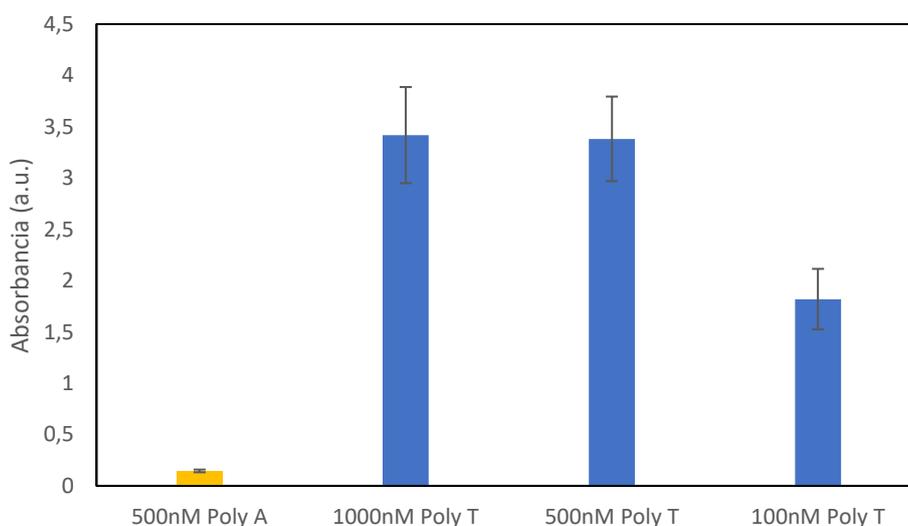
El primer paso en el diseño del nuevo sistema de detección de ADN, basado en la funcionalización de placas de ELONA con PLL, fue obtener una prueba de concepto (PoC). Una PoC es la verificación de que una idea, método o similar realmente funciona como debería y se puede, en consecuencia, implementar. Para ello, se realiza un diseño experimental con el fin de optimizar las concentraciones de PLL, PEGDE y *Capture probe* para la funcionalización de las placas (Figura 8). Para estos experimentos se trabajará con secuencias de Poli T como *Capture probe*, y *Poli A Capture probe* como control negativo, ya que son más económicas e igualmente eficaces para la realización del PoC. Todos los resultados obtenidos se compararan con aquellos que se obtienen usando el sistema ELONA en placas de maleimida desarrollado por (Toldrà et al., 2018).



**Figura 8.** Diagrama de flujo del proceso de optimización del sistema ELONA-PLL

### 6.1.1. Verificación del sistema ELONA en placas de maleimida

Según los ensayos realizados por (Toldrà et al., 2018), la concentración óptima de *Capture probe* en placas de maleimida es 500nM. No obstante, se realiza un experimento para verificar la correcta optimización de este sistema. Para ello se funcionalizan las placas con diferentes concentraciones de Poli T (1000nM, 500nM, 100nM) y usando Poli A 500nM como control negativo. Las absorbancias obtenidas se muestran en la Figura 9.

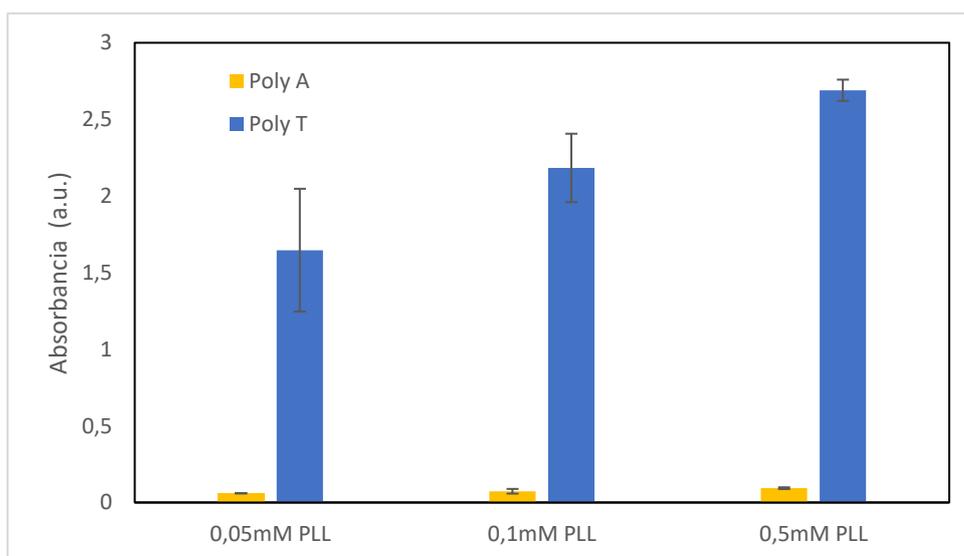


**Figura 9.** Resultados de ELONA-Maleimida para la verificación de la concentración óptima de *Capture probe*.

Los resultados obtenidos coinciden con lo esperado, ya que al alcanzar la concentración de 500nM la absorbancia llega a su nivel más alto, con una ratio positivo/negativo de 22. A partir de esa concentración de *Capture probe* las placas quedan saturadas y por tanto, ni la absorbancia, ni la ratio aumentan. Por tanto, se verifica que la concentración óptima de *Capture probe* es 500nM.

### 6.1.2. Optimización de la concentración de PLL

Inicialmente, se debe determinar la concentración óptima de PLL en las placas. Para ello, se funcionaliza la placa usando distintas concentraciones de PLL (0.05mM, 0.1mM y 0.5mM) y manteniendo fijas las concentraciones de PEGDE (0.25mM) y *Poli T-Capture probe* (100 $\mu$ M). Las absorbancias se muestran en la Figura 10. Los resultados obtenidos indican que a mayor concentración de PLL mayor absorbancia. No obstante, aumenta también la absorción no específica, creciendo así la absorción del control negativo, y obteniendo en todas las concentraciones la misma ratio Poli T/Poli A de aproximadamente 18. Esto puede deberse a la naturaleza iónica del PLL. Un aumento de su concentración podría favorecer a las interacciones electrostáticas.

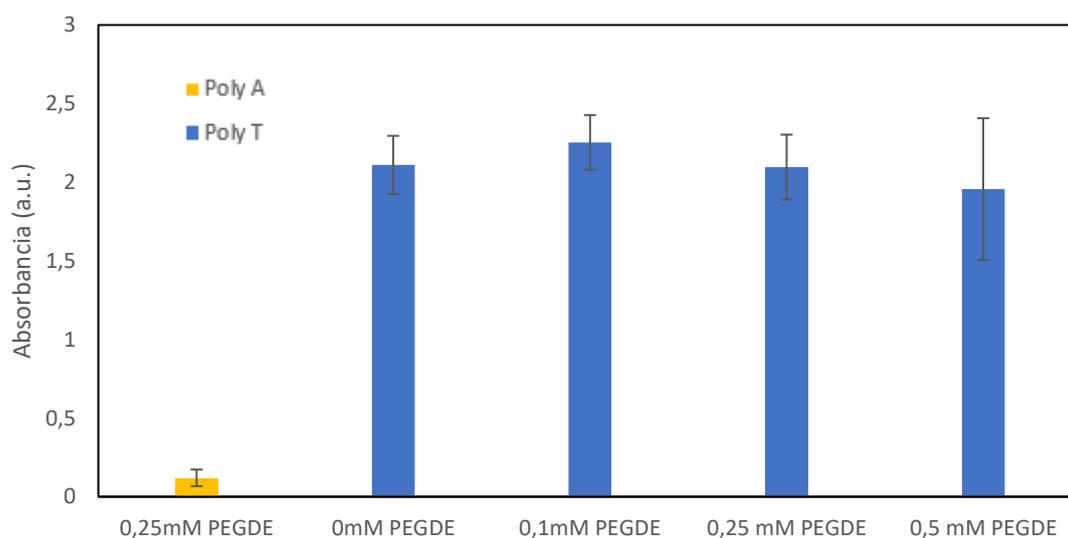


**Figura 10.** Resultados de la optimización de la concentración de PLL.

Por tanto, al mantenerse la ratio positivo/negativo, se puede afirmar que una concentración de 0,05mM es suficiente, y además más económico por el ahorro de reactivo que supone. En consecuencia, se trabajará de ahora en adelante con PLL 0,05mM.

### 6.1.3. Optimización de la concentración de PEGDE

Para determinar la concentración óptima de PEGDE, se funcionalizan la placa con diferentes concentraciones de PEGDE (0mM, 0.1mM, 0.25mM y 0.5mM), y un control negativo con *Poly A Capture Probe* y 0.25mM PEGDE. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 11.

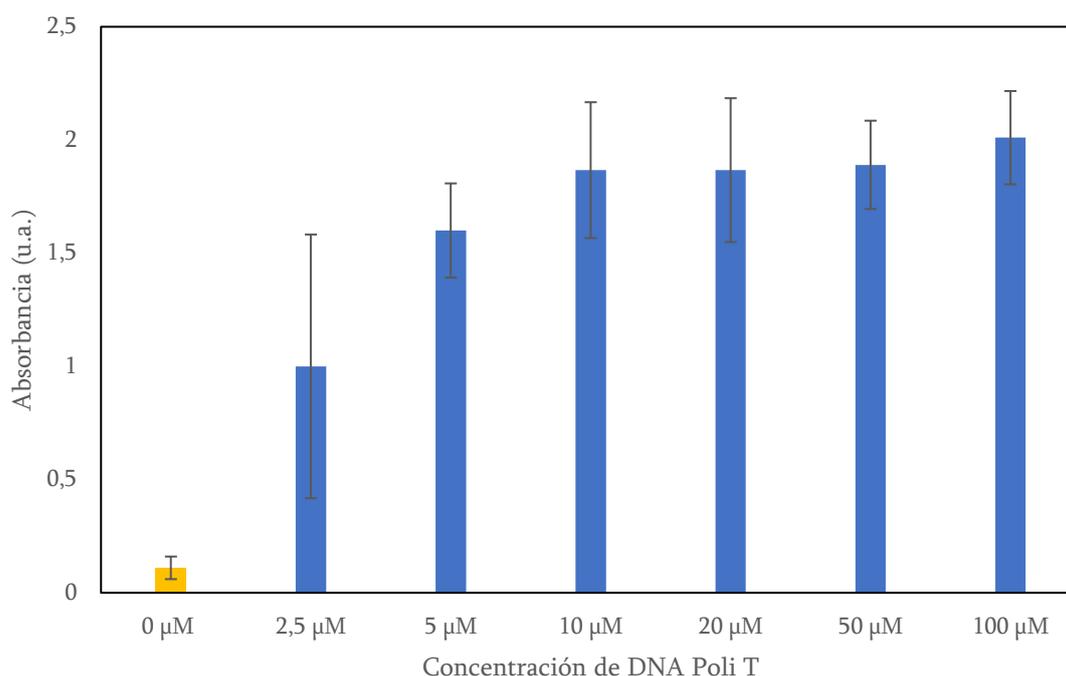


**Figura 11.** Resultados de la optimización de la concentración de PEGDE

Como se puede observar en los resultados, no existe una diferencia significativa con respecto a la concentración de PEGDE, o incluso con su ausencia total. En cualquier caso la absorbancia es del mismo orden y la ratio Poli T/Poli A se mantiene en 17. El hecho de que el resultado obtenido sin el uso de *cross-linker* sea idéntico demuestra que la principal interacción entre el PLL y el DNA es electrostática. No obstante, el uso de un *cross-linker* permite la unión covalente y proporciona estabilidad al método. Por este motivo, se decide seguir empleando PEGDE 0,25 mM.

#### 6.1.4. Optimización de la concentración de DNA *Capture Probe*

Una vez optimizadas las concentraciones de PLL y PEGDE, se debe estudiar la concentración óptima de DNA *Capture Probe*. Para ello, se funcionaliza la placa utilizando 0,05 mM PLL y 0,25 mM PEGDE en todos los pocillos; mientras que la concentración de DNA Poli T se varia. Se utilizan 7 concentraciones distintas de Poli T, incluyendo un blanco: 0  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$ . Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 12.



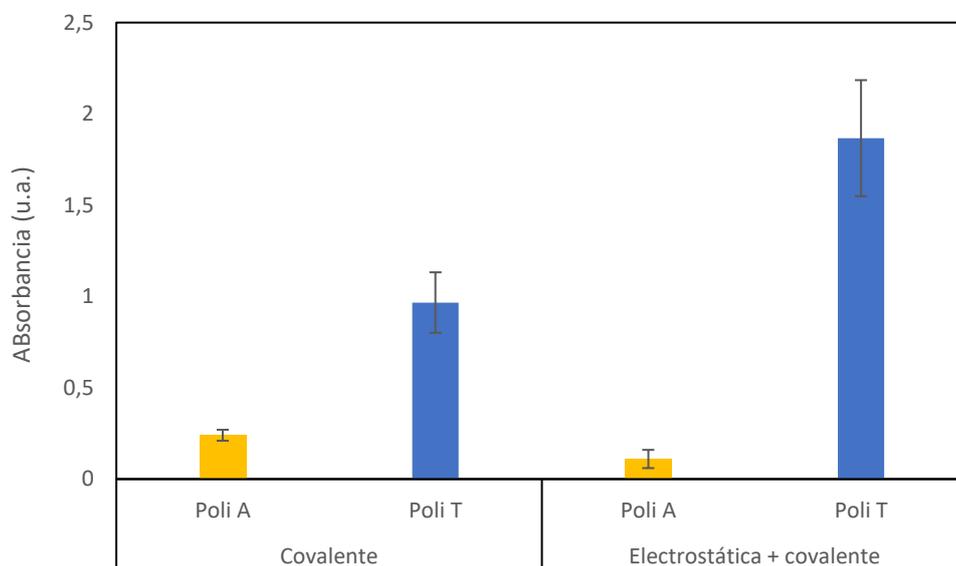
**Figura 12.** Resultados de la optimización de la concentración de DNA Capture probe

En los resultados se observa que al alcanzar la concentración de DNA 10  $\mu\text{M}$  se llega a la saturación, ya que a mayores concentraciones no se producen cambios significativos. Además, una vez más se observa a partir de 10  $\mu\text{M}$  una ratio Positivo/Negativo de aproximadamente 17, de la misma manera que se observaba en los experimentos anteriores. También es notorio que a concentraciones bajas como 2,5  $\mu\text{M}$  no solo disminuye la absorbancia, sino que la reproducibilidad desciende notablemente, dada la gran desviación estándar calculada.

Finalmente, se decide trabajar a partir de este punto con una concentración de DNA de 20  $\mu\text{M}$  para asegurar una concentración dentro de la línea de saturación. No obstante, cualquier concentración a partir de 10  $\mu\text{M}$  se considera igualmente válida.

### 6.1.5. Exclusión de la interacción electrostática

Como se ha podido observar en los experimentos anteriores, la interacción electrostática entre el PLL y el DNA *Capture Probe* es muy grande, invisibilizando la interacción covalente entre ellos. Por este motivo, se decide diseñar un experimento para excluir estas interacciones electrostáticas, dejando solo las uniones covalentes, para visibilizar así cuán grande es esta diferencia. Para hacerlo se utilizará una solución de NaOH, que arrastrará consigo aquellas ebras de DNA *Capture Probe* que no se hayan unido covalentemente al PLL. Para ello, se funcionaliza la placa con las concentraciones previamente optimizadas, es decir, PLL 0.05 mM, PEGDE 0.25 mM y DNA Poli T 20  $\mu$ M. Se incluirá además un control negativo utilizando DNA Poli A. Como se muestra en la Figura 13, la absorbancia ha disminuido en el Poli T con respecto a la obtenida con interacción electrostática. Además, la absorción no específica ha aumentado. Esto se debe a que el tratamiento con NaOH no solo elimina el DNA no unido covalentemente, sino que también deja la placa más expuesta y susceptible a posteriores adsorciones no específicas.



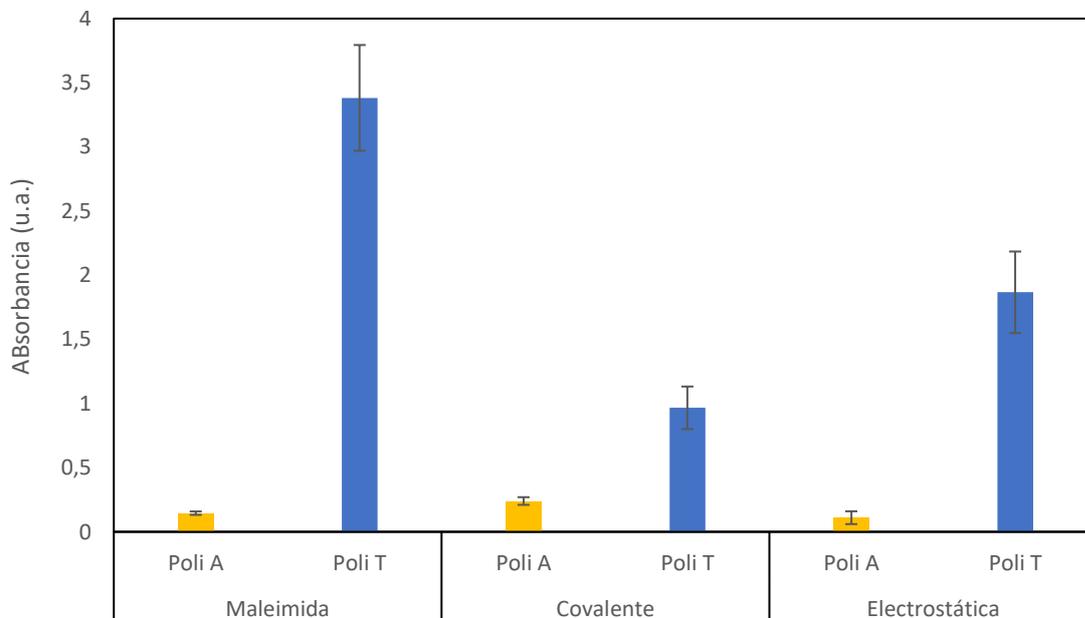
**Figura 13.** Resultados de ELONA-PLL optimizado con interacción covalente y electrostática+covalente.

En cuanto a la ratio Positivo/Negativo también disminuye notablemente, tal y como se esperaba por lo visto en el apartado 6.1.3, donde incluso sin el uso de *cross-linker* se obtenían muy buenos resultados, viendo la importancia de la interacción electrostática. En el caso de la interacción únicamente covalente se ha obtenido una ratio de 4 mientras que al mantener la electrostática la ratio es de 17. No obstante, dado que la absorbancia no específica también aumenta, las conclusiones que se pueden sacar son muy limitadas. Sin embargo, podemos afirmar que al eliminar las interacciones electrostáticas el sistema no funciona de una forma óptima.

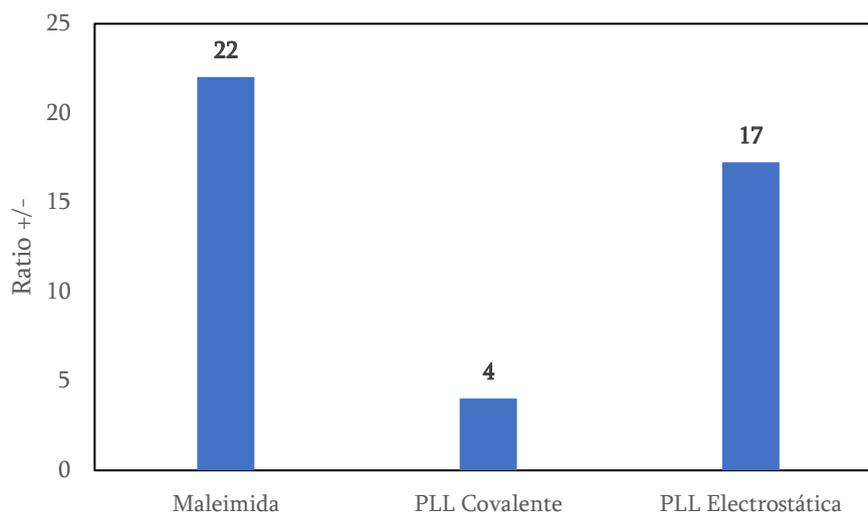
### 6.1.6 Prueba de concepto

Una vez realizado todo el proceso de optimización, se puede comparar el sistema de detección ELONA-PLL con el de ELONA-Maleimida.

Tal y como se muestra en la Figura 14, el sistema ELONA-Maleimida obtiene absorbancias más elevadas que el sistema con PLL. No obstante, eso es debido a la naturaleza de cada sistema, y el factor que impera es la ratio entre positivo y negativo (Figura 15).



**Figura 14.** Resultados de ELONA para los diferentes sistemas.



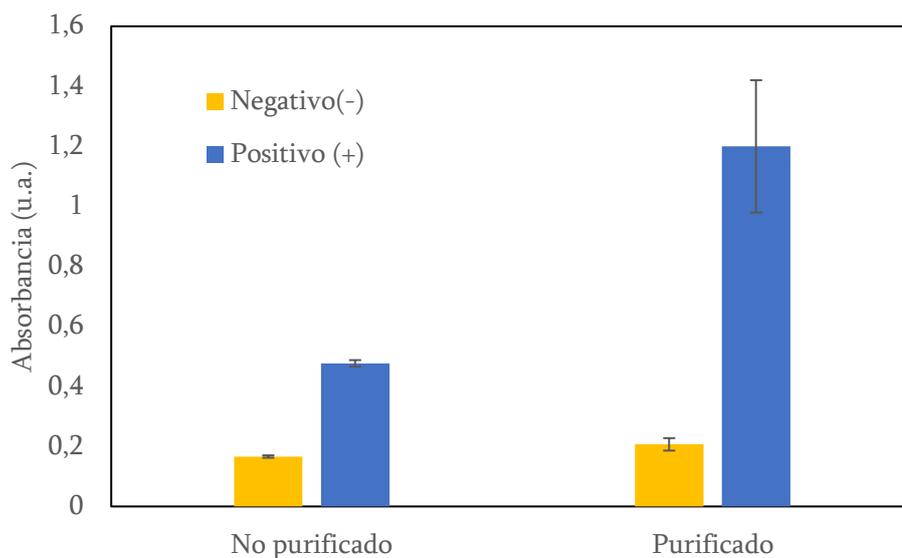
**Figura 15.** Ratios obtenidas en los distintos sistemas.

La ratio obtenida en las placas de maleimida es de 22. Sin embargo, una ratio de 17 como es el caso del sistema PLL con interacción electrostática es suficientemente buena como para afirmar con seguridad que el sistema funciona. En cuanto al sistema sin interacción electrostática, los resultados obtenidos no resultan lo suficientemente buenos como para considerarse una buena alternativa al ELONA en placas de maleimida.

## 6.2. Detección de *K. armiger* vía RPA-ELONA

### 6.2.1. Detección ELONA-Maleimida

Inicialmente, se realizará la detección de los productos de RPA mediante el sistema de ELONA en placas de maleimida descrito por (Toldrà et al., 2018). En este artículo explica que la hibridación de los productos debe ser precedida de la purificación de estos. No obstante, para observar cómo funcionaría el sistema sin purificar los productos, se decide realizar la detección de los productos sin purificación y purificados. Los resultados se muestran en la Figura 16.



**Figura 16.** Resultados de RPA-ELONA-Maleimida

Se observa como realmente el sistema funciona mejor al purificar los productos de RPA. En la detección de los productos sin purificar se obtiene una ratio positivo/negativo de aproximadamente 3, mientras que en los purificados es de 6. No obstante, como se esperaba, la ratio no es tan alta como aquella obtenida con secuencias de Poli T/ Poli A. Esto es debido principalmente a dos motivos.

Primeramente, el uso de una secuencia Poli T como *Capture Probe* y Poli A-HRP como *reporter* permite una hibridación de los productos con alta eficiencia. Esto es debido a que las secuencias *Capture* y *Reporter* podrían hibridar en múltiples puntos de la secuencia. Sin embargo, para los productos de *K. armiger* solo una posición permite esta hibridación, ya que la complementariedad de las secuencias se da en un punto específico.

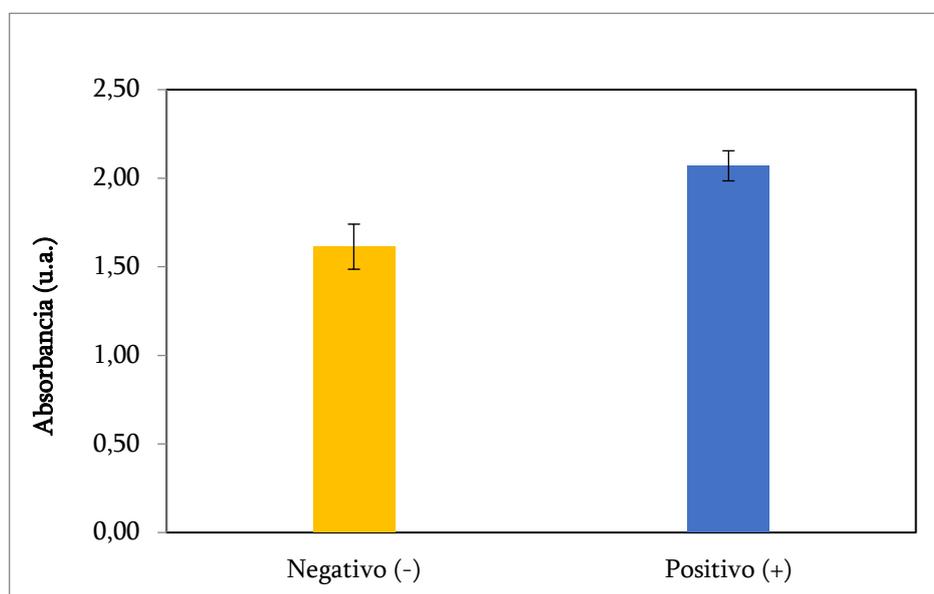
Por otra parte, en esta ocasión el ADN que se detecta no se trata de oligonucleótidos sintéticos directamente hibridados, sino de los productos de un proceso de amplificación, donde nunca habrá una eficiencia del 100% y puede existir la presencia de otras moléculas que dificulten la detección.

## 6.2.2 Detección mediante RPA-ELONA-PLL

Una vez optimizado el sistema de detección ELONA-PLL (apartado 6.1) se utilizarán estas concentraciones para la detección de *K. armiger*.

### 6.2.2.1 Productos de RPA sin purificar

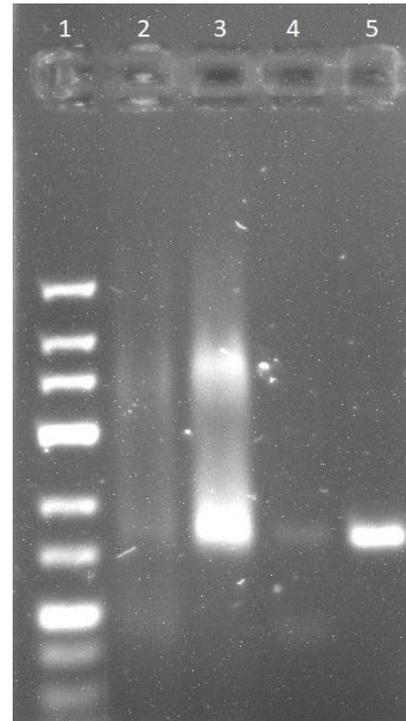
Inicialmente se diseñó un experimento de detección únicamente con productos de RPA positivos y negativos sin purificar. Se decide realizarlo de esta manera ya que el objetivo es obtener un método de detección lo más simple posible. Los resultados se muestran en la Figura 17.



**Figura 17.** Resultados de RPA-ELONA-PLL sin purificación de los productos de RPA.

Los resultados muestran claramente una absorción no específica muy elevada, dada la alta absorbancia en el control negativo. Esto hace que el positivo sea prácticamente indetectable, con una ratio positivo/negativo de 1.3 solamente.

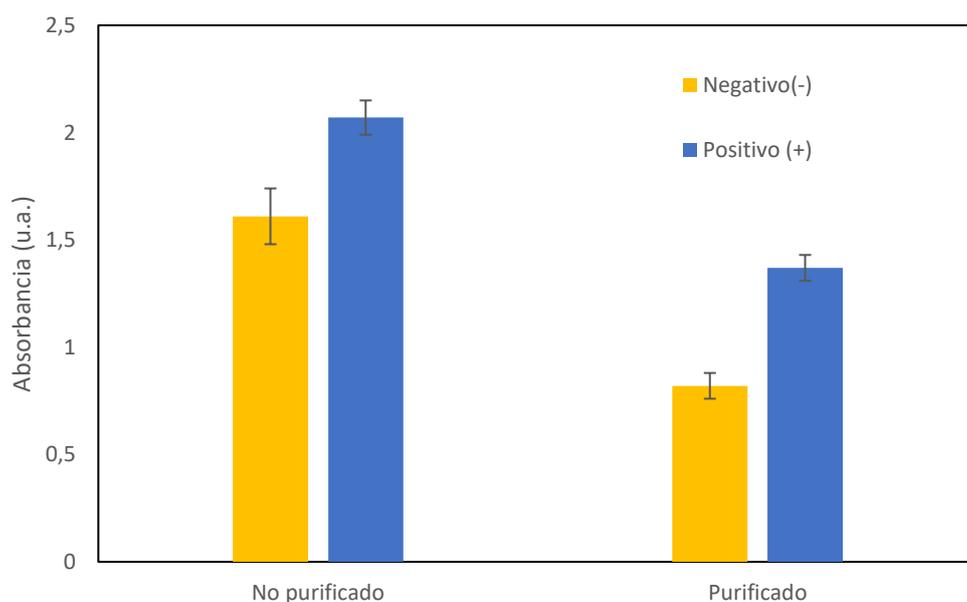
Esta absorción no específica lo más probable es que se deba a la presencia de las enzimas en los productos de RPA, que pueden interactuar con la PLL y posteriormente con la proteína HRP, produciendo falsos positivos. La presencia de estas enzimas, así como dímeros de *primers* u otros, se evidencia al realizar una electroforesis en gel de los productos sin purificar y purificados (Figura 18). Por este motivo se decide realizar el mismo experimento, pero purificando los productos de RPA.



**Figura 18.** Electroforesis de los productos de RPA. 2: Negativo no purificado. 3: Positivo no purificado. 4: Negativo purificado. 5: Positivo purificado.

### 6.2.2.2 Productos de RPA purificados

Para la detección de *K. armiger* con los productos de RPA puros los resultados obtenidos muestran una disminución de la absorbancia respecto a los no purificados (Figura 19).



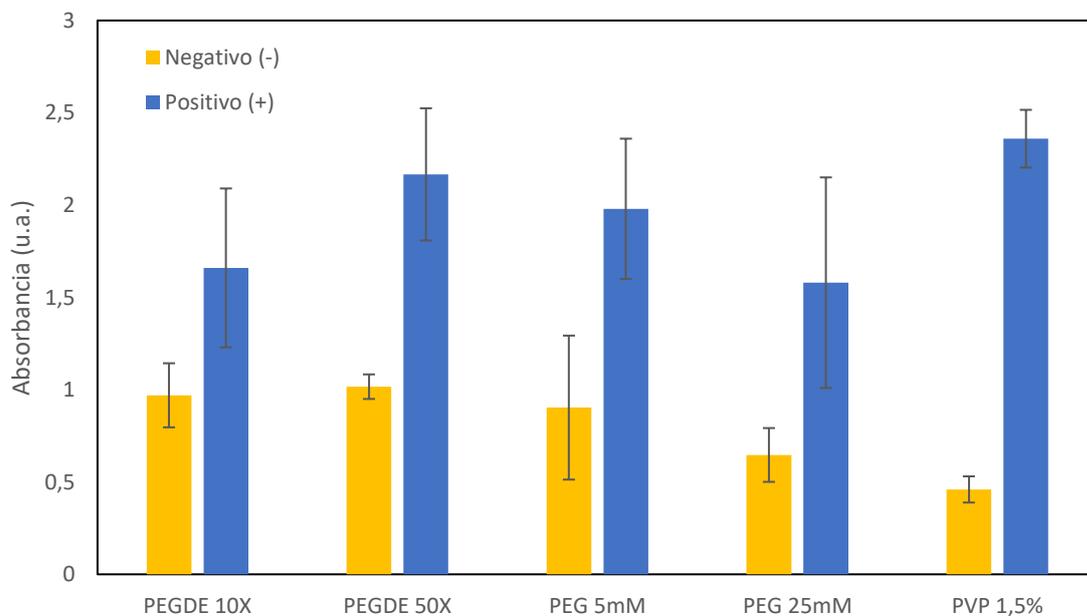
**Figura 19.** Comparativa de los resultados de RPA-ELONA-PLL con y sin purificación.

No obstante, la absorbancia en el control negativo sigue siendo muy alta, al contrario que en las placas de maleimida, y la ratio entre positivo/negativo es de 1.7. Por este motivo, se piensa que la placa, al igual que las de maleimida, debe ser sometida a un proceso de bloqueo para evitar la interacción no específica.

### 6.2.3. Rastreo de sustancias bloqueadoras para evitar absorción no específica

Para obtener una sustancia bloqueadora eficiente en este método de detección, se decide hacer un rastreo de diferentes sustancias bloqueadoras para evitar la interacción de la PLL con otras moléculas. Se decide utilizar PEG 400 (5 mM y 25 mM) y PEGDE 200 (2.5 mM y 12.5 mM) y PVP al 1,5% en agua. El uso de PEGDE y PEG se debe a que estos compuestos pueden reaccionar con la amina de la PLL (como se explica en el apartado 3.5.) y evitar así la interacción con otro compuesto. Por otro lado, se ha visto que el PVP favorece a la especificidad en otros ensayos colorimétricos como ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) (Studentsov et al., 2002). Por este motivo, se decide también utilizar PVP 1.5 % como solución bloqueadora.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 20.

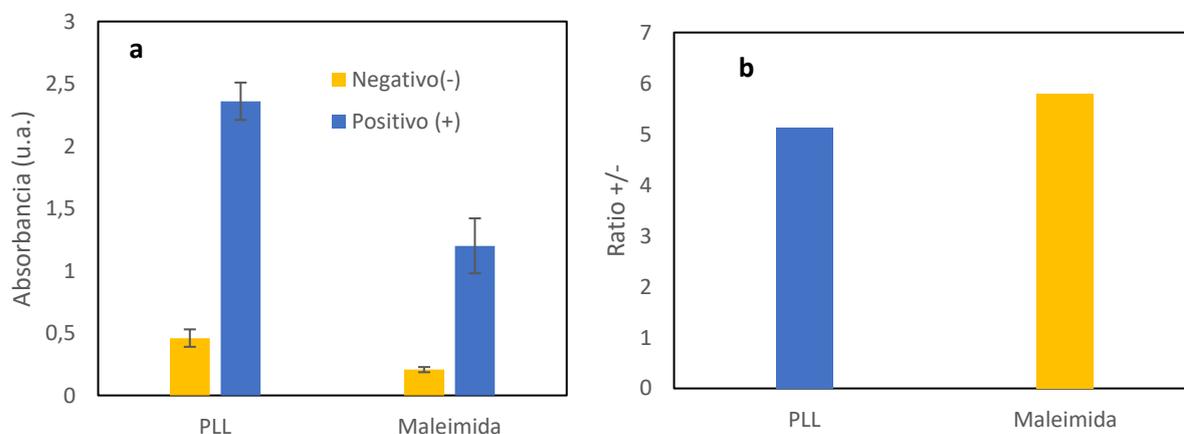


**Figura 20.** Resultados de RPA-ELONA-PLL para las diferentes soluciones bloqueadoras.

De acuerdo a los resultados, es el PVP 1.5 % la mejor sustancia bloqueadora, capaz de reducir a más de la mitad la absorción no específica, y obteniendo una ratio positivo/negativo de 5. Además, este bloqueador podría someterse también a un proceso de optimización, ya que tal vez en otra concentración permita una mayor especificidad.

#### 6.2.4. Comparación de RPA-ELONA en placas con PLL y con Maleimida.

Una vez optimizado el sistema RPA-ELONA para las placas con PLL, utilizando PVP como sustancia bloqueadora, se muestra en la figura 21 la comparativa entre los sistemas ELONA-PLL y Maleimida.



**Figura 21.** Comparación de los resultados obtenidos en RPA-ELONA para Maleimida y PLL. (a) Resultados de las absorbancias obtenidas. (b) Ratios obtenidas.

En la Figura 21 (a) se observa que la absorción es mayor en las placas con PLL. No obstante, esto no resulta de mayor importancia, ya que esto se debe a la naturaleza del sistema. Como previamente se ha explicado, el interés reside en la ratio que se genera (Figura 21 (b)). La ratio obtenida en el sistema ELONA-PLL es de 5.3, mientras que en el sistema ELONA-Maleimida fue de 5.8. Esto supone una disminución de la ratio en placas con PLL respecto a Maleimida menos de un 10%. Por este motivo, podemos considerar los resultados como equivalentes. Además, en el sistema con PLL, no es necesario usar soluciones tamponadas para lavar, los volúmenes de todos los reactivos son 5 veces menores y solo necesita una sustancia bloqueadora, lo que lo vuelve más simple y económico. No obstante, futuros estudios podrían mejorar el sistema ELONA-PLL.

## 7. Conclusiones

La principal conclusión de este trabajo es que la PLL es apta para fijar ADN en un sistema de detección ELONA, estableciendo así un sistema ELONA-PLL funcional. Por tanto, el sistema ELONA-PLL puede considerarse una buena alternativa, más simple y económica, al ELONA en placas de Maleimida para la detección de *K. armiger*. No obstante, son necesarios estudios posteriores para mejorar el rendimiento y especificidad de este sistema.

Los experimentos realizados muestran que PVP es la mejor sustancia bloqueadora en placas de ELONA-PLL. Sin embargo, un estudio más exhaustivo de la concentración y el tiempo de bloqueo podría proporcionar al sistema una mayor especificidad.

Por tanto, este trabajo puede servir como base para posteriores estudios que permitan implementar el uso de este nuevo sistema de detección ELONA basado en PLL.

## 8. Bibliografía

- Alipour, M., & Hosseinkhani, S. (2019). Design, Preparation, and Characterization of Peptide-Based Nanocarrier for Gene Delivery. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (Vol. 2000, pp. 59–69).
- Anderson, D. M., Cembella, A. D., & Hallegraef, G. M. (2012). Progress in Understanding Harmful Algal Blooms: Paradigm Shifts and New Technologies for Research, Monitoring, and Management. *Annual Review of Marine Science*, 4(1), 143–176. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120308-081121>
- Mahato, K., Srivastava, A., & Chandra, P. (2017). Paper based diagnostics for personalized health care: Emerging technologies and commercial aspects. *Biosensors and Bioelectronics*, 96, 246–259. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.05.001>
- McPartlin, D. A., Loftus, J. H., Crawley, A. S., Silke, J., Murphy, C. S., & O’Kennedy, R. J. (2017). Biosensors for the monitoring of harmful algal blooms. *Current Opinion in Biotechnology*, 45, 164–169. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.02.018>
- Medlin, L. K., & Orozco, J. (2017). *Molecular Techniques for the Detection of Organisms in Aquatic Environments, with Emphasis on Harmful Algal Bloom Species*. <https://doi.org/10.3390/s17051184>
- Place, A. R., Munday, R., & Munday, J. S. (2014). Acute toxicity of karlotoxins to mice. *Toxicon*, 90, 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.08.003>
- Polymerase Chain Reaction (PCR) Key Principles. (n.d.). Retrieved May 7, 2019, from <https://www.bosterbio.com/protocol-and-troubleshooting/molecular-biology-principle-pcr>
- Rasmussen, S. A., Binzer, S. B., Hoeck, C., Meier, S., de Medeiros, L. S., Andersen, N. G., ... Larsen, T. O. (2017). Karmitoxin: An Amine-Containing Polyhydroxy-Polyene Toxin from the Marine Dinoflagellate *Karlodinium armiger*. *Journal of Natural Products*, 80(5), 1287–1293.

- Smith, S., Korvink, J. G., Mager, D., & Land, K. (2018). The potential of paper-based diagnostics to meet the ASSURED criteria. *RSC Advances*, *8*(59), 34012–34034. <https://doi.org/10.1039/C8RA06132G>
- Studentsov, Y. Y., Schiffman, M., Strickler, H. D., Ho, G. Y. F., Pang, Y.-Y. S., Schiller, J., ... Burk, R. D. (2002). Enhanced enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to virus-like particles of human papillomavirus. *Journal of Clinical Microbiology*, *40*(5), 1755–1760. <https://doi.org/10.1128/jcm.40.5.1755-1760.2002>
- Toldrà, A., Jauset-Rubio, M., Andree, K. B., Fernández-Tejedor, M., Diogène, J., Katakis, I., ... Campàs, M. (2018). Detection and quantification of the toxic marine microalgae *Karlodinium veneficum* and *Karlodinium armiger* using recombinase polymerase amplification and enzyme-linked oligonucleotide assay. *Analytica Chimica Acta*, *1039*, 140–148. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.07.057>
- TwistAmp @ Liquid DNA Amplification Kits Combined Instruction Manual*. (2018). Retrieved from [https://www.twistdx.co.uk/docs/default-source/RPA-assay-design/twistamp-liquid-combined-manual\\_revb\\_v2-web.pdf?sfvrsn=16](https://www.twistdx.co.uk/docs/default-source/RPA-assay-design/twistamp-liquid-combined-manual_revb_v2-web.pdf?sfvrsn=16)
- WHO | Top 10 causes of death. (2019). *WHO*. Retrieved from [https://www.who.int/gho/mortality\\_burden\\_disease/causes\\_death/top\\_10/en/](https://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/causes_death/top_10/en/)
- Zhang, H., Litaker, W., Vandersea, M. W., Tester, P., & Lin, S. (2008). *Geographic distribution of Karlodinium veneficum in the US east coast as detected by ITS-ferredoxin real-time PCR assay*. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbn047>
- Zhao, Y., Chen, F., Li, Q., Wang, L., & Fan, C. (2015). *Isothermal Amplification of Nucleic Acids*. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00428>

## 9. Autoevaluación

Personalmente, mi experiencia en el grupo *Interfibio* ha sido muy buena. Es la primera vez que realizo un trabajo de investigación de estas características, y creo que he cumplido bien con mis expectativas.

Inicialmente, debo reconocer que me sentí un poco desorientado en el laboratorio y el proyecto, dado que al principio me dediqué a aprender las técnicas en las que se fundamentaría mi trabajo, y no acababa de visualizar qué iba a aportar yo.

Sin embargo, luego surgió la idea de poder desarrollar un sistema ELONA más simple y a partir de ahí todo fue rodado. Participé entonces desde el principio en este trabajo. Uno de los aspectos de los que me siento más orgulloso es el hecho de haber aprendido a realizar diseños experimentales óptimos para contrastar las diferentes hipótesis o cuestiones que surgían durante el proyecto.

Finalmente, me siento feliz por poder compartir aquí el trabajo realizado. Además, este es un proyecto que actualmente otros compañeros seguirán adelante en el laboratorio, ya que se ha visto lo prometedor del nuevo sistema. Esto último es lo que realmente me hace sentir mejor, ya que puedo ver reflejado mi trabajo en algo que finalmente pueda servir en el mundo de la ciencia.