



RENORBIO

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**Sensor eletroquímico para detecção de Organismos  
Geneticamente Modificados: detecção do promotor  
P35S**

**Suely Moura Melo**

Tese de Doutorado

Prof. Dr. José Ribeiro dos Santos Júnior

Orientador

Profa. Dra. Rebeca Miranda Castro

Co-orientadora

**Teresina-PI**

**2016**

**Suely Moura Melo**

**Sensor eletroquímico para detecção de Organismos  
Geneticamente Modificados: detecção do promotor  
P35S**

Tese de Doutorado apresentada à Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia – Área de Concentração: Biotecnologia em Produtos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. José Ribeiro dos Santos Júnior.

Co-orientadora: Profa. Dra. Rebeca Miranda Castro

**TERESINA**

**2016**

FICHA CATALOGRÁFICA  
Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Setorial do CCN

M528s    Melo, Suely Moura.  
Sensor eletroquímico para detecção de organismos geneticamente modificados: detecção do promotor P35S / Suely Moura Melo – Teresina, 2016.  
120f.: il. color

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências da Natureza, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia, 2016.

Orientador: Prof. Dr. José Ribeiro dos Santos Júnior.  
Coorientadora: Profa. Dra. Rebeca Miranda Castro.

1. Bioeletroquímica. 2. Sensor de DNA. 3. Organismos Geneticamente Modificados. I. Título.

CDD 572.437

---

## FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNO: SUELY MOURA MELO

TÍTULO DO PROJETO: "Sensor eletroquímico para detecção de Organismos Geneticamente Modificados: detecção do promotor P35S".

PROFESSOR ORIENTADOR: Prof. Dr. José Ribeiro dos Santos Júnior

BANCA EXAMINADORA:	CONCEITO	ASSINATURA
Prof. Dr. José Ribeiro dos Santos Júnior - UFPI (Orientador)	<u>satisfatório</u>	
Profa. Dra. Rebeca Miranda Castro - UNIOVI (Co-orientadora)	<u>SATISFATORIO</u>	
Prof. Dra. María Jesús Lobo Castañón - UNIOVI (Examinadora)	<u>SATISFATORIO</u>	
Prof. Dr. Fábio Mendonça Diniz - Embrapa Meio-Norte (Examinador)	<u>SATISFATORIO</u>	
Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes – UFPI (Examinador)	<u>SATISFATORIO</u>	
Prof. Dr. Adalberto Socorro da Silva - UFPI (Examinador)	<u>SATISFATORIO</u>	

DATA DA AVALIAÇÃO: 21 de março de 2016.

HORÁRIO: 8h30

LOCAL: Auditório do Departamento de Química/CCN/UFPI.

## Dedicatória

À minha família e a todas as pessoas  
que me incentivaram em minha vida.

## AGRADECIMENTOS

A Deus,

À minha família (Maurício (papai), Maria da Conceição (mamãe), Michelly (irmã), Clara Valentina (sobrinha), Raimundo Costa (meu companheiro)), Tia Nazinha, Tia Flor de Lis (*in memoriam*) por todo apoio, compreensão, paciência e por acreditarem e contribuírem diretamente para a conclusão do doutorado;

Ao Dr. José Ribeiro dos Santos Júnior por todos esses anos de ensinamentos e jornada de pós-graduação (Mestrado e Doutorado), por acreditar em meu potencial e me dar as oportunidades para a conclusão de uma formação de alto nível;

*A la Dra. María Jesús Lobo Castañón y Dra. Rebeca Miranda Castro por mi orientación en mi doctorado sandwich en Oviedo, por toda la paciencia y por creer en mi potencial para el trabajo con genossensores;*

A todos os meus amigos, em especial, os mais próximos Thalyta, Fabiana, Figueiredo, Haroldo, Giancarlo, que contribuíram com as parcerias em muitos momentos de minha formação,

*A el equipo del Grupo de Electroanálisis, por la recepción en Oviedo, en especial MSc. Susana, MSc. Laura, Dra Noemí, Dra. María José, Dr. Arturo Miranda, Dr. Daniel, MSc Emílio, que tuvieron muychíssima paciencia para entenderme cuando llegué al laboratorio y no hablaba nada de español y poco a poco me ayudaron a entender todo el trabajo y tambien el español;*

*A mis compañeras de Ovida, en especial, Yaressí (mi hermana mexicana), Andrea (mi hermana espanhola), Edna (mi hermana portuguesa), Thank you Burcu, my turkish sister, for all, you live in my heart, mi familia em Oviedo, por todo él cariño y companhia. Ana Miranda, Susana, Conchi, Estibaliz, Eva, Ana, Dña. Gina, Dña. María Celestina, Dña. Pilar, Kiko y muchas otras personas especiales en la residencia Ovida, por tenerla como mi casa en Oviedo, gracias por todo.*

Obrigada, especialmente à Dra. Rosana, Dra. Teresa Cristina (minha madrinha), aos amigos: Dra. Begoña, Nazilene, Thelma, Júlio César, Hugo, Elisângela, Lêda, às amigas e amigos do ballet, Tia Ruth, Fabrício e Luciene, às companheiras do Grupo de Oração da Mãe Rainha, enfim, a todos os verdadeiros amigos por estarem ao meu lado nessa caminhada chamada vida.

Obrigada também a todas as pessoas que contribuíram diretamente e indiretamente para que eu chegasse a mais essa realização da minha vida.

Agradeço o financiamento do Ministério Espanhol de Economia e Competitividade Project CTQ2012-31157), o FP7 PEOPLE-2013-IRSES Marie Curie Actions Programme (GMOsensor project 612545) e o co-financiamento do Fundo FEDER (Espanha). Agradecemos ao Dr. Jose Luis Martinez-Fernandez pela assistência na amplificação de HDA e sequenciamento. Como aluna de Curso de Doutorado, agradeço ao programa CAPES/FAPEPI pela bolsa de doutorado do Ministério da Educação do Brasil.

## RESUMO

A demanda por alimentos exige que se tenha cada vez mais produtividade dos cultivos por diversas razões. Essa produtividade pode ser alcançada pelo uso de plantas transgênicas. Os produtos de plantas transgênicas precisam ser controlados e regulados por Legislação Federal. No Brasil são os Atos do Poder Executivo de 24 de abril de 2003 e o Decreto número 4680, que autorizam o uso de até 1,0% de transgênico. Na União Europeia utiliza-se padrões estabelecidos pela “*Commission Regulation*” nos decretos de números 1829/2003 e 1830/2003. Este estabelece que produtos alimentícios, os quais contenham organismo geneticamente modificado e estejam autorizados, não podem ter em seu conteúdo, transgênico acima de 0,9%, sob pena de receber a denominação “geneticamente modificado” na lista de ingredientes. A detecção de Organismos Geneticamente Modificados (OGMs) é uma necessidade dos consumidores a fim de resguardar sua saúde. Para a indústria isto significa obedecer a legislação e controlar a qualidade desses produtos alimentícios. O promotor “P35S” é uma sequência procedente do vírus do mosaico da couve-flor, amplamente encontrado em produtos transgênicos, sendo o gene de maior expressão normalmente inserido e expresso como MON 810. A especificidade do ensaio depende de dois pilares: a amplificação isotérmica do DNA dirigida por “*primers*” específicos; e dos produtos de hibridização por HDA com sondas específicas de captura e indicadora. Os genossensores confeccionados realizam detecção por técnicas eletroquímicas. O método requer um equipamento simples e acessível para detecção *in situ*. Isso pode ser vantajosamente aplicado para a detecção específica de pequenas quantidades de biomarcadores de ácidos nucleicos em análises diagnósticas, ambientais e alimentares. O sistema que combina HDA e a detectabilidade permite uma detecção do tipo SIM/NÃO, a partir de 30 cópias de DNA. O método oferece uma ferramenta versátil e sensível para a detecção de pequenas quantidades ( $\approx 0,5\%$ ) de DNA transgênico, não apenas para controle de segurança alimentar, mas também para o diagnóstico e controle de áreas ambientais.

Palavras-chave: Sensor de DNA, detecção eletroquímica, Organismos Geneticamente Modificados, promotor P35S, amplificação isotérmica de DNA dependente da helicase.



## ABSTRACT

The need for food demands the crops to increase more and more its productivity for several reasons. This may be accomplished by the use of transgenic plants. The products of transgenic plants need to be controlled and regulated by Federal Law. In Brazil, the Executive Power Acts of 2003 April 24th and the Decree number 4680 recommend the use of 1,0 % of transgenic at the most. In the European Union, the "Commission Regulation" has established standards by the Decrees 1829/2003 and 1830/2003. Both of them determine that authorized food products that contain genetically modified organisms should not be composed by a rate of transgenic constituents higher than 0.9%, which otherwise should be labeled as "genetically modified" in the list of ingredients. The detection of Genetically Modified Organisms (GMOs) is a need of the consumers to maintain their health protected. For the industry, this means to act according to the law and control the quality of its food products. The promoter "P35S" is a sequence that stems from the virus of the cauliflower's mosaic, widely found in transgenic products and one of the most commonly used genes, being usually expressed as MON 810. The particularity of this test stands on two characteristics: the isothermal amplification of the DNA driven by specific "primers"; and the products hybridized by HDA with specific capture and indicating gauges. The biosensors supplied were detected by electrochemical techniques. The method requires a simple and accessible for field detection equipment. This can be beneficially applied for the detection of specific and small amounts of biomarkers of nucleic acids in diagnostic, environmental and food analysis. The system that combines HDA and detectability allows detection of the kind YES/NO, from 30 copies of DNA. The method offers a versatile and sensible tool for the detection of small amounts (~ 0,5%) of transgenic DNA, not only for the control of food safety, but also for the diagnostic and control of environmental areas.

Key-words: DNA sensor, electrochemical detection, Genetically Modified Organisms, Promotor P35S, DNA helicase – dependent isothermal amplification.

## SUMÁRIO

	Folha de rosto	
	Ficha catalográfica	
	Ficha de avaliação	
	Dedicatória	
	Agradecimentos	
	Resumo	
	Abstract	
	Sumário	
	Lista de Ilustrações	
	Lista de Tabelas	
	Lista de Abreviaturas e siglas	
1	Capítulo I: Introdução	16
	Introdução	17
	Capítulo 2: Revisão Bibliográfica	21
2	Revisão Bibliográfica	22
2.1	Transgênicos	22
2.2	Milho MON 810	26
2.3	Genossensores para a detecção de Organismos Geneticamente modificados	28
2.4	Técnicas de Amplificação de DNA	32
2.4.1	Polimerase Chain Reaction- PCR- Reação em Cadeia da Polimerase	33
2.4.2	Helicase Dependent Amplification (HDA)	35
3	Capítulo 3: Objetivos	39
3	Objetivos	40
4	Capítulo 4: Experimental	41
4.	Experimental	42
4.1	Instrumentação eletroquímica e construção do eletrodo de trabalho	42
4.2	Construção do sensor eletroquímico de DNA (genossensor)	43
4.2.1	Monocamadas automontadas (SAMs) de biomoléculas em eletrodos de metal (Au)	44
4.2.2	Design das sequências de nucleotídeos do genossensor	45
4.2.3	Estudo da concentração da sonda de captura	50
4.2.4	Medida Cronoamperométrica	51
4.3	Amplificação isotérmica dependente de helicase (HDA)	53
4.3.1	Seleção de primers	53
4.3.2	Condições de amplificação	53
4.4	Isolamento de DNA de amostras de alimentos : pureza e controle de qualidade	54
4.5	Preparo das amostras com DNA amplificado por PCR e/ou HDA	57
4.6	Protocolo geral de análise de amostras	59
	Referências Bibliográficas	60
	Capítulo 5: Artigo	63
	Resumo	64
	Introdução	65
	Seção Experimental	67
	Amplificação de DNA dependente da helicase	68

Construção da superfície sensora	68
Ensaio de Hibridização e Detecção Eletroquímica	69
Preparação das amostras alimentares	70
Isolamento de DNA de amostras de alimentos: pureza e controle de qualidade	70
Digestão enzimática de DNA genômico	72
Resultados e discussão	73
Amplificação HDA: Design e Avaliação	75
Design do genossensor e performance analítica	77
Acoplando HDA e genossensor eletroquímico	83
Conclusões	84
Agradecimentos	85
Referências	85
Comentários e Perspectivas	88
Apêndice	89
Anexos	107

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Construção típica dos transgênicos	19
Figura 2	Países com plantações transgênicas	22
Figura 3	Esquema de ensaio de hibridização tipo <i>sandwich</i>	31
Figura 4	Potenciostato/Galvanostato para medidas eletroquímicas	32
Figura 5	Esquema de PCR	34
Figura 6	Esquema de amplificação dependente da helicase	37
Figura 7	Esquema de montagem do eletrodo de trabalho de Au	42
Figura 8	Voltamograma cíclico, do eletrodo de ouro policristalino limpo, em $\text{H}_2\text{SO}_4$ 0,5M, Velocidade de varredura $100 \text{ mVs}^{-1}$	43
Figura 9	Esquema das etapas do procedimento experimental	44
Figura 10	Estrutura mais estável de $T_{80}$ (80-nt target) a $20^\circ\text{C}$ e $0,3 \text{ M Na}^+$ a partir do servidor MFold Web	46
Figura 11	Estrutura da sonda de captura e indicadora a $20^\circ\text{C}$ e $0,3 \text{ M Na}^+$ a partir do servidor MFold Web	47
Figura 12	Resposta do genossensor eletroquímico para concentrações de target variando entre 0 e 3 Nm na ausência (azul) ou presença (vermelho) de 75 nM de <i>primer</i> direto	48
Figura 13	Estrutura mais estável de $T_{105}$ (105-nt target) a $20^\circ\text{C}$ e $0,3 \text{ M Na}^+$ a partir do servidor MFold Web	50
Figura 14	Efeito da concentração da sonda de captura	51
Figura 15	Voltamograma típico da reação de TMB	52
Figura 16	Protocolo geral de extração de DNA de amostras alimentares	55
Figura 17	Protocolo geral de análise de amostras, incluindo unidade de conteúdo de DNA e equivalentes	59
Figura 18	Eletroforese em gel de agarose 0,8% (em <i>buffer</i> 1XTBE) de DNA genômico de <i>Zea mays</i> . Linha 1: Padrão de tamanhos, linha 3: Digestão por toda a noite de MON810-10%, linha 5: MON810-10% sem cortes, linha 7: MON810-0% digerido por toda a noite.	73
Figura 19	Representação esquemática das diferentes etapas que envolvem o genossensor eletroquímico	74
Figura 20	(A) eletroforese em gel de agarose 3% ( <i>buffer</i> 1XTBE) de produtos de HDA iniciando com diferentes números de cópias de $T_{105}$ . Linha 1: Ladder (padrão), Linha 2: controle sem molde, Linhas 4-8 $3 \times 10^5$ , $3 \times 10^4$ , $3 \times 10^3$ , $3 \times 10^2$ e $3 \times 10^1$ cópias por ensaio. (B) as curvas de amplificação isotérmica ( $T=65^\circ\text{C}$ ) obtidas por HDA baseado em fluorescência de tempo real de $T_{105}$ . O número de cópias inicial de $T_{105}$ cópias por ensaio foi (a) $3 \times 10^5$ , (b) $3 \times 10^4$ , (c) $3 \times 10^3$ , (d) $3 \times 10^2$ , (e) $3 \times 10^1$ , (f) 0 (controle sem molde). A linha horizontal verde representa o número limite utilizado para obter a curva de calibração.	75
Figura 21	Equilíbrio concorrente quando (parte superior) a sonda de captura se liga com o 3' – terminal do target e (parte inferior) sonda de captura hibridiza com o final 5' do target.	79
Figura 22	(A) Efeito da concentração da sonda de captura no coeficiente da curva de calibração. (B) Variação da resposta analítica com a concentração de DNA (pontos vermelhos) de $T_{80}$ , (triângulos	80

cinzas ) para  $T_{105}$ .  
Figura 23 (A) correntes amperométricas obtidas iniciando com diferentes 82  
cópias de  $T_{105}$  depois de 40 min (azul), 60 min de reação de HDA  
a 65 °C (vermelho). (B) variação da resposta eletroquímica para  
diferentes percentagens de MON 810 em DNA extraído de  
farinhas de milho depois de 60 min de amplificação isotérmica.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Tabela comparativa de técnicas de amplificação utilizadas nesse estudo	38
Tabela 2	Sequências de “ <i>Primers</i> ”, <i>Target</i> sintéticos, sondas de captura e indicadora	49
Tabela 3	Parâmetros de seleção de iniciadores segundo recomendações do Kit HDA	53
Tabela 4	Primers empregados na HDA	53
Tabela 5	Condições ótimas da amplificação por HDA	54
Tabela 6	Tabela descritiva das amostras certificadas de DNA de milho transgênico	56
Tabela 7	Par de <i>primers</i> FP <sub>159</sub> /RP <sub>159</sub> utilizado na PCR convencional	57
Tabela 8	Relações de MON810 testadas nesse estudo de detecção	58
Tabela 9	Número de cópias de DNA sintético	58
Tabela 10	Sequência de <i>primers</i> , <i>target</i> sintéticos, sondas de captura e indicadora	67

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>bp</b>	Par de bases
<b>BSA</b>	Sérum de albumina bovina
<b>CaMV</b>	Cauliflower Mosaic Virus
<b>CGE</b>	capillary gel electrophoresis
<b>CNBS</b>	Conselho Nacional de Biossegurança
<b>CP</b>	Capture Probe – Sonda de Captura
<b>CNTBio</b>	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
<b>Cry1Ab</b>	Proteína derivada do <i>Bacillus thuringiensis</i>
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucléico
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EC</b>	Comunidade Europeia
<b>EFSA</b>	Autoridade de Segurança Alimentar Europeia
<b>EU</b>	União Europeia
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>GC</b>	Guanina – Citosina
<b>GMO</b>	Genetically Modified Organisms
<b>HDA</b>	Helicase Dependent Amplification
<b>LIF</b>	laser-induced fluorescence
<b>LOD</b>	Limite de Detecção
<b>LOQ</b>	Limite de Quantificação
<b>MON</b>	Monsanto
<b>nt</b>	Nucleotídeos
<b>OGM(s)</b>	Organismos Geneticamente Modificados
<b>P35S</b>	Promotor 35S
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PMEM</b>	Parecer Científico sobre Monitoramento de Degradação Ambiental
<b>POD</b>	Enzima peroxidase
<b>qPCR</b>	PCR em tempo-real
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucléico
<b>SAM</b>	Self- assembled monolayer
<b>sat</b>	Saturado
<b>S/B</b>	Relação sinal / branco
<b>SHE</b>	Standard hydrogen electrode
<b>SD</b>	Desvio Padrão
<b>SRD</b>	Desvio Padrão Relativo
<b>SP</b>	Signaling Probe – Sonda Indicadora
<b>SSB</b>	Proteína single-stranded binding
<b>T</b>	<i>Target</i> – alvo
<b>TMB</b>	Tetrametilbenzidina

# Capitulo 1 - Introdução



## 1. Introdução

O mundo tem uma grande demanda por alimento tanto para suprir a necessidade dos humanos como a dos animais. As plantações de gêneros alimentícios são a principal fonte para suprir essa demanda. Muitos cientistas estão pesquisando modificações genéticas com o intuito de resolver danos ou riscos de escassez, melhorar as propriedades nutricionais e reduzir perdas nas plantações. Atualmente, Organismos Geneticamente Modificados (OGMs) têm sido utilizados em muitas culturas porque apresentam maior resistência às pragas de insetos e às doenças nas plantas. As perdas por esses fatores são drasticamente reduzidas com a utilização dos OGMs, no entanto algumas modificações nesses organismos podem traduzir melhorias na qualidade do alimento.

Determinar a quantidade de transgênicos em um produto alimentício comercial pode ser uma tarefa realizável? Sim, desde que se tenham dispositivos capazes de identificar um componente transgênico com elevada seletividade, sensibilidade e reprodutibilidade. A partir dessa necessidade, foram desenvolvidos sensores eletroquímicos para detecção de Organismos Geneticamente Modificados.

Um organismo é caracterizado como geneticamente modificado quando parte de um DNA derivado de outra espécie lhe agrega outra característica como resistência a pragas (HOLST-JENSEN, 2012). Devido à incerteza nas consequências do consumo de alimentos alterados geneticamente, os governos de diversos países têm normatizado a quantidade permitida de OGMs nos alimentos.

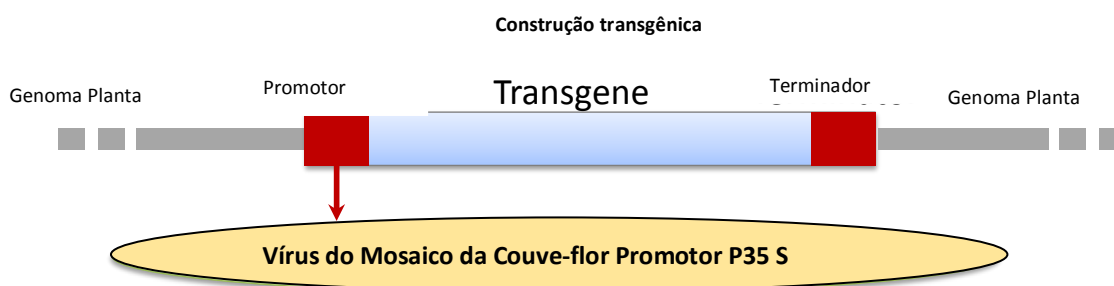
Muitos países apresentam legislações que regulamentam os alimentos em relação à transgenicidade. O Brasil o fez através do Decreto nº 4680, de 24 de abril de 2003; os USA, através do “US Food and Drug Administration, Center for Food and Applied Nutrition”; o Japão, pelo “Department of Food Safety, Pharmaceutical and Medical Safety Bureau, Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan”; a Coreia do Sul, “Ministry of Agriculture and Forestry of Korea”; Hong Kong, “Centre for Food Safety, Guidelines on Voluntary Labelling of Genetically Modified (GM Food”); Taiwan, “Biotechnology Safety Assessment Guidelines for Biotech Foods”; a Arábia Saudita, “US Department of Agriculture, Foreign Agricultural Service, GAIN Report # USA 1019 of November 13, 2001”; e a União Europeia, “Commission Regulation No. 1829/2003 of September 22, 2003; Commission Regulation No. 1830/2003 of September 22, 2003” (Michelini *et al.* 2008).

Apesar da disseminação dessas culturas com Organismos Geneticamente Modificados, existem poucos estudos direcionados para as consequências do consumo desses produtos pelos animais ou pelo homem. É importante a quantificação por técnica de triagem (*screening*) para detectar a presença ou para verificar a ausência dessas espécies geneticamente modificadas e de elementos comumente encontrados em OGMs. As modificações que levam a características específicas nos alimentos são feitas no seu material genético para promover determinada característica de interesse. Os métodos atuais utilizam uma instrumentação cara e são realizados apenas por laboratórios especializados, por isso necessita-se de alternativas mais baratas e confiáveis que permitam a análise de acordo com a finalidade (*in situ*) e que podem ser a chave para o consumo dos alimentos.

Algumas Legislações estabelecem restrições para o uso de alimentos geneticamente modificados, como por exemplo, a da Comunidade Europeia, que obriga a informação no rótulo (etiqueta), quando o percentual de modificação superar 0,9%, alertando, dessa forma, ao consumidor sobre a procedência do alimento (HOLST-JENSEN, *et al.*, 2012). No Brasil, a Lei de Biossegurança nº 11.105 de 24 de março de 2005 (Brasil, 2005) é o documento que rege os mecanismos de fiscalização e segurança dos Organismos Geneticamente Modificados (BRASIL, 2005).

Em Holst-Jensen *et al.* 2012 existe uma classificação baseada em informações dos conhecimentos das sequências do Ácido Desoxirribonucleico (DNA). Diferentes parâmetros estão descritos, tais como a origem dos elementos genéticos de interesse, a informação conhecida de sequências de DNA e a classificação legal dos OGMs. Dentro de uma construção típica dos transgênicos (Figura 1) selecionamos como fita dupla de DNA o *target* de uma sequência específica do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor, que é um dos mais comuns na composição molecular das plantas geneticamente modificadas, incluindo o milho MON810 ((EFSA), 2015). Este evento transgênico MON810 foi desenvolvido pela MONSANTO como uma alternativa para controle de praga através de alteração genética do milho, fazendo com que esse cereal apresente proteção inseticida (TINLAND, *et al.*, 2007).

**Figura 1: Construção típica dos transgênicos**



Fonte: autora

Com base nessa modificação do DNA que aumenta sua resistência a pragas, existe a possibilidade de se determinar se uma planta é ou não transgênica. Para se realizar o processo de identificação de OGM, por *screening*, diversas ferramentas têm sido utilizadas como técnicas de extração e de amplificação do DNA, a fim de aumentar a seletividade e a sensibilidade da detecção. Entre essas técnicas, podemos destacar como método oficial a “*Polymerase Chain Reaction*” (PCR) (VINCENT, M.;XU, Y.;KONG, H. 2004).

Quando utilizamos ensaios de *screening* para a detecção de OGM, é importante explicar o coeficiente de expressão que pode, em sentido matemático, ter a relação entre duas variáveis: a sequência de bases de DNA do OGM e a sequência de bases da detecção em módulo analítico do elemento que está inserido no OGM; no caso, a do “DNA – *target*”. Os resultados dessa aplicação em módulos de triagem de amostras são comparados a uma base de dados que estão tabelados na matriz de sequenciamento genético. Em seguida, observando-se os padrões de presença ou ausência como indicadores, pode-se “predizer” para um OGM em particular qual o percentual de modificação genética nesse OGM em amostras *in situ*. A suposta presença pode ser examinada com módulos de eventos específicos em PCR, que apresenta na prática um excelente limite de detecção.

Nesse trabalho, a matriz MON 810 que possui como promotor “P35S” será o elemento de identificação, o *target*, em amostras que serão extraídas de milho. A cultivar de milho transgênico MON 810 é um milho transgênico entre os Organismos Geneticamente Modificados, o mais disseminado em todo o mundo, por conferir resistência a pragas de insetos nas plantações.

Normalmente, na detecção de OGM é utilizada a PCR, uma técnica que envolve equipamentos de alto custo e mão de obra qualificada. Com a finalidade de baratear custos, desenvolvemos neste trabalho um sensor eletroquímico para a detecção de “P35S”, acoplado a uma técnica de amplificação de DNA que tenha uma boa sensibilidade e seletividade.

Este estudo resultou da execução do projeto *Monitoring Genetically Modified Organisms in Food and Feed by innovative Biosensor Approaches* FP7-PEOPLE-2013- IRSES, envolvendo os laboratórios de diversas universidades, tendo sido realizado graças à parceria Universidade Federal do Piauí – (UFPI) – Grupo Bioeletroquímica – Universidade de Pernambuco - UPE e Universidad de Oviedo (UNIOVI) – Laboratorio de Electroanálisis – GEUO) - Principado de Asturias – Espanha).

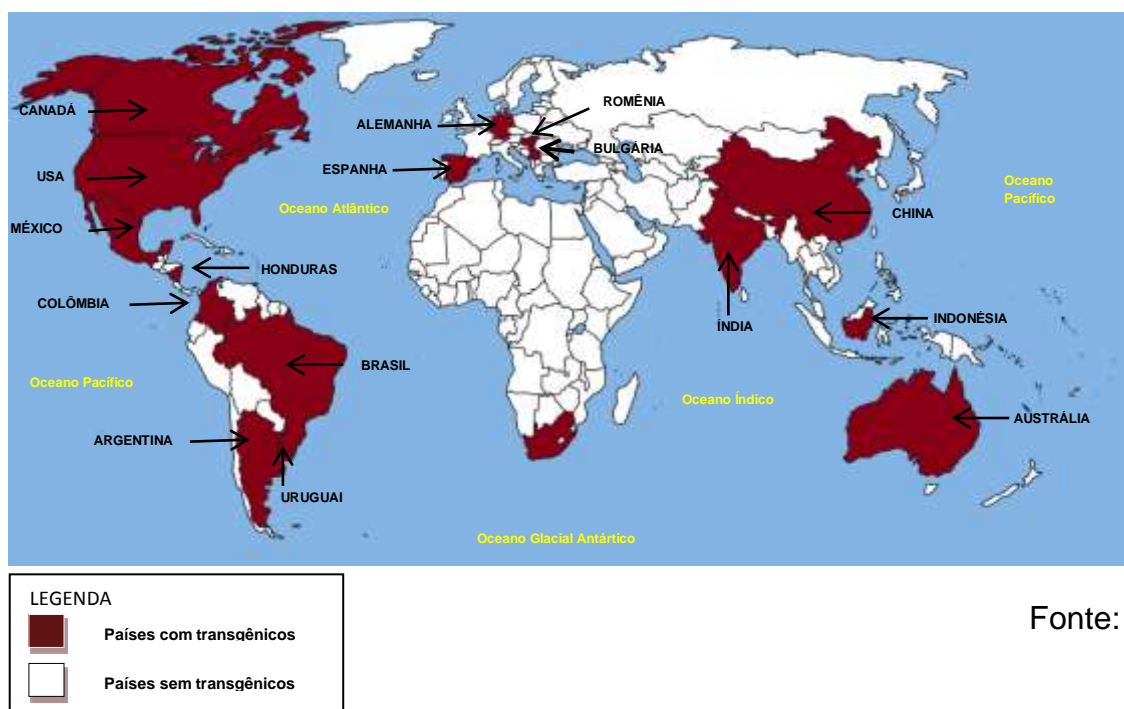
# **Capitulo 2 – Revisão Bibliográfica**

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Transgênicos

Devido à demanda do mundo por alimentos, muitos trabalhos de pesquisa têm sido desenvolvidos, alguns com a finalidade de reduzir os riscos da fome, outros para evitar desabastecimento e perdas na lavoura. A utilização de Organismos Geneticamente Modificados tem sido empregada em diversas culturas (milho, soja, trigo, etc.) porque conferem resistência a pragas de insetos e doenças em plantas, reduzem as perdas nas plantações ou podem realizar o enriquecimento das propriedades nutricionais(MARTÍN-FERNÁNDEZ, et al., 2014). A Figura 2 indica os países que possuem plantações transgênicas autorizadas.

**Figura 2: Países com plantações transgênicas.**



Fonte: autora

Os Organismos Geneticamente Modificados apresentam duas classificações: organismos cisgênicos e intragênicos. Os organismos cisgênicos são aqueles derivados de elementos inseridos que não podem ser rearranjados e os intragênicos os elementos inseridos, que podem ser remodelados. A última indica que quando o DNA adicionado é derivado de uma espécie distinta, de forma que o fragmento não possa trocar genes, naturalmente, recebe a denominação de transgênico (HOLST-JENSEN, et al., 2012).

A grande maioria dos países apresenta legislação que busca proteger os usuários de alimentos transgênicos, estabelecendo limites para sua comercialização e etiquetagem (MICHELINI, *et al.*, 2008).

Exemplo de tomada de decisão relacionado ao consumo consciente é o dos países que compõem a Comunidade Europeia. Esses buscam informações relacionadas a quantificação e ao reconhecimento de transgênicos, inclusive arcando com o custo mais elevado para o consumidor caso esse alimento esteja livre de modificações genéticas. Por outro lado, diversos países utilizam alimentos transgênicos sob a alegação de maior disponibilidade, melhor qualidade e enriquecido com nutrientes específicos, mesmo sem informação de rótulo.

Existe uma classificação baseada na informação do DNA usando distintos parâmetros: a origem dos elementos genéticos de interesse, o conhecimento da informação da sequência de DNA e a classificação legal dos Organismos Geneticamente Modificados, que está descrito detalhadamente em Holst-Jensen, *et al.*, 2012.

Atualmente é importante a utilização de técnicas de triagem que levem de forma rápida e com custo eficiente à discriminação das amostras, a fim de detectar a presença ou certificar a ausência de espécies com elementos comumente encontrados nos mais diversos OGMs, pois essa distinção mostra o conteúdo transgênico ou não de OGMs, isto é, essas práticas estão relacionadas com a Biotecnologia.

Para tornar o processo mais rápido e de menor custo, utiliza-se uma abordagem por matriz em etapas. A primeira é estabelecer uma relação matricial. Essa matriz é uma tabela que traz representação da presença ou ausência do *target* analítico para um conjunto de GMO (COMMISSION, 2003).

É importante explicar o sentido matemático que envolve a relação entre duas variáveis sobre a matriz de expressão: o OGM e o módulo de detecção analítica de um elemento nele contido; neste trabalho, o módulo *target* (como alvo) (HOLST-JENSEN, *et al.*, 2012). Os resultados obtidos dessa aplicação de módulos de triagem de amostras são comparados com dados armazenados na matriz de dados. Depois disso, é observada a presença desses OGMs em amostras. A suposta presença pode ser examinada utilizando-se módulos analíticos particulares, tais como eventos

específicos em módulos de PCR, sendo também necessário um bom limite de detecção prático.

Este trabalho poderá ajudar a encontrar mais um tipo de controle de amostras apenas para distinguir com respeito à presença ou ausência de conjuntos limitados de “*targets*”. Enquanto isso é importante considerar o aspecto sobre a degradação do DNA porque reduz consideravelmente a detectabilidade dos Organismos Geneticamente Modificados (OGMs), devido ao menor contato da sequência de cópias do *target* que poderá estar presente em massa. Assim, o DNA pode atuar como um inibidor nesse caso do total de massa que excede uma concentração específica > 200 ng/μL em amostras de DNA, pois inibe a amplificação por PCR, inibindo a enzima DNA polimerase (HOLST-JENSEN, *et al.*, 2012).

O estudo de OGMs envolve a quantificação e como ela pode ser expressa como uma porcentagem do número de cópias do DNA modificado em relação ao número de cópias do grupo de DNA taxonômico, que pode ser calculado em termos de genomas haploides (BALLARI, *et al.*, 2013).

A preocupação com a calibração é estimada a partir de um coeficiente de determinação  $R^2$  que seja apropriado à linha de regressão experimental. O “*European Network of GMO Laboratories*” apresenta um guia que tem como referência de  $R^2 \geq 0,98$  (MICHELINI, *et al.*, 2008). Existem dois parâmetros importantes: o LOD (Limite de Detecção) e LOQ (Limite de Quantificação), tendo como o menor valor de probabilidade  $\geq 95\%$  (BALLARI, *et al.*, 2013). É estritamente necessário, para compreensão, um limite absoluto menor que o número inicial do modelo de cópias que poderá ser detectado e quantificado, como foi descrito por (HOLST-JENSEN, *et al.*, 2012). Também, a precisão é importante e é avaliada em termos de desvio padrão (SD) e desvio padrão relativo (SRD).

As técnicas mais importantes deste trabalho são a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e a *Helicase Dependent Amplification* (HDA). A primeira representa de forma simples e eficiente as amostras de DNA amplificadas exponencialmente, repetindo três passos: desnaturação, anelamento e síntese com diferentes patamares de temperaturas (ANALYTICAL METHODS COMMITTEE, 2014) e a segunda, uma forma de amplificação de DNA que apresenta as mesmas etapas da técnica anterior, mas dispensa os ciclos de temperatura, ou seja, à temperatura constante.



Para cumprimento da legislação específica, é necessário identificar quantitativamente esse material genético, o que pode ser realizado pelas técnicas descritas.

Na Legislação da Comunidade Europeia, existem muitas culturas autorizadas de eventos geneticamente modificados, entre eles o milho, a soja e os que apresentam um número elevado de transgênicos e muitos desses transgênicos contém o promotor P35S do vírus do mosaico da couve-flor em sua constituição transgênica (FERNANDES, *et al.*, 2014). Atualmente a Regulamentação da Comunidade Europeia (EC) N° 1829/2003 apresenta grande preocupação com produtos modificados, orientando que produtos com mais de 0,9% de modificação genética devem estar etiquetados como transgênicos. As agências oficiais que realizam a identificação e quantificação desses produtos utilizam a técnica de PCR. A determinação por PCR é justificada porque apresenta alta estabilidade para ácidos nucleicos, comparada à de proteínas, sendo considerada a técnica padrão ouro (FERNANDES, *et al.*, 2014).

Muitos países, Brasil, Egito, Sérvia, Jordânia, África do Sul, Itália, Malásia, Arábia e Turquia, apresentam preocupação com suas populações, porque cultivam alimentos geneticamente modificados. Em apenas dois desses países foram confirmadas, por PCR, em produtos comercializados em supermercados, algum teor de transgênicos: nos produtos de supermercados brasileiros e jordanianos (FERNANDES, *et al.*, 2014).

As agências oficiais adquirem as amostras empregando um protocolo de extração do DNA para obtenção do material que deve ser amplificado. Depois, com essas amostras é realizada uma triagem para encontrar o promotor 35S e o terminador NOS. Esses, frequentemente, estão presentes em construções transgênicas e normalmente são detectadas por PCR em tempo-real (qPCR), usando sondas modificadas com marcas fluorescentes. Sobre os eventos identificados, por exemplo, em milho foram detectados apenas MON 810, NK 603 e TC 1507 em 2007 (FERNANDES, *et al.*, 2014).

Os pesquisadores encontraram em alguns produtos comercializados quantidades próximas a 4% de OGMs. É importante realizar um estrito controle pelas agências reguladoras para verificar a etiquetagem de acordo com a legislação sobre a presença de material geneticamente modificado em alimentos fornecidos ao

consumidor. Por exemplo, na União Europeia, existe uma conscientização para se obter maiores informações sobre as consequências desse tipo de consumo a longo prazo (HOLST-JENSEN, *et al.*, 2012).

No Brasil, a Lei de Biossegurança nº 11.105 (BRASIL, 2005) estabelece os aspectos de segurança e os dispositivos de fiscalização sobre a constituição, o cultivo, a manipulação, o transporte, a produção, a transferência, a importação, a exportação, o armazenamento, a pesquisa, a comercialização, as regras de consumo, a aceitação no meio ambiente e o descarte dos OGMs e seus derivados. A partir dela foi criado o Conselho Nacional de Biossegurança (CNBS), que é um órgão da Presidência da República para a formulação e implementação da Política Nacional de Biossegurança (PNB) *apud* (COSTA, 2008).

É importante citar a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que participa do aspecto de liberação dos transgênicos no Brasil, estabelecendo as diretrizes básicas para realizar a avaliação do risco e os aspectos de segurança desses alimentos, com foco na proteção da saúde da população e no controle sanitário de produtos *apud* COSTA, 2008.

Dentre os aspectos de caracterização de um organismo geneticamente modificado, destaca-se a necessidade de três etapas antes da comercialização: a detecção, a identificação do OGM presente na amostra e a quantificação desse OGM no produto que está sendo comercializado. Entre os produtos comercializados, o milho é um dos mais utilizados na alimentação nacional, bem como para exportação.

## **2.2 Milho MON 810**

O milho é a cultivar que está em segundo lugar no ranking das culturas de alimentos geneticamente modificados e com o maior número de ocorrências em alimentos e produtos derivados (FÁTIMA BARROSO, *et al.*, 2015).

Em 2007 a CNTBio realizou a aprovação comercial do milho transgênico resistente a insetos, o MON 810, que foi desenvolvido pela empresa Monsanto(COSTA, 2008).

A principal finalidade das técnicas de modificação genética é a criação de culturas com características especiais, tais como (a) que sejam tolerantes e

resistentes a herbicidas e (b) com enriquecimento nutricional. A Monsanto Company detém a tecnologia para a fabricação do milho da linhagem MON810, cujo nome comercial é “YieldGard<sup>®</sup>”, apresentando uma modificação genética específica que lhe confere resistência ao ataque da broca europeia do milho (BCE, *Ostrinia nubilalis*). Ela produz uma variação da proteína Cry1Ab, derivada do *Bacillus thuringiensis*, que está expressa no milho MON810 (COSTA, 2008).

A polêmica sobre a utilização do milho MON 810 sempre estimula o acompanhamento de órgãos oficiais em relação às consequências de sua utilização. Assim, tomando por base o último relatório da Autoridade de Segurança Alimentar Europeia (EFSA), que concluiu no seu Relatório Anual: “Entretanto, considerando que a metodologia para o monitoramento da resistência a insetos permanece inalterada, comparada aos relatórios anteriores da PMEM, o Painel dos OGM do EFSA reitera suas recomendações anteriores para a melhoria do plano de manejo da resistência de insetos ao milho MON 810...” (grifo nosso), citado no Parecer Científico sobre o monitoramento de degradação ambiental (PMEM) da Monsanto Europe S.A. sobre o cultivo de milho geneticamente modificado do tipo MON 810 em 2013. Também recomenda, de forma geral, vigilância à continuação das análises de triagem e discussão da literatura sobre os possíveis efeitos adversos do MON 810 sobre besouros. “Na ausência de informações sobre a vigilância geral do milho MON810, em 2013 o painel OGM da EFSA não pôde concluir sobre possíveis efeitos adversos imprevistos, devido ao cultivo no mesmo ano do milho MON 810 ou sobre possíveis alterações na metodologia comparada às temporadas anteriores de cultivo” (EFSA GMO PANEL (EFSA PANEL ON GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS), 2015).

Muitos documentos pretendem justificar a utilização autorizada e outros a vedação do cultivo do milho transgênico. Até que se estabeleça a relação custo – benefício e impactos ambientais versus riscos à saúde dos consumidores, é necessária a devida cautela. No Brasil, a liberação do plantio e da comercialização do milho transgênico MON 810 foi dada pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CNTBio) em fevereiro de 2008, sob fortes protestos (GREENPEACE, 2008).

## 2.3 Genossensores para a detecção de Organismos Geneticamente Modificados

Uma técnica para a identificação de uma sequência específica de DNA é a que utiliza um sensor eletroquímico com DNA (genossensor), através de uma reação de hibridização. É importante comentar que existem programas de computadores acessíveis (ZUKER, 2003) que podem predeterminar as estruturas secundárias de oligonucleotídeos de DNA ou RNA, que expõem parâmetros termodinâmicos associados ao evento de hibridização com o analito. O genossensor apresenta esses resultados com estudo dos sinais elétricos de cronoamperometria. Estes são resultantes do que está adsorvido em uma superfície eletroativa, onde ocorreu o acoplamento da sonda de fita simples de DNA, nas mesmas condições de deposição sobre os eletrodos de ouro (MIRANDA-CASTRO, *et al.*, 2009).

Os Organismos Geneticamente Modificados foram desenvolvidos para conferir, ao cultivar, determinadas características tais como: tolerância a herbicida; tolerância a determinados tipos de insetos; modificação da cor da flor; aumento do período de tolerância a intempéries; aumento do valor nutricional e de determinadas vitaminas; melhoria das características sensoriais. Todos esses fatores são relevantes tanto na importação e no processamento, bem como no cultivo isolado ou concomitante.

A disseminação desse tipo de vegetal com modificações genéticas tem crescido em todo o mundo e em muitos países o controle pode ser muito rigoroso. Os países da Comunidade Europeia são mais restritivos quanto à disseminação e comercialização dos transgênicos, seguindo o que está determinado em sua legislação e exigindo maiores informações sobre o que está sendo consumido. Entretanto, em outros países, esses informes são até ocultados da população, que em geral tem conhecimento apenas das características positivas provenientes dessa alteração gênica (HOLST-JENSEN, *et al.*, 2012).

A detecção de OGMs consiste em diferenciar entre a variedade não modificada e o organismo transgênico. Isso pode ser conseguido detectando-se o DNA transgênico inserido ou detectando-se a nova proteína expressa. Os métodos que estão baseados na determinação da proteína expressada são fundamentalmente métodos imunoquímicos baseados na união antígeno – anticorpo

(Ensaio ELISA). Sem dúvida, os processos tecnológicos que se têm utilizado com os alimentos afetam a integridade das proteínas, o que compromete a confiabilidade desses processos. Neste trabalho se optou por desenvolver um método baseado na determinação do DNA inserido que permitirá detectar o OGM de maneira confiável, independentemente do tratamento a que tenha sido submetida a amostra.

Muitos pesquisadores têm investigado e podem-se citar até o momento a utilização dessas técnicas para a triagem de Organismos Geneticamente Modificados: Multiplex PCR-CGE com detecção LIF; chip de capilaridade eletroforese e sistema LIF; ensaio de hibridização por PCR bioluminométrica; biossensor DNA baseado em nanopartículas; Multiplex PCR acoplada com microrraios de oligonucleotídeos; chip de microrraios Multiplex DNA; e PCR Multiplex. Entre os diferentes tipos de *target* conhecidos e utilizados até o momento, temos: sequências Bt11; MON 810; T25 e GA21; Bt 11 e Bt 176; terminador NOS; promotor 35S e lecitina (gene referência); sequências do promotor P35S; promotor NOS; terminador NOS; promotor FMV35S; terminador NptI; milho 176; MON 810; CBH351 e T25; canola Topas 19/2 e T45; e soja Roundup e proteína vegetativa inseticida (VIP) 3A (MICHELINI, *et al.*, 2008).

As patentes WO 2008/085540 A2(DENG, 2008) e US 2009/0118136 A1(DENG, 2009) tratam de um ensaio para a detecção de sequências de nucleotídeos em culturas e plantas geneticamente modificadas, utilizando filmes ópticos finos tipo chips de biossensor; a EP 1 760 160 A2(CHOU, 2007) relata métodos e kits para a detecção de OGMs, especialmente em soja, todos utilizando a reação de hibridização.

Um dos objetivos dos pesquisadores é investigar a presença de vários OGM, utilizando técnicas de baixo custo e que apresentam elevadas seletividade e sensibilidade, entre as quais se destacam os genossensores.

Biossensores são dispositivos analíticos que são utilizados na tradução de eventos biológicos através de sinais que podem ser medidos. Essa medida consiste no reconhecimento dos elementos biológicos através de uma reação de hibridização. O reconhecimento dos elementos biológicos em genossensores que utilizam sequências de DNA chamadas sondas, são complementares à sequência de DNA de interesse (*target*). O DNA utilizado é especialmente selecionado para a constituição desses dispositivos e apresenta elevada especificidade devido à

interação dos pares de bases envolvidos nas sequências de DNA (MANZANARES-PALENZUELA, *et al.*, 2015).

Uma das conquistas mais importantes é a revisão da transdução eletroquímica que é efetiva na detecção de sequências de Organismos Geneticamente Modificados (ARUGULA, *et al.*, 2014). As principais vantagens das técnicas eletro-analíticas são a relativa simplicidade, a elevada especificidade, a utilização de equipamentos de baixo custo, além de portáteis e de respostas automáticas em tempo real (MANZANARES-PALENZUELA, *et al.*, 2015).

Um genossensor apresenta os seguintes estágios: (1) imobilização da sonda de DNA na superfície do eletrodo; (2) hibridização da sequência de DNA *target*; (3) marcação enzimática e posterior determinação por leitura eletroquímica, sendo que a otimização desse último, melhora a performance do dispositivo.

A obtenção da melhor estratégia de imobilização consiste em selecionar a melhor superfície. No caso de substratos de carbono, uma imobilização covalente utilizando etilenodiamina é um exemplo de conector do sítio de imobilização como descreve (XU, *et al.*, 2006).

Outros materiais utilizados como substratos são os nanotubos de carbono do tipo *single-walled* (SWCNT) ou de parede simples e *multi-walled* (MWCNT) ou de paredes múltiplas devido às suas propriedades físico-químicas, como elevada estabilidade, alto potencial elétrico de condutividade e excelente resistência mecânica, sendo normalmente empregados em nanoestruturas (MANZANARES-PALENZUELA, *et al.*, 2015).

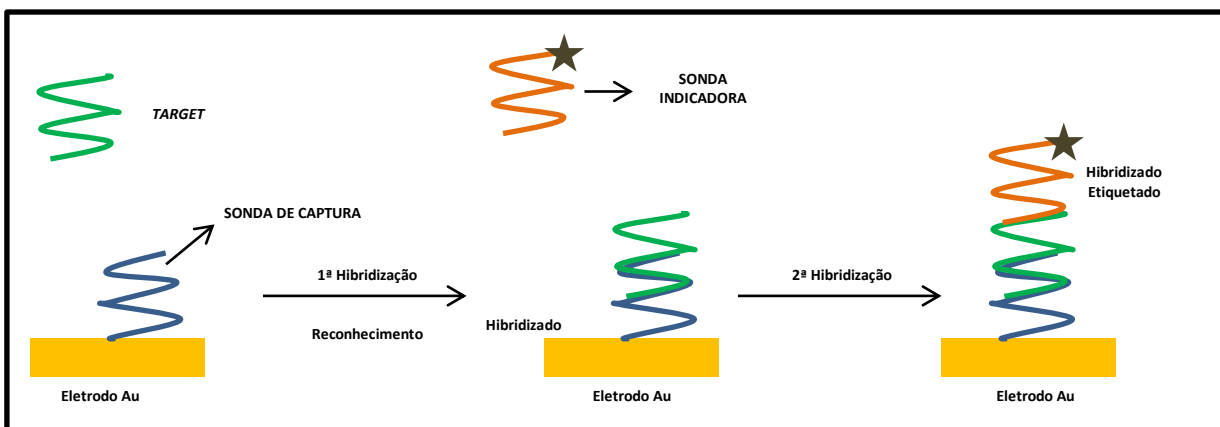
Já as superfícies de ouro, atuando como substrato, apresentam vantagens, pois favorecem a formação de *self-assembled monolayer* (SAM), (monocamadas automontadas), o que fornece uma superfície bem definida e organizada, flexível e conveniente, proporcionando um sistema simples susceptível para a imobilização de DNA tiolado (CHEN, *et al.*, 2006).

Entre os distintos formatos possíveis de ensaios, selecionou-se um ensaio tipo *sandwich* em que participam três fitas de DNA: uma sonda de captura imobilizada, a sequência de DNA ou analito e uma terceira sequência complementar marcada no outro extremo do analito chamada sonda indicadora. A marcação unida à sonda indicadora informa se a hibridização ocorre ou não. Com um ensaio

*sandwich* se consegue uma maior seletividade e ocorrem dois processos de reconhecimento molecular.

O processo de hibridização ocorre em duas etapas no formato *sandwich*: uma hibridização homogênea e uma hibridização heterogênea; a primeira, onde a extremidade de uma fita complementar dentro de dois fragmentos aumenta as chances de uma forte complementaridade. Depois, a segunda permite adicionalmente o acoplamento do *target* estável com uma sonda sinalizadora sobre a superfície hibridizada do eletrodo de trabalho, que é posteriormente marcado com uma enzima e que gera um sinal de detecção que pode ser medido por técnica eletroquímica, como mostrado na Figura 3 (MARTÍN-FERNÁNDEZ, *et al.*, 2014).

**Figura 3: Esquema de ensaio de hibridização tipo *sandwich*.**



Fonte: autora

A etapa da detecção eletroquímica utiliza o equipamento potenciostato/galvanostato (Figura 4) que registra a corrente no tempo, quando da aplicação de potencial no tempo, dessa forma as técnicas mais utilizadas nesses equipamentos são a voltametria cíclica (potencial x corrente) e a cronoamperometria (corrente x tempo) (BARD, *et al.*, 2000).

**Figura 4: Potenciostato/galvanostato para medidas eletroquímicas.**



Fonte: autora

A detecção do evento específico de MON 810 requer a seleção de um fragmento de DNA para a construção do transgênico por meio de técnicas de Biologia Molecular. Vale destacar que cada alteração no organismo resulta de uma locação diferente do gene inserido de DNA contendo o genoma do organismo inserido, guardando a proporção de fragmento de DNA da sequência entre o conteúdo do genoma e do DNA inserido para o evento específico (FÁTIMA BARROSO, *et al.*, 2015).

Um dos parâmetros mais importantes na detecção qualitativa ou quantitativa dos Organismos Geneticamente Modificados é o limite de detecção (LOD) que é calculado a partir de três vezes o valor do desvio padrão da medida encontrada para a medida relacionada ao branco (valor encontrado na ausência da amostra), dividida pelo coeficiente linear da curva de calibração que deve ser determinado para todo caso de genossensores. No entanto para realizar o processo de detecção em amostras, é necessário realizar uma amplificação do DNA encontrado nas mesmas.

#### **2.4. Técnicas de amplificação de DNA**

Dentre as técnicas de amplificação de DNA, a mais utilizada é a PCR (*Polimerase Chain Reaction*), a qual atualmente é a técnica referência ou técnica ouro na detecção de transgênicos. Dentre as outras, destacamos a técnica de HDA (*Helicase Dependent Amplification*) devido à sua praticidade, pois dispensa os ciclos de temperatura normalmente utilizados na PCR. Com o objetivo de aumentar a



sensibilidade do método de detecção do DNA, essas duas técnicas podem ser acopladas ao sensor eletroquímico para determinação do teor de transgênico em amostras de produtos de Organismos Geneticamente Modificados (ALLISSON, 2007).

#### **2.4.1 Polimerase Chain Reaction – PCR – Reação em Cadeia da Polimerase**

A reação em cadeia da polimerase é uma técnica potente aplicada para amplificar exponencialmente o DNA através de três etapas básicas: desnaturação, anelamento e síntese. A PCR é frequentemente empregada para detecção de rDNA e também no monitoramento de rotina de materiais crus ou de alimentos processados e também na verificação da quantidade de transgênicos em alimentos classificados anteriormente (VAN EENENNAAM, *et al.*, 2014).

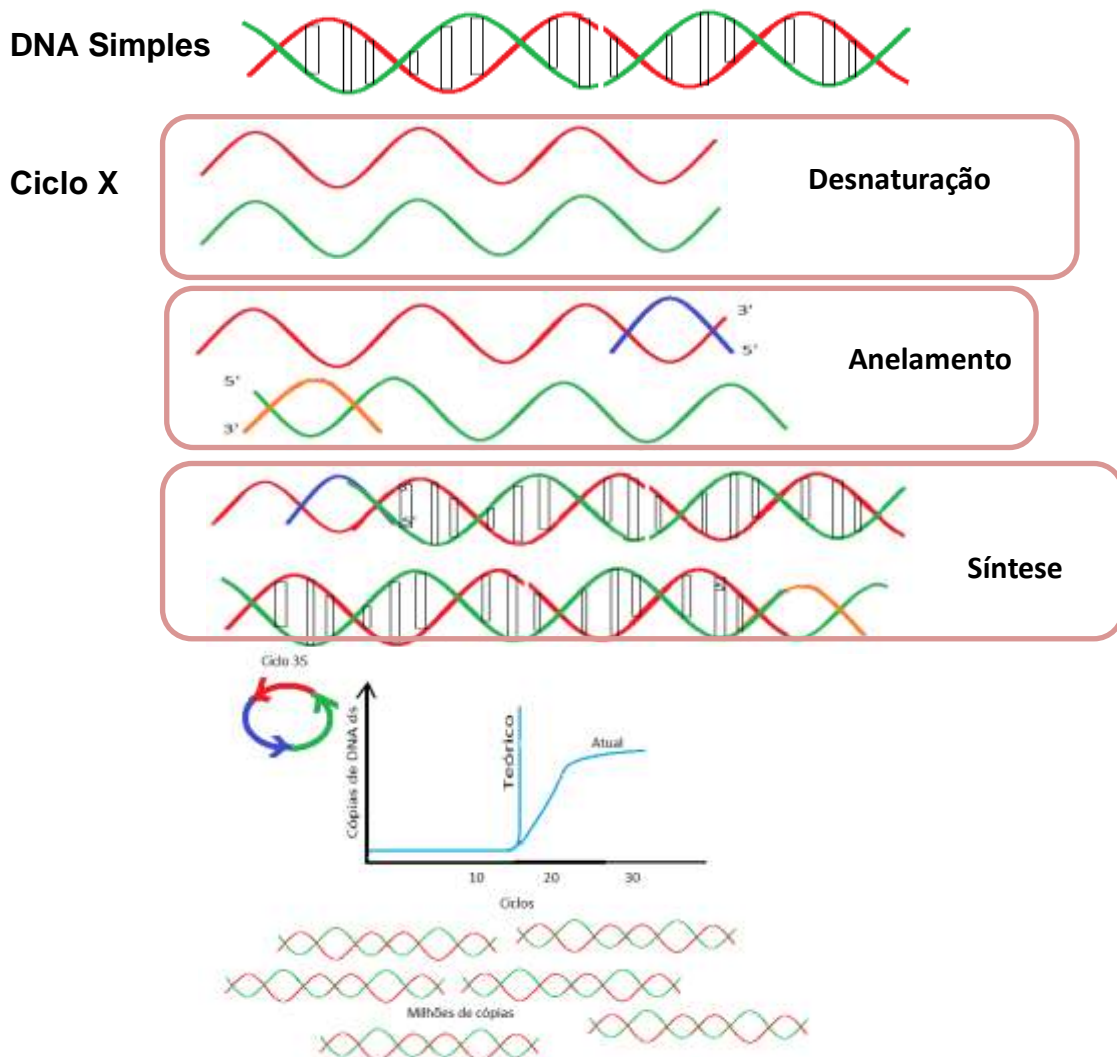
A PCR é a técnica estabelecida mundialmente para testar as demandas de OGMs, cujo principal objetivo é detectar elementos reguladores comuns (promotores e terminadores) que foram introduzidos no DNA de interesse. A técnica fornece especificidade e seletividade nos processos de detecção de Organismos Geneticamente Modificados, entretanto apresenta a desvantagem de necessitar de instrumentação cara, tais como termocicladores, o que inviabiliza sua utilização *in situ* (KOLM, *et al.*, 2015).

A amplificação do DNA por PCR envolve as etapas de desnaturação do DNA, a utilização de um *primer* de anelamento, um *primer* de extensão (incluindo apenas um par de *primers*) e a efetiva amplificação do DNA que é detectado mediante eletroforese em um gel de agarose com detecção ultravioleta, empregando brometo de etídio (KIVLEHAN, *et al.*, 2011).

A Figura 5 ilustra um esquema de PCR. A etapa A está relacionada a desnaturação, que é o processo de separação das fitas de DNA por aquecimento. Em geral, a temperatura aplicada no processo de desnaturação está entre 90 e 94 °C. Nessa etapa ocorre a quebra das ligações de hidrogênio entre os pares de bases Adenina e Timina, Guanina e Citosina como molde para o ciclo de amplificação. A etapa B (anelamento) é caracterizada pela redução da temperatura para um intervalo entre 55 e 70 °C, que permite que os *primers* de PCR se liguem às fitas simples de DNA, ocorrendo assim o anelamento. Para que essa etapa seja efetivada

de forma eficiente são importantes alguns parâmetros: (1) o comprimento dos *primers* (entre 18 e 22 pares, pois seu comprimento influencia na taxa de hibridização do *primer* para o molde de DNA); (2) a temperatura de fusão (que é determinada pela equação  $T_m = 4 [G + C] + 2[A + T]$ , onde G,C,T e A são o número de nucleotídeos na sequência- *primer*); (3) o conteúdo de GC (que deve estar entre 40 e 60%, para permitir um anelamento estável dos *primers*, porque no caso dos moldes de fitas simples o número de pontes de hidrogênio é diferente); (4) o comprimento do DNA *target* (que depende do fragmento do DNA copiado, obtendo-se os DNAs amplificados longos, o que pode ser dificultado pela pouca eficácia da amplificação); e (5) a formação das estruturas secundárias (para reduzir a formação de dímeros de *primers* ou dimerização cruzada).

**Figura 5: Esquema de PCR.**



A etapa C (elongação) é feita com a elevação da temperatura para um intervalo entre 70 e 75 °C, que é a temperatura ótima para que a DNA-polimerase realize a síntese de novas fitas de DNA a partir dos *primers* anelados. Em geral, o ciclo de amplificação por PCR é repetido em um termociclador entre 25 a 35 vezes para que seja obtida uma quantidade de DNA satisfatória para os ensaios posteriores. Esse ciclo é classificado como exponencial porque inicia com uma fita simples de DNA, depois do primeiro ciclo serão 2 cópias, no segundo ciclo serão 4 cópias, no terceiro ciclo serão 8 cópias e assim por diante. Dessa forma, existem diversos tipos de PCR; entre as que se destacam estão a PCR qualitativa e a PCR quantitativa em tempo real com detecção fluorescente (ANALYTICAL METHODS COMMITTEE, 2014).

#### **2.4.2 Helicase Dependent Amplification (HDA)**

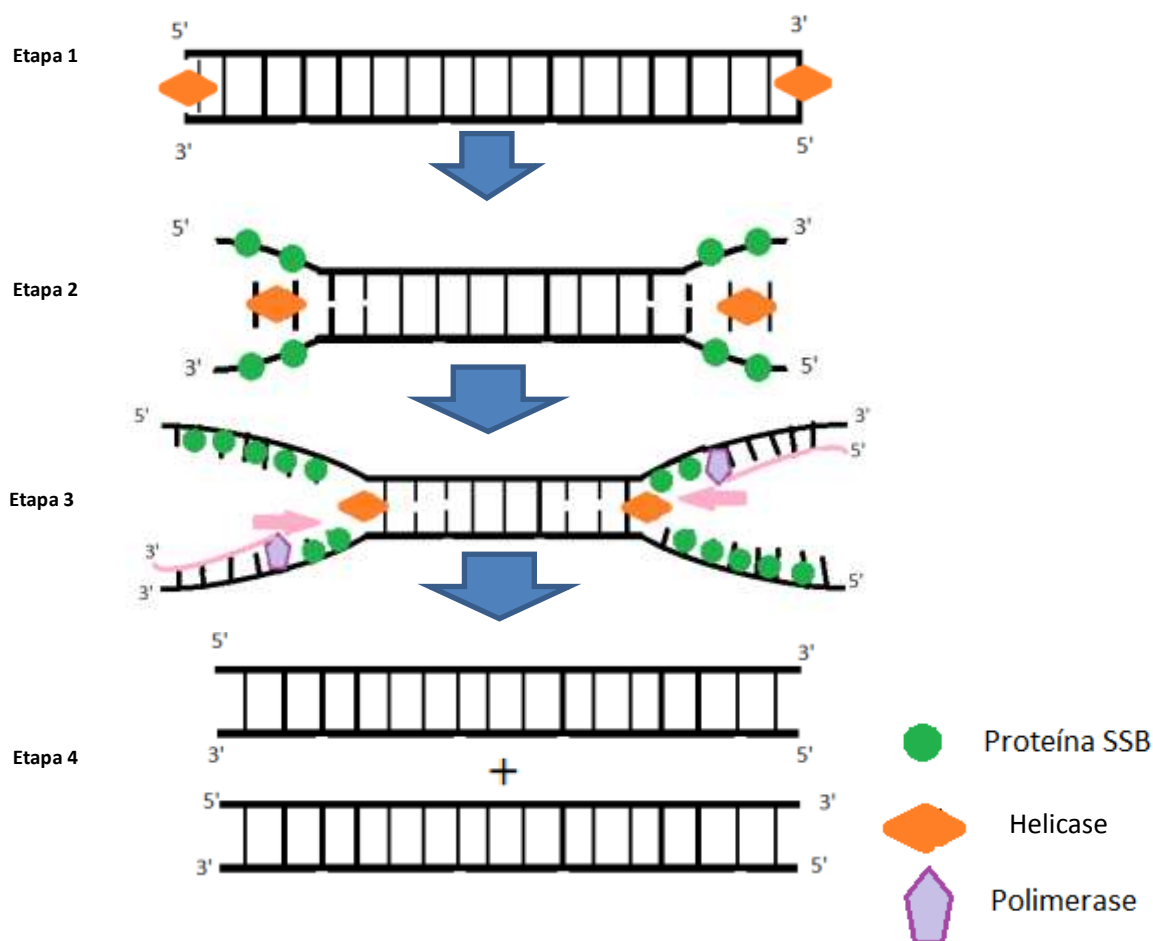
O emprego de métodos de amplificação alternativos à PCR que não requerem o uso de ciclos de temperatura, e portanto, sejam mais fáceis de automatizar e integrar com genossensores eletroquímicos, seria uma alternativa muito proveitosa. Foram desenvolvidos na última década numerosos métodos de amplificação isotérmicos de ácidos nucleicos (ANALYTICAL METHODS COMMITTEE, 2014) (LI, *et al.*, 2015) como *Rolling Circle Amplification* (RCA), *Loop – Mediated Isothermal Amplification* (LAMP), *Strand Displacement Amplification* (SDA), *Recombinase Polymerase Amplification* (RPA), entre outras. Um dos maiores atrativos da Amplificação Dependente da Helicase (HDA) é a simplicidade do seu esquema de reação e de sua natureza exponencial.

A *Helicase Dependent Amplification* (HDA) – Amplificação Dependente da Helicase utiliza a helicase para separar uma fita dupla de DNA (dsDNA) e gerar modelos de fitas simples para o *primer* de hibridização e subsequente extensão. A grande vantagem dessa técnica está relacionada à dispensa da realização do ciclo térmico que é requerido na PCR e que nesse caso é realizado enzimaticamente pela helicase. Assim, apresenta-se bastante simples, pois ocorre em apenas uma temperatura desde o início até o final do processo de amplificação do DNA (VINCENT, *et al.*, 2004).

Na Figura 6 está representado o processo de amplificação por HDA. As helicases estão aptas a promover o desenrolar das fitas duplas de DNA de forma enzimática, mantendo-se a temperatura constante, inclusive na etapa de desnaturação. E esse procedimento mimetiza o procedimento natural envolvido na amplificação de DNA em células. Esse tipo de amplificação apresenta uma eficiência entre 40 e 60% e dentro desse processo ocorrem todas as etapas de amplificação: desnaturação, anelamento e síntese (VINCENT, *et al.*, 2004).

Na Figura 6 a Etapa 1 é a separação da fita dupla da sequência *target* sem a elevação acentuada da temperatura, preparando, dessa forma, a fita simples para ser amplificada nas etapas seguintes (VINCENT, *et al.*, 2004). À medida que o DNA de fita dupla está sendo separado, é adicionada uma proteína para conter as religações das fitas. A Etapa 2 é a de amplificação, onde o DNA de fita simples do *target* é amplificado através da reação da polimerase e se realiza em temperatura constante. Na Etapa 3, a enzima (DNA – polimerase) pode se combinar com a helicase de forma coordenada, o que levará a uma combinação ideal (VINCENT, *et al.*, 2004). Na Etapa 4 o processo é reiniciado. Esse tipo de experimento já foi testado com o intuito de verificar a especificidade em amostras que contenham modificação genética ou não, com limite de detecção muito baixo. Essa é uma alternativa promissora quando tratamos de ensaios de triagem (ZHRADNIK, *et al.*, 2014). Um esquema geral de amplificação de DNA dependente da helicase é descrito por (JEONG, *et al.*, 2009), apresentando quatro etapas, como mostrado na Figura 6.

**Figura 6: Esquema de amplificação dependente da helicase modificado a partir de JEONG, et al. 2009.**



Fonte: autora

A Etapa 1 do esquema apresenta a fita dupla de DNA desenrolada pelo DNA helicase na presença de ATP e as fitas duplas separadas são revestidas pelas proteínas de ligação de fita simples (SSB). Na Etapa 2 do esquema ocorre o anelamento das duas sequências de *primers* específicos em cada fita simples do molde no final 3' e o DNA exonucleose-deficiente produz a fita dupla de DNA através da extensão dos iniciadores emparelhados com o *target*. A Etapa 3, finalização da síntese de DNA de uma outra cópia da fita dupla de DNA molde. Por fim, na etapa 4, as duas novas fitas de DNA sintetizadas são utilizadas como substratos pelo DNA helicase e dão partida ao novo ciclo de reação. Dessa forma, a amplificação exponencial da sequência de DNA *target* selecionado é possível em reações de cadeias simultâneas (JEONG, *et al.*, 2009).

É importante destacar a função das proteínas SSB, que são essenciais na replicação do DNA, pois mantém as fitas simples de DNA separadas, prevenindo o seu enrolamento, que é produzido pela atividade da helicase, evitando assim a recombinação e protegendo-os da degradação. As proteínas SSB também estão envolvidas na desestabilização da estrutura secundária do DNA e reforçam a atividade da polimerase (JEONG, *et al.*, 2009).

A técnica de amplificação por HDA tem potencial para ser utilizada em conjunto com um analisador de baixo custo portátil a tempo real capaz tanto de realizar a amplificação, bem como dos produtos da amplificação dentro da mesma plataforma, sendo relativamente mais barata que a técnica anterior (KIVLEHAN, *et al.*, 2011).

Na Tabela 1 as técnicas de amplificação apresentam vantagens e desvantagens. Observando o que traz a tabela, optamos por trabalhar com a HDA acoplada ao sensor eletroquímico para obter uma sensibilidade adequada para a detecção do promotor “P35S” de MON 810 que seja capaz de atender as normativas de transgênicos. Esse trabalho encontra-se descrito no artigo a seguir (versão publicada na Revista Analytical Chemistry no apêndice).

**Tabela 1: Comparativo de técnicas de amplificação utilizadas nesse estudo.**

<b>PCR a tempo real</b>	<b>HDA</b>
Temperaturas altas e com ciclo térmico	Baixas temperaturas e isotérmica
4 etapas	4 etapas
Uso de polimerase	Uso de polimerase
Não usa a proteína SSB	Usa a proteína SSB
Requer equipamentos caros e sofisticados	Requer apenas um bloco de aquecimento
Requer mão de obra qualificada	Não requer mão de obra específica

# Capítulo 3 – Objetivos

### **3. OBJETIVOS**

#### **Geral**

Desenvolver um sensor eletroquímico para detecção de organismos geneticamente modificados.

#### **Específicos**

Estabelecer os eletrodos a serem utilizados no processo;

Planejar como transdutor eletrodos de ouro para a imobilização da sequência de captura;

Selecionar sequências de DNA entre os diferentes elementos promotores e terminais mais utilizados em engenharia genética para a obtenção de organismos geneticamente modificados (OGMs);

Desenhar e confeccionar sensores que utilizem a reação de hibridização como reação de reconhecimento molecular;

Realizar os experimentos de detecção por técnicas eletroquímicas;

Estabelecer curvas de calibração para detecção quantitativa;

Avaliar as características analíticas dos dispositivos confeccionados.

Construir o sensor eletroquímico

Detectar de Organismos Geneticamente em amostras de milho

Estudar a eficiência da hibridização

Avaliar os resultados analíticos obtidos, por métodos estatísticos



# Capítulo 4 - Experimental

## 4. EXPERIMENTAL

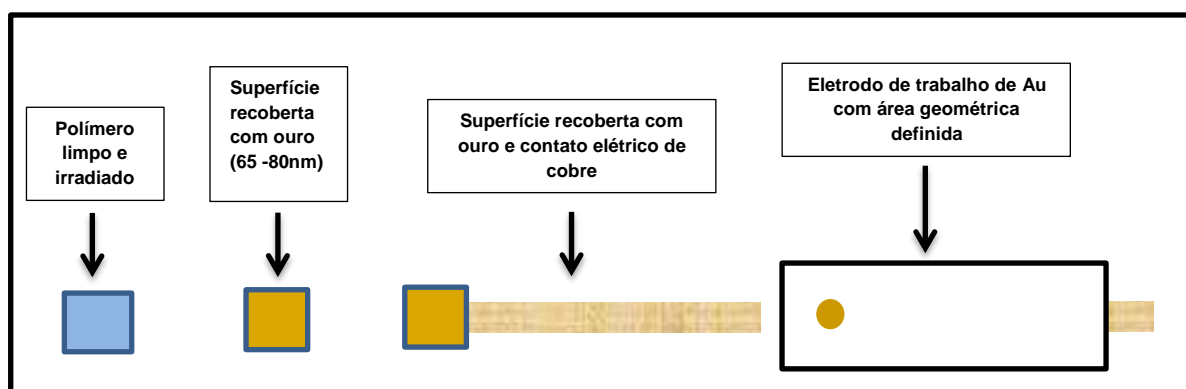
### 4.1 Instrumentação eletroquímica e construção do eletrodo de trabalho

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato,  $\mu$ Autolab type II, controlado pelo software GPES 4.9007 (Ecochemie B.V., The Netherlands), utilizando uma configuração convencional de três eletrodos. Os eletrodos foram: o de trabalho, feito de ouro, obtido por deposição física a vapor; o eletrodo de referência de Ag|AgCl|KCl(sat), com solução saturada de  $\text{KNO}_3$ , externa, para evitar a fuga dos íons de cloro da solução celular (0,201 mV com relação para SHE); e o contra-eletrodo de platina.

O eletrodo de trabalho, esquema de montagem na Figura 7, foi confeccionado a partir da deposição de um filme fino de ouro, realizada em uma câmara de vácuo Edwards 306, com revestimento para evaporação térmica de um fio de ouro (99,99% de pureza), em alto vácuo ( $10^{-6}$  torr) e subsequente condensação em uma peça de poliéster previamente irradiada com ultravioleta (365 nm) por 5 dias, a fim de aumentar a quantidade de insaturações no polímero, o que favoreceu a aderência do filme de ouro à superfície, resultando em uma folha banhada a ouro (camada de ouro com espessura entre 65 e 80 nm), que foi cortado em pequenos pedaços de cerca de 4 x 10 mm.

O contato elétrico é feito com uma fita de cobre adesiva que é fixada nesse pequeno fragmento uma fita plástica adesiva com um orifício de 2 mm de diâmetro para definir a superfície do eletrodo ( $0,0314 \text{ cm}^2$  de área geométrica). Finalmente, as laterais foram envolvidas com fita Teflon para proteger o eletrodo de infiltrações quando colocado em contato com a solução.

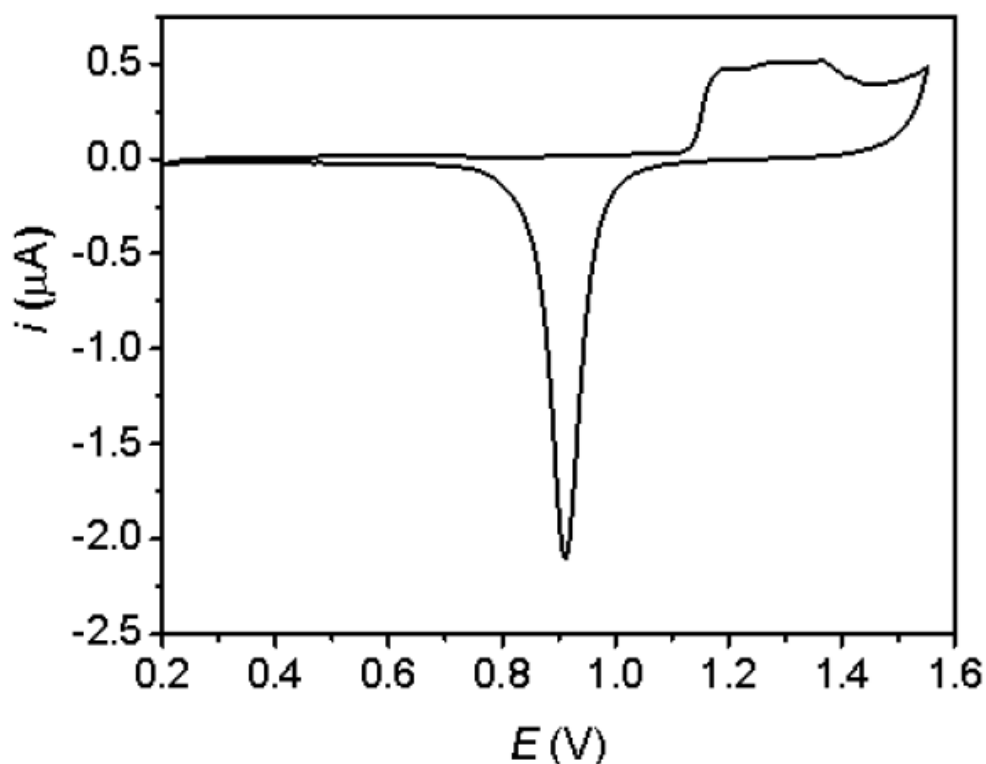
Figura 7: Esquema de montagem do eletrodo de trabalho de Au.



Fonte: autora

Para limpeza e condicionamento, a superfície de ouro foi mantida a um potencial de 1,8 V por 10 s. Depois, o eletrodo foi limpo eletroquimicamente com ciclos de potencial em pH ácido (taxa de varredura  $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ; em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5 M) em uma faixa de potencial entre 0,2 e 1,55 V, até que fosse obtido um voltamograma redox estável (Figura 8) típico de ouro policristalino. Depois, o eletrodo foi lavado com água tipo Mili-Q, seco com  $\text{N}_2$  e imediatamente modificado com a fase sensora.

**Figura 8: Voltamograma Cíclico do eletrodo de ouro policristalino limpo, em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5 M. Velocidade de varredura  $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$**

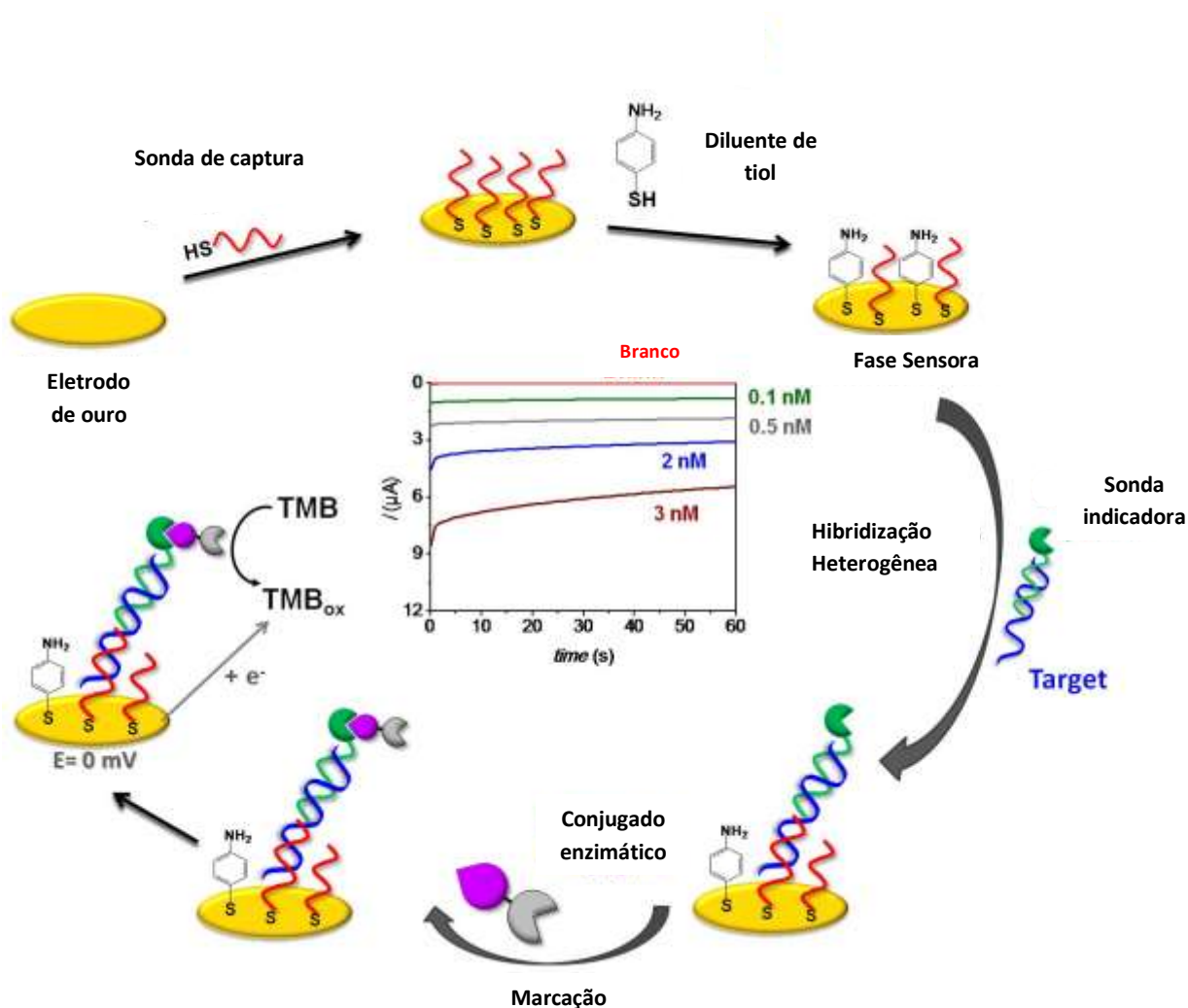


Fonte: autora

#### **4.2 Construção do sensor eletroquímico de DNA (genossensor)**

O desenvolvimento de um genossensor de formato tipo *sandwich* para a detecção do promotor P35S do vírus do mosaico da couve-flor, cujas etapas aparecem representadas na Figura 9: imobilização da sonda de captura; bloqueio da superfície; hibridização homogênea; hibridização heterogênea; marcação enzimática; e a determinação.

Figura 9 : Esquema das etapas do procedimento experimental



Fonte: autora

#### 4.2.1 Monocamadas automontadas (SAMs) de biomoléculas em eletrodos de metal (Au)

Esse tópico tem a finalidade de contribuir no entendimento desse procedimento experimental que está configurado num ensaio *sandwich* que utiliza esse sistema de monocamadas automontadas. A imobilização do DNA tem sido considerada a principal metodologia para a construção de biossensores de DNA. Eletrodos modificados com DNA têm sido utilizados para os estudos de reconhecimento molecular para detecção de genes e de interações de DNA com outras moléculas (CHEN, *et al.*, 2006).

A partir disso seguem as etapas utilizadas no estudo: imobilização da sonda de captura e aplicação do bloqueante; hibridização homogênea na qual ocorre a formação do dúplice entre sonda de *target* e sonda indicadora; a hibridização Heterogênea onde ocorre a formação do dúplice ternário que é configurado pelo acoplamento do dúplice formado na hibridização homogênea com a sonda de captura na superfície do eletrodo de ouro; e para concluir a construção do ensaio tipo *sandwich*, tem-se o acoplamento da enzima anti-fluoresceína – POD à fase sensora do eletrodo que poderá ser medido com medida eletroquímica.

#### **4.2.2 Design das sequências de nucleotídeos do genossensor**

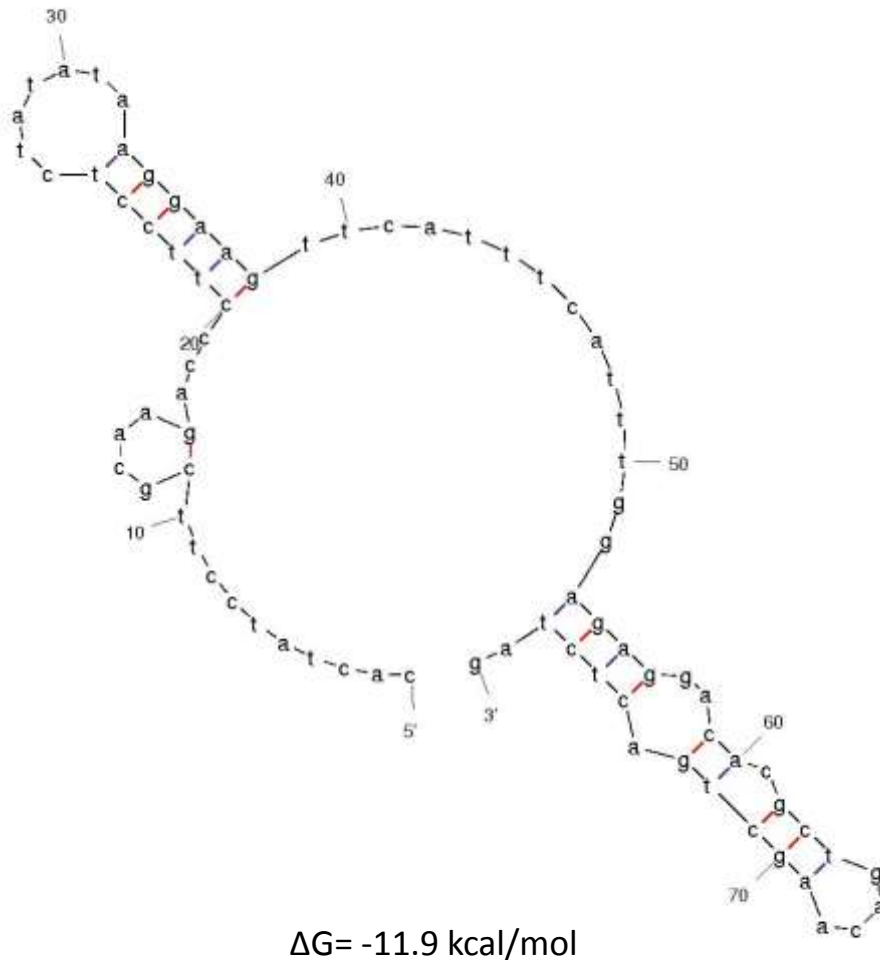
O processo de design de um genossensor começa com a escolha de ácidos nucleicos que serão utilizados como dupla fita. Esta sequência deve ser específica do organismo que se quer detectar. É buscada uma sequência de DNA que não tenha em outro ser vivo e que portanto não possa interferir na análise

Nesse caso particular, selecionou-se uma sequência com 80 nucleotídeos dentro de uma sequência do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor por ser um dos promotores mais utilizados em construções transgênicas. Para comprovar a especificidade, introduz-se esta sequência no programa BLAST e se compara com sua base de dados que contém sequências de genomas de todos os seres vivos. Das primeiras 100 comparações proporcionadas pelo programa, obteve-se entre 99 – 100% de coincidência no número de bases que se correspondem a um 100% como o promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor ou de construções transgênicas que o contém.

Para que o design do genossensor tenha êxito, a sequência dupla de DNA deve formar um híbrido estável com as sequências de captura e indicadora. Portanto, a tendência da sequência selecionada para formar estruturas secundárias internas deve ser destruída durante o processo de hibridização.

Empregando o programa MFOLD, obteve-se as estruturas mais estáveis em condições determinadas de temperatura e força iônica: 20 °C e a 0,3 M NaCl (Figura 10).

Figura 10: Estrutura mais estável de T80 (80-nt *target*) a 20 °C e 0,3 M Na<sup>+</sup> a partir do servidor MFold Web.



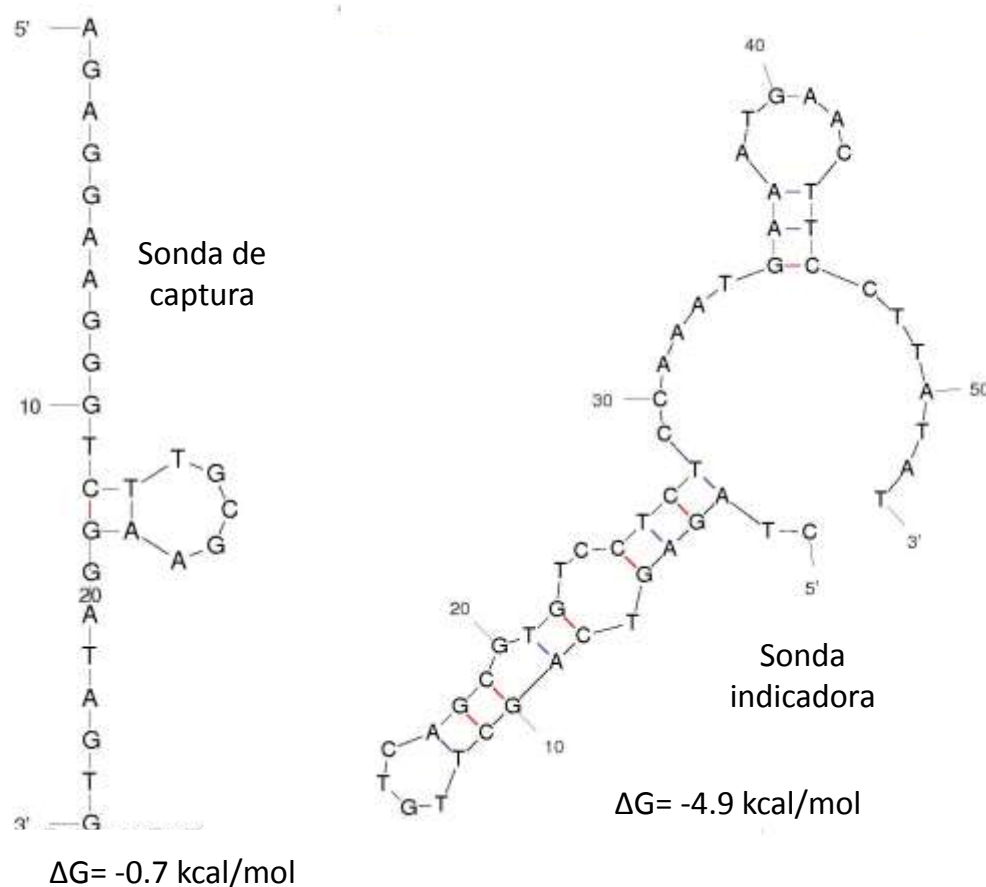
Fonte: (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold>).

O formato de ensaio *sandwich* exige um design de sequências de DNA complementares a distintas regiões da sequência analito; uma delas atuará como sequência de captura e se imobilizará sobre a superfície do transdutor; a outra funcionará como sequência indicadora.

Com o programa MFOLD provou-se distintas combinações de sonda de captura e sequência indicadora. Deve-se levar em conta as estruturas secundárias de todas as sequências que devem ser desfavoráveis em relação à reação de hibridização com a sequência de fita dupla de DNA. Portanto, buscam-se as

sequências com menor estrutura secundária que permita hibridizar com uma barreira energética o menor possível. Depois de avaliar-se os resultados, selecionaram-se as sequências que aparecem na Tabela 2 e cuja estrutura secundária se representa na Figura 11.

**Figura 11: Estrutura da sonda de captura e indicadora a 20 °C e 0,3 M Na+ a partir do servidor MFold Web.**

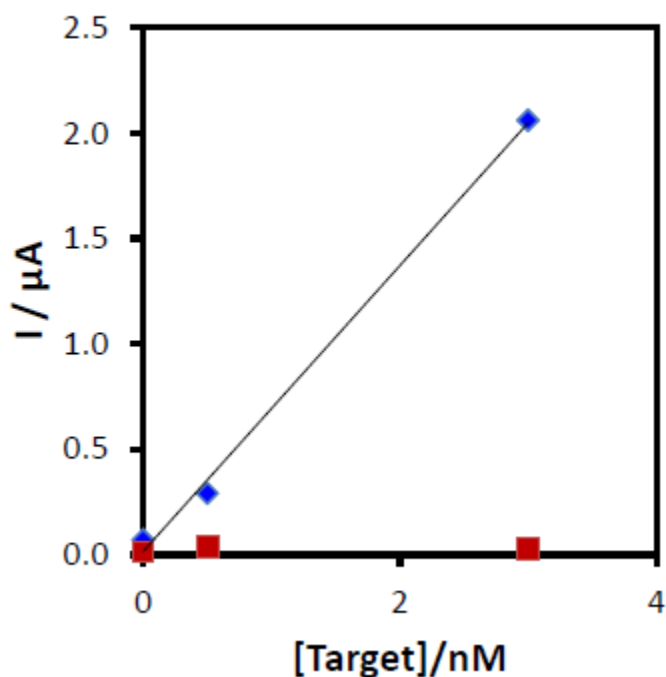


Fonte: (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold>).

Posteriormente, ao tratar-se de acoplar ao genossensor desenvolvido com uma etapa prévia de amplificação isotérmica por HDA empregando um par de *primers* que amplificam o analito de 80 nucleotídeos, observou-se uma interação de um dos *primers* (o *primer* direto) com a sonda de captura na etapa de hibridização, ou seja, os *primers* competiam pelos sítios de ligação. Na Figura 12 (representação analítica), as curvas de corrente *versus* concentração indicam que na presença do

*primer* o sinal de corrente se aproxima de zero, enquanto na ausência do *primer* o sinal é crescente e com um ajuste linear. Isso significa que, ao invés de acoplar a sonda complementar, ligou-se o *primer*, o que comprometeu a sensibilidade do sensor eletroquímico, anulando o sinal para as concentrações testadas (concentrações de *target* variaram entre 0 e 3 nM).

**Figura 12: Resposta do genossensor eletroquímico para concentrações de *target* variando entre 0 e 3 nM na ausência (azul) ou presença (vermelho) de 75 nM de *primer* direto**



Fonte: autora

Devido a essa interação do *primer* direto, reconfigurou-se a sequência do analito aumentando sua longitude até 105 nucleotídeos, o que permitiu a resolução do problema. A nova estrutura da sequência analito está representada na Figura 13



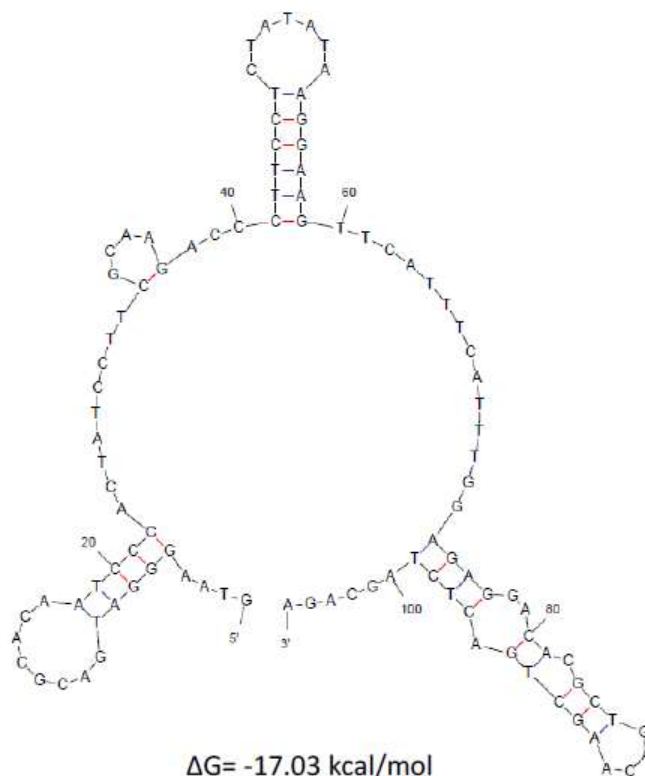
**Tabela 2. Sequências de *Target* Sintético, Sondas de Captura e Indicadora.**

Nome	Função	Oligonucleotídeos 5' → 3'
T <sub>80</sub>	<i>Target</i> 80 mer	CAC TAT CCT TCG CAA GAC CCT TCC TCT ATA TAA GGA AGT TCA TTT CAT TTG GAG AGG ACA CGC TGA CAA GCT GAC TCT AG
T <sub>105</sub>	<i>Target</i> 105 mer	GTA AGG GAT GAC GCA CAA TCC <u>CAC TAT CCT TCG CAA</u> <u>GAC CCT TCC TCT ATA TAA GGA AGT TCA TTT CAT TTG GAG</u> <u>AGG ACA CGC TGA CAA GCT GAC TCT AGC</u> AGA
CP	Sonda de captura	AGA GGA AGG GTC TTG CGA AGG ATA GTG-(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> SH
SP	Sonda indicadora	<b>FITC</b> -CTA GAG TCA GCT TGT CAG CGT GTC CTC TCC AAA TGA AAT GAA CTT CCT TAT AT

\*FITC: é um fluoróforo comumente utilizado como marcador de fitas de DNA.

\* O nucleotídeo modificado com o grupo tiol foi submetido na forma protegida com grupo dissulfeto para minimizar a oxidação que conduziria à formação de dissulfeto entre as próprias fitas de DNA. Por isso é necessário reduzir o grupo dissulfeto com ditioneitol (DTT). A dissolução foi purificada posteriormente com uma coluna de exclusão por tamanhos NAP-10 Sephadex G – 25 DNA Grade (GE helfthcare) e finalmente determinou-se por espectrofotometria a 260 nm a concentração dos oligonucleotídeos tiolados.

**Figura 13: Estrutura mais estável de T<sub>105</sub> (105-nt *target*) a 20 °C e 0,3 M Na<sup>+</sup> a partir do servidor MFold Web.**



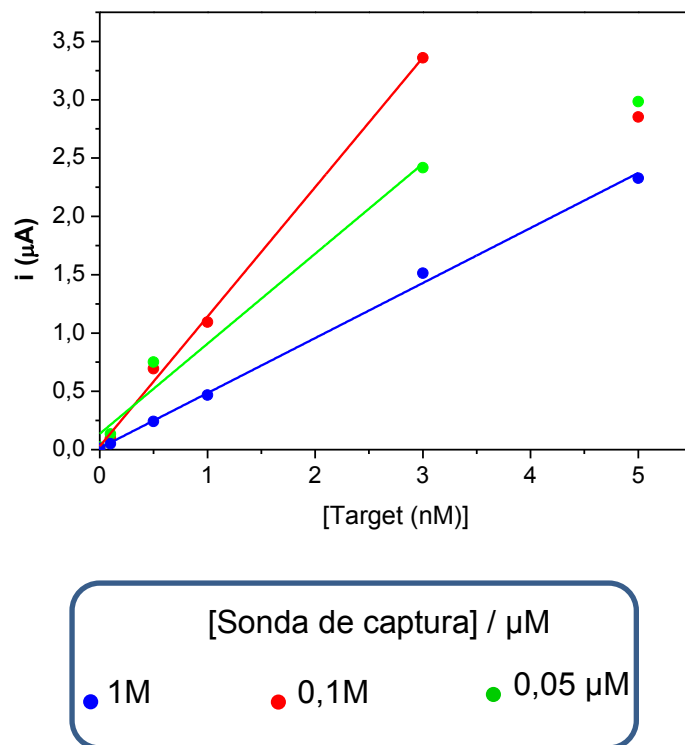
Fonte: (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold>).

#### 4.2.3 Estudo da concentração da sonda de captura

A concentração da sonda de captura na superfície do eletrodo pode interferir na sensibilidade de detecção do sensor eletroquímico.

A composição da fase sensora foi subsequentemente otimizada pela variação da concentração das sondas de captura nas seguintes concentrações: 0,1  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$  e 1  $\mu\text{M}$ . As concentrações de *target* testadas foram 0, 0,1 nM, 0,5 nM, 3 nM e 5 nM. Pode-se visualizar na Figura 14, que quanto maior a concentração da sonda de captura, menor sinal analítico, devido à redução dos sítios de ligação na superfície do eletrodo. O espaçamento ideal é essencial para a maximização da eficiência da hibridização e diminuição dos eventos de adsorção inespecíficos. Neste estudo, a concentração ótima de sonda de captura para a fase sensora foi de 0,1  $\mu\text{M}$ .

Figura 14: Efeito da concentração da sonda de captura.

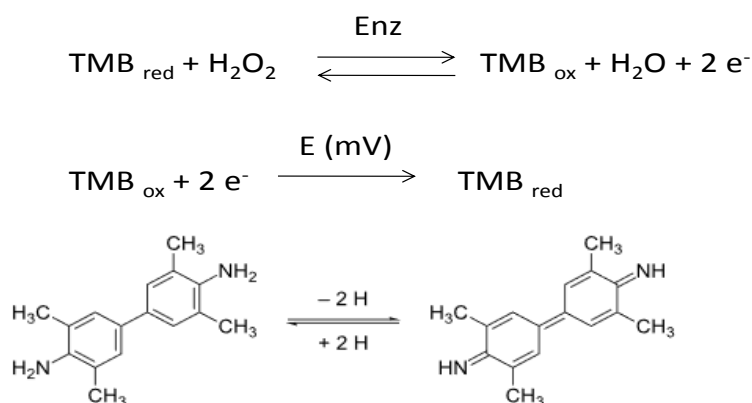


Fonte: autora

#### 4.2.4 Medida Cronoamperométrica

O sinal analítico é a intensidade de corrente elétrica gerada pela redução do produto de uma reação enzimática. Nesse caso, utilizou-se a enzima peroxidase conjugada com um fragmento Fab do anticorpo antifluoresceína. Como substrato enzimático empregou-se 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB), que na presença de  $H_2O_2$  e da enzima como catalisador se oxida mediante um processo que produz dois elétrons (Reação 1):

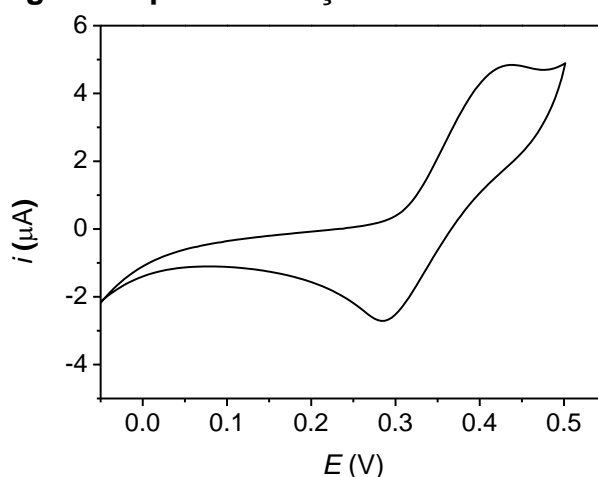
Reação 1: Reação na superfície do genossensor.



Aplicando-se um potencial adequado, reduz-se eletroquimicamente o TMB oxidado enzimaticamente à sua forma reduzida, originando-se uma corrente catódica que é o sinal analítico.

A técnica eletroquímica que utilizou-se para medir o sinal analítico foi a cronoamperometria, nela fixando-se um potencial constante, mede-se a intensidade da corrente durante um tempo determinado. Para avaliar o potencial que se deve aplicar sobre sistema, realizaram-se voltamogramas cíclicos do substrato para observar os processos eletroquímicos que ocorrem e a que potenciais ocorrem. Na Figura 15 mostra-se o voltamograma característico de TMB sobre a fase sensora.

**Figura 15: Voltamograma típico da reação em TMB.**



Fonte: autora

Observando o voltamograma da Figura 15, fixa-se um potencial de 0 mV, já que todo o TMB oxidado enzimaticamente se reduzirá completamente neste potencial. Aplicou-se o potencial durante 60 segundos e o valor do sinal analítico foi a média do sinal dos últimos 10 segundos, posto que o sinal nesse ponto está estabilizado.

A cronoamperometria é uma técnica eletroquímica que apresenta um potencial controlado. Consiste no registro da corrente gerada pela oxidação ou redução de espécies devido a um potencial externo aplicado em função do tempo. Durante a execução da medida, nem o eletrodo de trabalho, tampouco a solução eletrolítica são agitados. Os resultados obtidos são coerentes, pois a diferença de corrente mede a quantidade de enzima que está imobilizada na superfície do eletrodo, pois a enzima oxida a TMB (tetrametilbenzidina). Dessa forma, o transporte

de massas é somente por difusão e assim os resultados são decorrentes apenas do monitoramento da corrente versus tempo.

### 4.3 Amplificação isotérmica dependente de helicase (HDA)

#### 4.3.1- Seleção de *primers*

Utilizando-se o programa *Primer 3* e considerando-se os parâmetros recomendados no kit de HDA (Tabela 3), selecionou-se a sequência analito e os *primers* ou iniciadores mais adequados para a amplificação do promotor P35S do vírus do mosaico da couve-flor mediante amplificação isotérmica dependente de HDA.

**Tabela 3: Parâmetros de seleção de iniciadores segundo recomendações do kit HDA.**

Parâmetro	Valor mínimo	Valor ótimo	Valor máximo
Tamanho produto (bp)	80	80	120
Tamanho produto (°C)	68	71	75
Tamanho iniciadores (bp)	24	27	33
Tamanho iniciadores (°C)	60	68	74
% GC iniciadores	35	44	60

As sequências específicas e seu conteúdo GC mostra-se na Tabela 4.

**Tabela 4: *Primers* empregados na HDA**

Nome	Função	Oligonucleotídeos 5' → 3'
FP <sub>105</sub>	P35S-105- <i>primer</i> direto	GTA AGG GAT GAC GCA CAA TCC CAC TAT
RP <sub>105</sub>	P35S-105- reverso	TCT GCT AGA GTC AGC TTG TCA GCG TGT

#### 4.3.2- Condições de amplificação

As condições de amplificação por HDA, temperatura e composição da mistura de amplificação, foram otimizadas para o analito estudado. Os valores ótimos resumem-se na Tabela 5 a seguir:

**Tabela 5: Condições ótimas da amplificação por HDA**

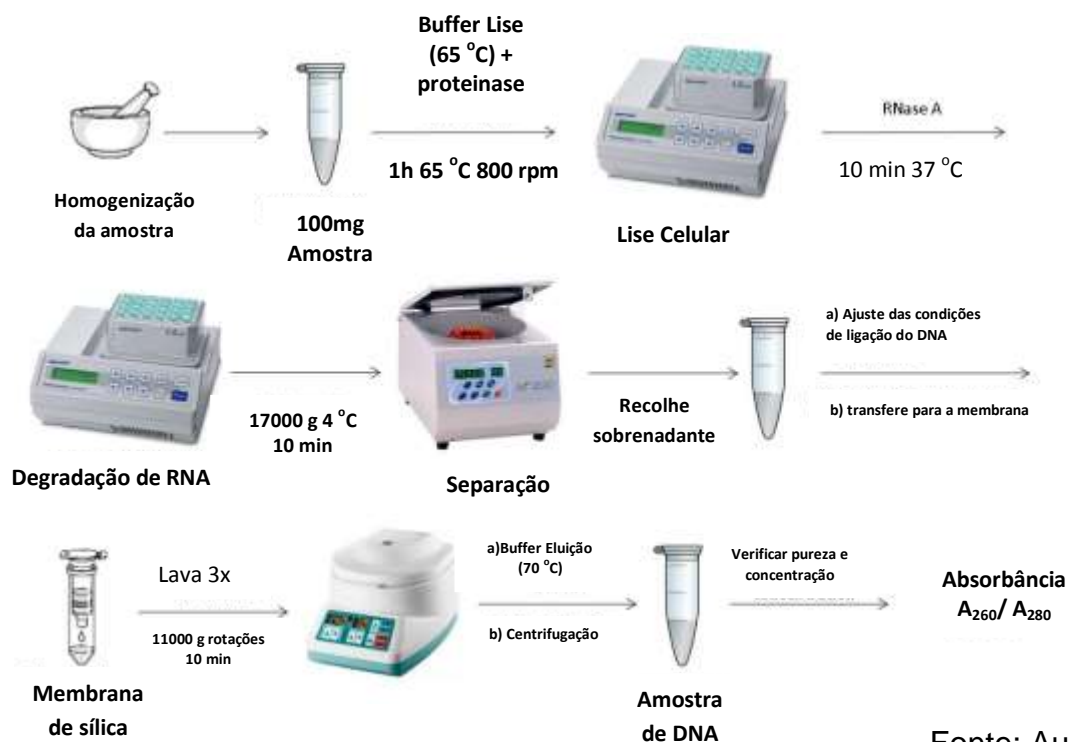
Reagente	Concentração Final	Volume ( $\mu\text{L}$ )/ reação
<i>Buffer</i> anelamento (10x)	1x	2.5
MgSO <sub>4</sub> (100 mM)	4mM	1
NaCl (500 mM)	40 mM	2
<i>Primer</i> FP <sub>105</sub> (0.75 $\mu\text{M}$ )	75nM	2.5
<i>Primer</i> RP <sub>105</sub> (0.75 $\mu\text{M}$ )	75 nM	2.5
IsoAmp® dNTP solução	7% (v/v)	1.75
EvaGreen (20x)	0.2x	0.25
ROX (50x)	1x	0.5
IsoAmp® Enzyme Mix	7% (v/v)	1.75
DNA molde	Variável	1
Volume Total de reação		25

A temperatura de amplificação mais adequada foi de 65 °C.

#### **4.4 Isolamento de DNA de amostras de alimentos: pureza e controle de qualidade**

O DNA utilizado neste trabalho foi extraído de amostras de farinha transgênica certificada de MON 810, utilizando-se o Kit NucleoSpin® para DNA genômico de acordo com as instruções do fabricante.

**Figura 16: Protocolo geral de extração de DNA de amostras alimentares**



Fonte: Autora

A Figura 16 representa o protocolo geral da extração de DNA de amostras alimentares. Consiste na homogeneização da amostra (farinha de milho certificada). Pesou-se 100 mg em um eppendorf e adicionou-se o buffer de lise e a proteinase a 65°C, colocou-se em agitação por cerca de 1 hora a 800 g em um termomixer ou agitador térmico. Essa primeira etapa consistiu na lise celular. Em seguida, realizou-se a etapa de degradação de RNA, onde adicionou-se ao eppendorf RNAase que foi deixado sem agitação por 10 minutos a 37 °C. Logo após realizou-se a separação com uma agitação de 17000 g a 4 °C por 10 min e separou-se o sobrenadante que contém o DNA da amostra de farinha. Para o ajuste das condições de ligação do DNA transferiu-se para o interior de uma membrana de sílica o sobrenadante, e após três lavagens com buffer sob centrifugação de 11000g numa centrífuga por 10 minutos. Posteriormente, ao sobrenadante que contém a amostra de DNA foi adicionado o buffer de eluição a 70 °C e sob centrifugação a 11000 g foi obtido o DNA da amostra. Para finalização do protocolo foi necessário verificar a pureza e a concentração da amostra de DNA através de medida de absorbância  $A_{260}/A_{280}$ .

**Tabela 6: Tabela descritiva das amostras certificadas de DNA de milho transgênico**

<b>Amostra certificada</b>	<b>Descrição</b>
ERM- BF4413 ak sample N° 0490	MON 810 MAIZE Blank
ERM- BF413 ek sample N° 0469	MON 810 MAIZE 2 %
ERM- BF413 gk sample N° 0248	MON 810 MAIZE 10 %
ERM- BF413 gk sample N° 0799	MON 810 MAIZE 10%

A concentração de DNA foi determinada para cada amostra pela determinação da absorbância a 260 nm em espectrofotômetro UV-vis (Cary 60 Agilent) com uma cubeta espelhada para ultramicrovolume (1 mm de caminho óptico), permitindo a medida direta a partir de 3 µL de amostra de DNA. A pureza do DNA foi determinada a partir da razão de absorbância  $A_{260}/A_{280}$  (valores que variam entre 1,7 e 1,9 de acordo com o kit de especificações).

A PCR convencional foi realizada como controle de qualidade do DNA utilizando o par de *primer* FP<sub>159</sub>/ RP<sub>159</sub> (Tabela 7). Os resultados de PCR foram avaliados por eletroforese (*buffer* de corrida 1xTBE) em 2% (m/v) em gel de agarose com corante de brometo de etídio (0,5 µg/ mL) a 90 V. A visualização do DNA em gel de agarose (UV transiluminador) mostrou uma banda simples com o tamanho esperado (cerca de 190 pb), comparado ao padrão de DNA (100 bp DNA Ladder, Invitrogen). O resultado dos fragmentos amplificados foram purificados (Kit Gel de extração E.Z.N.A., Omega Bio-Tek) para serem sequenciados, utilizando-se o Kit Genome Walker (Clontech, USA) juntamente com o analisador ABI PRISM 3130xl. As sequências foram comparadas com o que está armazenado no GenBank, utilizando-se o algoritmo NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), confirmando a identificação da amostra (cloroplasto *Zea mays* cultivar B73 número de registro AY928077.1) com 99% de homologia.

As extrações de branco foram realizadas em paralelo e sua absorbância e amplificabilidade por PCR foram avaliadas, levando aos resultados negativos esperados.

Os extratos de DNA foram aliquotados e estocados a (-20 °C) até sua utilização e a repetitividade dos ciclos de congelamento e descongelamento foram minimizados a fim de manter a integridade das amostras.



**Tabela 7: Par de primers FP<sub>159</sub>/ RP<sub>159</sub> utilizado na PCR convencional**

Nome	Função	Oligonucleotídeos 5' → 3'
FP <sub>159</sub>	Primer direto de planta 159	CTT GAT TTT ACC AAA GAT GAT GA
RP <sub>159</sub>	Primer reverso de planta 159	TTC TTC GCA TGT ACC CGC AG

#### 4.5 Preparo das amostras com DNA amplificado por PCR e/ou HDA

Utilizando a Lei de Lambert Beer, que é regida pela fórmula:

$$Abs = \varepsilon . b . c$$

Onde:  $\varepsilon$  é o coeficiente de extensão molar em  $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ ; b é o caminho óptico (cm); c é a concentração ( $mol \cdot L^{-1}$ ).

$$[ ] = \frac{L}{mol \cdot cm} \cdot cm \cdot \frac{mol}{L}$$

$$[ ] = ua$$

Para o cálculo da concentração do DNA temos:

$$DNA \rightarrow \lambda_{m\acute{a}x} = 260 \text{ nm}$$

OD = densidade óptica

$$1 \text{ OD} \approx 50 \text{ ng / mL}$$

$$\text{Para proteínas} \rightarrow \lambda_{m\acute{a}x} = 280 \text{ nm}$$

Temos a avaliação da relação  $\lambda_{260} / \lambda_{280}$ , que valores entre 1,8 e 2 são excelentes quanto à qualidade de extração do DNA e que valores entre 1,5 e 1,8 podem ser perfeitamente utilizados.

Para uma amostra de MON 810 com 10% temos:

A amostra tem 104 ng/ $\mu$ L e foi utilizado 1  $\mu$ L de extrato em 25  $\mu$ L de mistura (mix de amplificação). Dessa forma, temos 104 ng de DNA de milho.

1 genoma de milho tem no total 2,6 pg, o que está determinado para MON 810 hemizigótica. (SALVI, *et al.*, 2008).

Dessa forma temos:

$$104 \text{ ng} \cdot \frac{10^3 \text{ pg}}{1 \text{ ng}} \cdot \frac{1 \text{ genoma de milho}}{2,6 \text{ pg}} = 4 \cdot 10^4 \text{ cópias de DNA de milho total}$$

$$4 \cdot 10^4 \text{ cópias de milho} \cdot \frac{10 \text{ cópias de transgênico}}{100 \text{ cópias de milho}} \cdot \frac{1 \text{ MON 810}}{2 \text{ cópias}} = 2000 \text{ cópias}$$

A partir desses cálculos foi possível construir a Tabela 8 com as relações de MON 810 testadas nesse estudo:

**Tabela 8: Relações de MON 810 testadas nesse estudo de detecção**

% MON 180	Nº cópias MON 810	Log do número de cópias	Amostras testadas
-	0		1/1 MON 810 10%
10	1000	3	½ MON 810 10%
5	500	2,698970004	1/5 MON 810 10%
2	200	2,301029996	1/20 MON 810 10%
0,50	50	1,698970004	1/50 MON 810 10%
0,20	20	1,301029996	1/100 MON 810 10%
0,10	10	1	1/100 MON 810 10%

Explicando um pouco mais, tem-se que a porcentagem em massa de transgênico para milho total leva em consideração quanto pesa o DNA do genoma do milho (genoma completo) e quanto apresenta de transgênico.

Esse mesmo cálculo foi realizado para cópias de DNA sintético, tendo como resultado a Tabela 9.

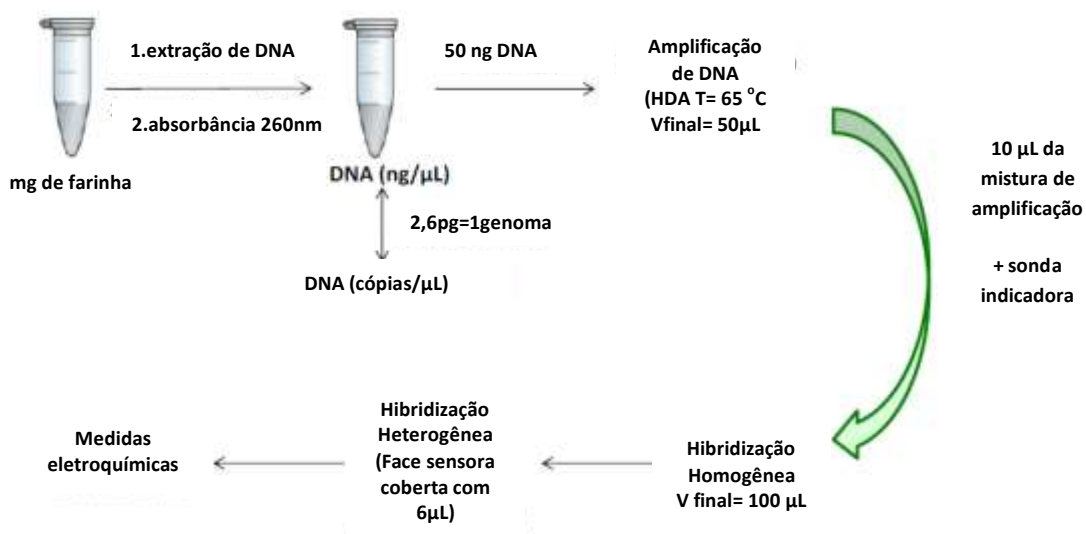
**Tabela 9: Número de cópias de DNA sintético**

Cópias	[105 mer]/M	[105 mer]/M
0	0	0
30	50 aM	5e <sup>-17</sup>
300	500 aM	5e <sup>-16</sup>
3000	5 fM	5e <sup>-15</sup>
30000	50 fM	5e <sup>-14</sup>

#### 4.6. Protocolo geral de análise de amostras

A Figura 17 representa o protocolo geral de análise de amostras que foi utilizado no sensor eletroquímico (genossensor) para detecção de promotor P35S da variedade transgênica de milho MON810, incluindo a unidade de conteúdo de DNA e equivalentes. Nesse esquema, inicialmente verifica-se a quantidade de DNA através de análise de UV; em seguida foi realizada a amplificação por HDA. Após essa etapa ocorre a montagem do genossensor, de acordo com a Figura 9, no qual o DNA extraído das amostras reais é utilizado na hibridização homogênea e heterogênea. Uma vez montado o sensor eletroquímico, foram realizadas as medidas.

**Figura 17: Protocolo geral de análise de amostras, incluindo unidade de conteúdo de DNA e equivalentes.**



Fonte: autora

## Referências Bibliográficas

- 1 (EFSA), E. F. S. A. Scientific Opinion on the annual post-market environmental monitoring (PMEM) report from Monsanto Europe S.A. on the cultivation of genetically modified maize MON 810 in 2013. **European Food Safety Authority**, 13, p. 4039, 2015.
- 2 ANALYTICAL METHODS COMMITTEE, A. N. PCR - the polymerase chain reaction. **Analytical Methods**, 6, p. 333-336, 2014.
- 3 ARUGULA, M. A.;ZHANG, Y.;SIMONIAN, A. L. Biosensors as 21st Century Technology for Detecting Genetically Modified Organisms in Food and Feed. **Analytical Chemistry**, 86, p. 119-129, 2014.
- 4 BALLARI, R. V.;MARTIN, A.;GOWDA, L. R. A calibrator plasmid for quantitative analysis of insect resistant maize (Yieldgard MON 810). **Food Chemistry**, 140, p. 382-389, 2013.
- 5 BARD, A. J.;FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**. Wiley, 2000.
- 6 BRASIL. Lei no 11.105, de 24 de Março de 2005. Regulamenta os incisos II, IV e V do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados – OGM e seus derivados, cria o Conselho Nacional de Biossegurança – CNBS, reestrutura a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio, dispõe sobre a Política Nacional de Biossegurança – PNB, revoga a Lei nº 8.974, de 5 de Janeiro de 1995, e a Medida Provisória nº 2.191-9, de 23 de Agosto de 2001, e os arts. 5º, 6º, 7º, 8º, 9º, 10 e 16 da Lei nº 10.814, de 15 de Dezembro de 2003, e dá outras providências. . 2005.
- 7 CHEN, D.;LI, J. Interfacial design and functionization on metal electrodes through self-assembled monolayers. **Surface Science Reports**, 61, p. 445-463, 2006.
- 8 CHOU, G. C.-S. H.-S. T. H. T. K., NI-CHIN; HSIN-SHI 74147; TAINAN HSIEN (TW). EP1760160A2. Methods and kits for detecting genetically modified organisms (GMO). 2007.
- 9 COMMISSION, E. Regulation (EC) No. 1830/2003 concerning the traceability and labelling of genetically modified organisms and the traceability and labelling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending Directive 2001/18/EC. 2003.
- 10 COSTA, T. E. M. M. **Deteção de transgênicos em alimentos utilizando a técnica Multiplex - PCR**. 2008. p Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2008.
- 11 DENG, X., WANG [US/US]; 90 BROOK HILL DRIVE, HAMDEN , CT 06514 (US). WO 2008/085540 A2. An assay for detecting nucleotide sequences in genetically modified crops and plants using optical thin-film biosensor chips. 2008.
- 12 DENG, X. W. **Assay for detecting nucleotide sequences in genetically modified crops and plants using optical thin-film biosensor chips**. 2009.
- 13 EFSA GMO PANEL (EFSA PANEL ON GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS). Scientific Opinion on the annual post-market environmental monitoring (PMEM) report from Monsanto Europe S.A. on the cultivation of genetically modified maize MON 810 in 2013. . **EFSA Journal** 2015;**13(3):4039, 11 pp.**, p. 11, 2015.
- 14 FÁTIMA BARROSO, M.;FREITAS, M.;OLIVEIRA, M. B. P. P.;DE-LOS-SANTOS-ÁLVAREZ, N.;LOBO-CASTAÑÓN, M. J.;DELERUE-MATOS, C. 3D-nanostructured

- Au electrodes for the event-specific detection of MON810 transgenic maize. **Talanta**, 134, p. 158-164, 2015.
- 15 FERNANDES, T. J. R.;AMARAL, J. S.;OLIVEIRA, M. B. P. P.;MAFRA, I. A survey on genetically modified maize in foods commercialised in Portugal. **Food Control**, 35, p. 338-344, 2014.
- 16 GREENPEACE. **Milho transgênico questionado na Europa é liberado no Brasil.** Disponível em: <<http://www.greenpeace.org/brasil/pt/Noticias/emdesgraanaeuropamilhot/>>. Acesso em: 17/05/2015
- 17 HOLST-JENSEN, A.;BERTHEAU, Y.;DE LOOSE, M.;GROHMANN, L.;HAMELS, S.;HOUGS, L.;MORISSET, D.;PECORARO, S.;PLA, M.;DEN BULCKE, M. V.;WULFF, D. Detecting un-authorized genetically modified organisms (GMOs) and derived materials. **Biotechnology Advances**, 30, p. 1318-1335, 2012.
- 18 JEONG, Y.-J.;PARK, K.;KIM, D.-E. Isothermal DNA amplification in vitro: the helicase-dependent amplification system. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 66, p. 3325-3336, 2009.
- 19 KIVLEHAN, F.;MAVRE, F.;TALINI, L.;LIMOGES, B.;MARCHAL, D. Real-time electrochemical monitoring of isothermal helicase-dependent amplification of nucleic acids. **Analyst**, 136, p. 3635-3642, 2011.
- 20 KOLM, C.;MACH, R. L.;KRSKA, R.;BRUNNER, K. A rapid DNA lateral flow test for the detection of transgenic maize by isothermal amplification of the 35S promoter. **Analytical Methods**, 7, p. 129-134, 2015.
- 21 LI, J.;MACDONALD, J. Advances in isothermal amplification: novel strategies inspired by biological processes. **Biosensors and Bioelectronics**, 64, p. 196-211, 2015.
- 22 MANZANARES-PALENZUELA, C. L.;MARTÍN-FERNÁNDEZ, B.;SÁNCHEZ-PANIAGUA LÓPEZ, M.;LÓPEZ-RUIZ, B. Electrochemical genosensors as innovative tools for detection of genetically modified organisms. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 66, p. 19-31, 2015.
- 23 MARTÍN-FERNÁNDEZ, B.;MIRANDA-ORDIERES, A. J.;LOBO-CASTAÑÓN, M. J.;FRUTOS-CABANILLAS, G.;DE-LOS-SANTOS-ÁLVAREZ, N.;LÓPEZ-RUIZ, B. Strongly structured DNA sequences as targets for genosensing: Sensing phase design and coupling to PCR amplification for a highly specific 33-mer gliadin DNA fragment. **Biosensors and Bioelectronics**, 60, p. 244-251, 2014.
- 24 MICHELINI, E.;SIMONI, P.;CEVENINI, L.;MEZZANOTTE, L.;RODA, A. New trends in bioanalytical tools for the detection of genetically modified organisms: an update. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 392, p. 355-367, 2008.
- 25 MIRANDA-CASTRO, R.;DE-LOS-SANTOS-ÁLVAREZ, N.;LOBO-CASTAÑÓN, M. J.;MIRANDA-ORDIERES, A. J.;TUÑÓN-BLANCO, P. PCR-coupled electrochemical sensing of Legionella pneumophila. **Biosensors and Bioelectronics**, 24, p. 2390-2396, 2009.
- 26 SALVI, S.;D'ORSO, F.;MORELLI, G. Detection and Quantification of Genetically Modified Organisms Using Very Short, Locked Nucleic Acid TaqMan Probes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56, p. 4320-4327, 2008.
- 27 TINLAND, B.;DELZENNE, P.;PLEYSIER, A. Implementation of a post-market monitoring for insect-protected maize MON 810 in the EU. **Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, 2, p. 7-10, 2007.
- 28 VAN EENENNAAM, A. L.;YOUNG, A. E. Prevalence and impacts of genetically engineered feedstuffs on livestock populations. **Journal of Animal Science**, 92, p. 4255-4278, 2014.

29 VINCENT, M.;XU, Y.;KONG, H. Helicase-dependent isothermal DNA amplification. **EMBO Reports**, 5, p. 795-800, 2004.

30 XU, G.;JIAO, K.;FAN, J.;SUN, W. **Electrochemical detection of specific gene related to CaMV35S using methylene blue and ethylenediamine-modified glass carbon electrode**. Disponível em: <<http://acta.chem-soc.si/53/53-4-486.pdf>>.

Acesso em:

31 ZAHRADNIK, C.;KOLM, C.;MARTZY, R.;MACH, R.;KRSKA, R.;FARNLEITNER, A.;BRUNNER, K. Detection of the 35S promoter in transgenic maize via various isothermal amplification techniques: a practical approach. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 406, p. 6835-6842, 2014.

32 ZUKER, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. **Nucleic Acids Research**, 31, p. 3406-3415, 2003.

# Capítulo 5 – Artigo

Essa parte envolve o artigo publicado versão completa no Apêndice.

## **Triagem confiável e sensível de produtos de alvos de amplificação helicase dependente de Organismos Geneticamente Modificados com um genossensor eletroquímico.**

### **RESUMO**

O cultivo de Organismos Geneticamente Modificados (OGMs) e seus usos em alimentos e produtos estão aumentando constantemente e assim a questão da informação ao consumidor sobre sua presença em alimentos tem demonstrado um significativo interesse.

O desenvolvimento de métodos sensíveis, rápidos, consistentes e confiáveis para a detecção de OGMs é crucial para própria rotulagem (etiquetagem) dos alimentos. Em resposta, caracterizou-se experimentalmente por amplificação isotérmica dependente da helicase (HDA) a detecção a partir da sequência específica de um transgênico do promotor do Vírus do Mosaico da Couve-flor (CaMV35S), inserido na maior parte das plantas transgênicas. A HDA é uma das abordagens mais simples para a amplificação do DNA, imitando a maquinaria de replicação bacteriana e semelhante à PCR, mas sobre condições isotérmicas. Contudo, essa técnica sofre com a falta de seletividade, devido à acumulação de produtos falsos de amplificação. Para melhorar a seletividade da HDA, a qual torna mais confiável a detecção dos produtos de amplificação, desenvolveu-se uma plataforma eletroquímica com alvo central nas cópias transgênicas por HDA. Uma arquitetura de monocamada binária é construída sobre um filme fino de ouro, onde sobre essa tem a formação de duplex perfeitos de ácidos nucleicos com produtos de amplificação, que são etiquetados com enzima e eletroquimicamente transduzidos. Esse sistema combinado resulta num aumento na detectabilidade do genossensor até  $10^6$  vezes, permitindo uma detecção YES/NO (sim/não) de OGMs com um limite de detecção para aproximadamente 30 cópias de DNA genômico de CaMV35S. Também está incluído um conjunto geral de regras utilitárias do design de genossensores para a detecção de amplicons de DNA, que pode ajudar no desenvolvimento de testes (*point-of-care*) direcionados. O método oferece uma ferramenta versátil para a detecção de ácidos nucleicos com quantidades traços não apenas para controle de segurança alimentar, mas também para o diagnóstico e controle de áreas ambientais.



## Introdução

A transferência de genes manipulados por engenharia em populações selvagens, resultando em um organismo geneticamente modificado (OGM), está sendo cada vez mais aplicada em biomedicina<sup>1</sup>, biorremediação<sup>2,3</sup> e para propósitos alimentares. Entretanto, nesse último caso foi levantada a maior controvérsia, aflorando um aspecto sensível na ciência agro alimentar. Isso tem levado muitos países, incluindo a União Europeia (EU), a por em vigor regulamentações<sup>4,5</sup> que garantam proteção e liberdade de escolha aos consumidores. Por exemplo, as regulamentações da Comissão Europeia estabelecem a etiquetagem obrigatória de OGMs, de alimentos derivados de OGMs e de produtos alimentares com limite de conteúdo de OGM de 0,9 %. Uma vez que o número de OGMs comercializados está aumentando rapidamente em todo o mundo<sup>6</sup>, testes para verificar a conformidade das amostras de alimentos e produtos com a legislação têm se tornado cada vez mais difícil e mais caros. Portanto, são necessárias abordagens de triagem hábeis para detectar a possível presença/ausência de muitos eventos GM com um custo efetivo.

No âmbito de execução internacional, a PCR e sua variante quantitativa (qPCR) são os padrões ouro para o propósito de triagem de OGM<sup>7,8</sup>, fundamentalmente devido à sua elevada sensibilidade (potencial para amplificação de molécula simples de DNA). A fim de avaliar a potencial presença de OGMs com o menor número de análises de PCR, muitas ferramentas foram desenvolvidas<sup>9</sup>, as quais sugerem os mais adequados ensaios de triagem para uma dada amostra. Entre eles, o promotor do vírus do mosaico da couve-flor 35S, CaMV35S, tornou-se o *target* mais amplamente utilizado devido à sua frequente presença nos genes quiméricos designados com essa expressão em plantas alimentícias<sup>10</sup>.

Todos os métodos que foram citados anteriormente requerem laboratórios especializados, equipados com instrumentos caros e com *staff* pessoal altamente qualificado. Existe, portanto, uma necessidade clara de desenvolver ensaios de triagem confiáveis capazes de operar nas configurações de campo. A esse respeito, as técnicas de amplificação isotérmica vêm à tona como uma alternativa para a PCR também nesse contexto de qualidade/segurança alimentar<sup>11-14</sup>. A possibilidade de procedimento em uma simples temperatura, simplifica a instrumentação analítica (energia e custo efetivo com aparatos), sendo assim mais apropriado para análises

no local (*in situ*), além da grande praticidade. Numerosos métodos de amplificação isotérmica de DNA/RNA foram desenvolvidos, cada um com pontos fortes e fracos. A amplificação dependente da helicase (HDA)<sup>17</sup> é um dos esquemas mais atraentes de amplificação isotérmica desenvolvidos nos últimos anos porque tem uma natureza exponencial e simples esquema de reação. As três enzimas de HDA: a polimerase, a helicase e a proteína de ligação de fita simples (SSB), atuam em conjunto sob as mesmas condições de reação juntamente com dois *primers* para realizar a amplificação. Utilizando a energia química proveniente da hidrólise de ATP, a helicase quebra as ligações de hidrogênio entre as fitas de DNA complementares, gerando moldes de fitas simples para o *primer* de hibridização e subsequente (posterior) alongação. A SSB atua como um assistente, estabilizando o DNA desenrolado.

Para as técnicas de amplificação isotérmica, especialmente aquelas com potencial exponencial<sup>18,19</sup>, é comum a susceptibilidade de gerar produtos de amplificação inespecíficos, além da possibilidade de contaminação cruzada, que está presumidamente relacionada aos *primers* (a extensão imprópria dos *primers* de anelamento ou a formação de *primer*-dímero). No caso da amplificação por HDA, é recomendado manter o tamanho do *primer* entre 24 – 33 nucleotídeos, tornando-se, dessa maneira, significativamente maior que os utilizados em PCR. Esse problema, ao lado de uma temperatura de aquecimento para amplificação (~65 °C), poderia favorecer um tipo de amplificação não específica *primer* – dímero. Por outro lado, e limitado pela taxa e processabilidade termofílica da helicase, o sistema é capaz de amplificar apenas sequências curtas de DNA (70 – 120 pb)<sup>20</sup>, as quais não são tão diferentes de dímeros de *primers*<sup>21</sup>. Os métodos mais utilizados para detecção de amplicons de HDA, entretanto, são usualmente confiáveis nos esquemas de transdução de sinais não específicos de dsDNA de agentes intercalantes.

Para responder a esse problema, foram bem descritos muitos métodos baseados em HDA que envolvem formatos assimétricos<sup>22,23</sup> ou análises de curvas de aquecimento dos produtos gerados<sup>24,25</sup>. Neste documento, apresenta-se a eficácia de um ensaio de hibridização do tipo *sandwich* acoplado a um genossensor eletroquímico que proporciona a seletividade extra requerida para a HDA. Esse modelo combinado de tecnologias foi aplicado com sucesso para a detecção de ao menos 30 cópias da sequência de DNA específica do promotor CaMV35S, um dos

elementos mais comuns inseridos na constituição de OGMs. A facilidade para detectar o transgene poderá fornecer uma tecnologia de triagem adaptada para uma rápida e precisa identificação de OGMs. Após isso, fornecemos um guia para ajudar no design dos genossensores para detecção dos amplicons de HDA, os quais poderiam ser aplicados no desenvolvimento de ferramentas efetivas de detecção genética para aplicações de diagnósticos clínicos associadas ao controle de segurança alimentar e monitoramento ambiental.

**Tabela 10. Sequencia de *Primers*, *Target* Sintéticos, Sondas de Captura e Indicadora.**

Nome	Função	oligonucleotídeos 5' → 3'
T <sub>105</sub>	<i>Target</i> 105 mer	GTA AGG GAT GAC GCA CAA TCC <u>CAC TAT CCT TCG CAA</u> <u>GAC CCT TCC TCT ATA TAA GGA AGT TCA TTT CAT TTG</u> <u>GAG AGG ACA CGC TGA CAA GCT GAC TCT AGC</u> AGA
CP	Sonda de captura	AGA GGA AGG GTC TTG CGA AGG ATA GTG-SH
SP	Sonda indicadora	FITC-CTA GAG TCA GCT TGT CAG CGT GTC CTC TCC AAA TGA AAT GAA CTT CCT TAT AT
FP <sub>105</sub>	P35S-105- <i>primer</i> direto	GTA AGG GAT GAC GCA CAA TCC CAC TAT
RP <sub>105</sub>	P35S-105- <i>primer</i> reverso	TCT GCT AGA GTC AGC TTG TCA GCG TGT
FP <sub>159</sub>	<i>Primer</i> direto de planta 159	CTT GAT TTT ACC AAA GAT GAT GA
RP <sub>159</sub>	<i>Primer</i> reverso de planta 159	TTC TTC GCA TGT ACC CGC AG

## SEÇÃO EXPERIMENTAL

**Reagentes:** Oligonucleotídeos dessalinizados de DNA sintético (sondas, sequencias *target* (alvo), e *primers*) que foram adquiridos da (IDT, Leuven, Bélgica). Essas sequências estão listadas na Tabela 10. *p*-Aminotiofenol (*p*-ATP), serum de albumina bovina (BSA), ditioneitol (DTT), e 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) no formato pronto para uso (K-azul substrato de baixa atividade, incluindo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) que foi adquirido da Sigma-Aldrich (Espanha) e usada como recebida. Concentrado salino de fosfato de sódio-EDTA (20XSSPE, pH 7,4) e *buffer* salino de fosfato (10XPBS) que foi adquirido da Sigma-Aldrich (Espanha) usado para preparar as soluções de *buffer*. A Thermo Scientific (Espanha) forneceu solução bloqueante de caseína 1%

m/v em 1XPBS, e o conjugado antilfluoresceína-POD da Fab Fragments (anti FITC-POD) foi obtido da Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Alemanha). Colunas de Sephadex NAP-10 G-25 foram obtidas da Life Technologies (Espanha).

O kit IsoAmp II Universal tHDA foi usado em experimentos de HDA (BioHelix Corporation). O corante intercalante de DNA EvaGreen (20X, Biotium) e o corante de referência ROX (50X, Invitrogen) foi utilizado no monitoramento de HDA baseado em fluorescência a tempo real. Outros produtos químicos foram utilizados com grau analítico. Exceto quando indicado de outra forma, todas as soluções foram preparadas com água Mili-Q (18 MΩ cm) de um sistema Milipore.

### **Amplificação de DNA dependente da helicase**

O mix de composição da reação de HDA ocorreu como segue: *Buffer* de anelamento 1X, NaCl 40 mM, dNTPs 7% v/v e mix de enzimas, cada *primer* 75 nM, e molde de DNA com várias concentrações com o volume final de 50 µL. As reações de HDA em tempo real, o DNA intercalado com um corante EvaGreen 0,2X e corante de referência ROX 1X foram adicionados à mistura. Nesse caso, o volume final foi ajustado para 25 µL com água deionizada estéril. As reações de HDA a tempo real foram conduzidas em um instrumento de detecção de sequências ABI Prism (Applied Biosystems) com o programa descrito a seguir: 30 ciclos de 5 s a 66°C e 115 s a 65°C (1 ciclo equivale a 2 min) com sinal de fluorescência coletado ao final de cada ciclo. A coleta de dados e as análises foram realizadas em um *software* de detecção de sequências ABI Prism (SDS version 2.2, Applied Biosystems). Note que um ciclo de temperaturas não é exigido para um ensaio de HDA isotérmico, mas para o sistema de coleção de dados, que foi originalmente para reações de ciclo térmico. As reações de HDA a ponto final foram realizadas em temperatura fixa (T=65°C em um sistema Thermomixer Comfort (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha).

### **Construção da superfície Sensora**

A interface sensora foi construída sobre um filme de ouro previamente limpo e condicionado, como está descrito na Informação Suplementar. Foi construída uma monocamada automontada binária composta com uma sonda de DNA de fita simples parcialmente complementar ao *target* e a um tiol aromático amino – terminal.

Com esse objetivo, 6  $\mu\text{L}$  de sonda de captura (CP) tiolada a 0,1  $\mu\text{M}$  em solução 2XSSPE pH 7,4 foi usada para cobrir a superfície recém limpa do eletrodo de ouro, que foi incubada por toda a noite a 4°C em atmosfera úmida saturada. A CP (Tabela 10) foi definida com um grupo de dissulfato no terminal 3' e previamente desprotegida pela reação com ditioneitol (DTT) para o rendimento livre de tiol, como indicado em outra parte<sup>26</sup>. Depois a superfície foi lavada com 2XSSPE pH 7,4 para deslocar as sondas adsorvidas inespecificamente e seco cuidadosamente com uma corrente de gás nitrogênio. A superfície com fitas de DNA ligadas foram intercaladas com a incubação de 6  $\mu\text{L}$  de p-aminotiofenol 1 mM em 2XSSPE pH 7,4 em refrigeração por 50 min. Esse tiol bloqueia os oligonucleotídeos que estão horizontalmente pousados (deitados) na superfície do eletrodo, para assim alcançar uma orientação mais favorável para a hibridização, dificultando assim as ligações não-específicas no ouro. Temos recentemente encontrado que o p-aminotiofenol é particularmente conveniente como um agente para preenchimento que ajuda a diminuir os sinais e também mais estável, misturado na monocamada automontada que é formada a partir dos alcanotíóis convencionais. A superfície do eletrodo modificada foi finalmente lavada com uma solução de 2XSSPE pH 7,4, e seca com um fluxo de gás nitrogênio ( $\text{N}_2$ ) para deixá-la pronta para ser utilizada no ensaio de hibridização.

### **Ensaio de Hibridização e Detecção Eletroquímica**

A segunda etapa do ensaio de hibridização tipo *sandwich* foi realizada para detecção específica do promotor CaMV35S (Figura 8). Dez microlitros (10  $\mu\text{L}$ ), seja de *target* sintético ou de amostra amplificada sem nenhum tipo de purificação, foram diluídos até 100  $\mu\text{L}$  com 2XSSPE pH 7,4 contendo 0,1  $\mu\text{M}$  da sonda indicadora – FITC e BSA 2,5% para auxiliar na hibridização homogênea, evitando assim o típico choque térmico<sup>27</sup>. Depois de 30 min de incubação em temperatura ambiente, 6  $\mu\text{L}$  dessa solução foram colocados na superfície sensora e a reação de hibridização heterogênea aconteceu em 120 min em temperatura ambiente. Subsequentemente, a superfície do eletrodo de trabalho foi lavada com *buffer* bloqueante de caseína (1% m/v) em 1XPBS pH 7,4. A ligação do DNA *target* com a superfície é devida à formação do duplex ternário e foi determinada por etiquetagem por marcação enzimática com anti-FITCFab – POD (0,5 U/mL em *buffer* bloqueante de caseína)

em temperatura ambiente por 30 min. O excesso de enzima conjugado foi removido por lavagem cuidadosamente com 1XPBS pH 7,4. A atividade POD imobilizada, diretamente relacionada com o *target* hibridizado, foi determinada pela imersão da superfície de trabalho em 450 µL de uma solução de substrato enzimático (TMB + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) seguido de detecção Cronoamperométrica de TMB oxidado enzimaticamente obtida após 30 s de reação, aplicando-se um potencial fixado em 0 V.

### **Preparação das Amostras Alimentares.**

Os materiais de referência certificados no formato de farinha em pó homogeneizada de milho GM do evento MON 810 de 0, 2 e 10 % (m/m), foram obtidas do *Institute of Reference Materials and Measurements, Joint Research Centre (JRC), European Commission (EC)* através da Sigma. O DNA genômico, mencionado anteriormente, foi extraído das farinhas e purificado utilizando-se um kit NucleoSpin®Food (*Macherey – Nagel, Düren, Alemanha*), de acordo com as instruções do fabricante, com poucas modificações (ver Informação Suplementar). A quantidade de DNA extraído e purificado foi determinada espectrofotometricamente. A PCR convencional foi realizada para controle de qualidade, utilizando-se um par de *primers* universal vegetal designado no gene cloroplasto *rbcl*<sup>28</sup>. A análise dos produtos de amplificação foi realizada por eletroforese em gel de agarose e corada em brometo de etídio, resultando em fragmentos que também foram sequenciados.

### **Isolamento de DNA de amostras de alimentos: pureza e controle de qualidade**

O DNA genômico de materiais de referência certificados foi extraído e purificado, utilizando-se um Kit para alimentos Nucleospin® (*Macherey-Nagel, Düren, Germany*), de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, cada amostra (aproximadamente 100 mg de pó homogeneizado) foi colocada em um tubo estéril de 1,5mL com 700 µL com solução de lise preaquecida a 65 °C e 10 µL de proteinase K (10 mg/mL) para ser incubada em bloco térmico (*Thermomixer Comfort, Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha*) a 65 °C por 1h com agitação média contínua, e vortexiado a cada 20 min, para ajudar a quebrar a parede celular, 2 µL de RNase A (10 mg/mL; *Thermo Scientific*) foram adicionados e, depois de 10 min de incubação a 37 °C para digestão do RNA, o tubo foi centrifugado a 4 °C a 17000g. O líquido

sobrenadante claro foi transferido para um novo tubo estéril onde o mesmo volume do *buffer* de ligação e etanol (96 – 100%) foi adicionado, e a homogeneização foi subsequentemente realizada por inversão. Então, cada mistura foi transferida para uma coluna spin e centrifugada em temperatura ambiente (11000 g, 1 min). A membrana de sílica foi lavada com os *buffers* recomendados seguindo, nesse caso, por 2 min de centrifugação a 11000 g e o sobrenadante foi descartado. A coluna foi colocada em um novo tubo estéril e, depois de 5 min de incubação com 80 µL de água bidestilada preaquecida a 70 °C, o DNA de eluição foi obtido por centrifugação (11000 g, 1 min). Pontas de pipeta estéreis e com filtro foram utilizadas para prevenir contaminação cruzada.

A concentração de DNA foi determinada para cada amostra pela determinação da absorbância a 260 nm em espectrofotômetro UV-vis (Cary 60 *Agilent*) com uma cubeta espelhada para ultramicrovolume (1 mm de caminho óptico), permitindo a medida direta a partir de 3 µL de amostra de DNA. A pureza do DNA foi determinada a partir da razão de absorbância  $A_{260}/A_{280}$  (valores que variam entre 1,7 e 1,9, de acordo com o kit de especificações).

A PCR convencional foi realizada como controle de qualidade do DNA, utilizando-se o par de *primer* FP<sub>159</sub>/ RP<sub>159</sub> (Tabela 7). Esses pares universais são moldados para o cloroplasto *rbcL* gene<sup>s2</sup> que codifica uma subunidade longa de ribulose 1,5 oxigenase carboxilase/oxigenase bifosfato (RUBISCO), amplamente utilizada para análise filogenética de plantas. A amplificação foi realizada em 25 µL de uma mistura para PCR contendo 2 µL do DNA molde, 1x *buffer* de PCR, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 µM dNTPs, 0,2 µM de cada *primer*, e 2,5 U de Immolase™ de DNA polimerase (Ecogen, Espanha). As reações foram executadas em um termociclador (GeneAmp® PCR System2700 termociclador *Applied Biosystem*, Espanha) programado de acordo com o seguinte protocolo: 5 min a 95 °C, seguido de 40 repetições de 30 s a 95 °C, 30 s a 58 °C, e 90 s a 72 °C. A etapa de alongação final ocorre a 72 °C por 7 min.

Os resultados de PCR foram avaliados por eletroforese (*buffer* de corrida 1xTBE) em 2% (m/v) em gel de agarose com corante de brometo de etídio (0,5 µg/mL) a 80V. A visualização do DNA em gel de agarose (UV transiluminador) mostrou uma banda simples com o tamanho esperado (cerca de 190 pb), comparado ao padrão de DNA (100 bp DNA Ladder, Invitrogen). Os resultados dos fragmentos

amplificados foram purificados (Kit Gel de extração E.Z.N.A., Omega Bio-Tek) para serem sequenciados utilizando-se o Kit Genome Walker (Clontech, USA) juntamente com o analisador ABI PRISM 3130xl. As sequências foram comparadas com o que está armazenado no GenBank, utilizando-se o algoritmo NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), confirmando a identificação da amostra (cloroplasto *Zea mays* cultivar B73 número de registro AY928077.1) com 99% de homologia.

As extrações de branco foram realizadas em paralelo, e sua absorbância e amplificabilidade por PCR foram avaliadas, levando aos resultados negativos esperados.

Os extratos de DNA foram aliquotados e estocados a (-20 °C) até sua utilização e a repetitividade dos ciclos de congelamento e descongelamento foram minimizados a fim de manter a integridade das amostras.

### **Digestão enzimática de DNA genômico**

1 µg de DNA genômico foi digerido com um par de enzimas de restrição, Mmel e HpyCH4III da *New England BioLabs Inc.*, utilizando-se 2 unidades / µg de DNA em 25 µL do mix de reação 1x *CutSmart Buffer* (concentração final) adicionada a 50 µM de S-adenosilmetionina (SAM), cofator para Mmel. A digestão ocorreu a 37 °C por toda a noite, seguida de inativação da enzima por 30 min a 65 °C. O DNA genômico de milho sem modificação genética também foi submetido a digestão enzimática e utilizado como controle.

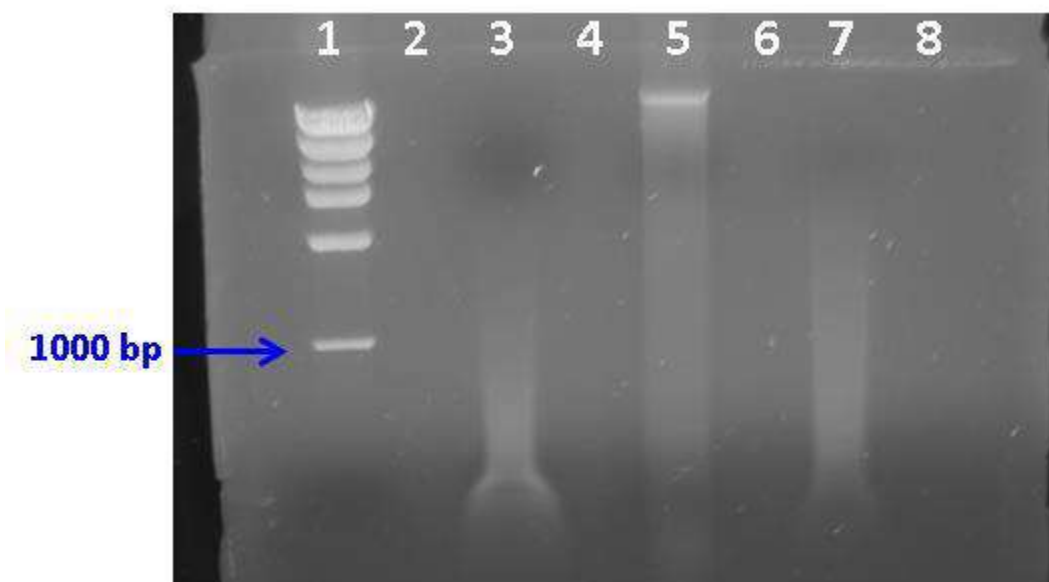
As endonucleases de restrição foram selecionadas com a ferramenta *NEBcutter V2.0* (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2>), com o localizador do par de digestão, considerando o promotor 35S na sequência de DNA, e controlando a ausência dos sítios de reconhecimento para ambas enzimas com a sequência *target*. A região do nucleotídeo-134 incluindo a sequência *target* é esperada para ser liberada por todo o genoma.

O DNA digerido foi analisado por eletroforese em gel de agarose (0,8 % m/m corado com 0,5 µg/ ml de brometo de etídio) a 90V. Grosseiramente, a mesma quantidade de DNA total foi carregada em cada poço. Os rastros (manchas) detectados nas linhas 3 e 7 (Figura 18) que apresentam muitas bandas fechadas com tamanho de aproximadamente 1000 bp. Isso é razoável, já que o tamanho das



enzimas usadas na digestão reconhece sequencias de 6 bases (cortador de 6 bases) e esses sítios podem ser encontrados muitas vezes em genoma de milho. Inversamente, o DNA genômico sem cortes ficou retido no poço (linha 5 na Figura.18).

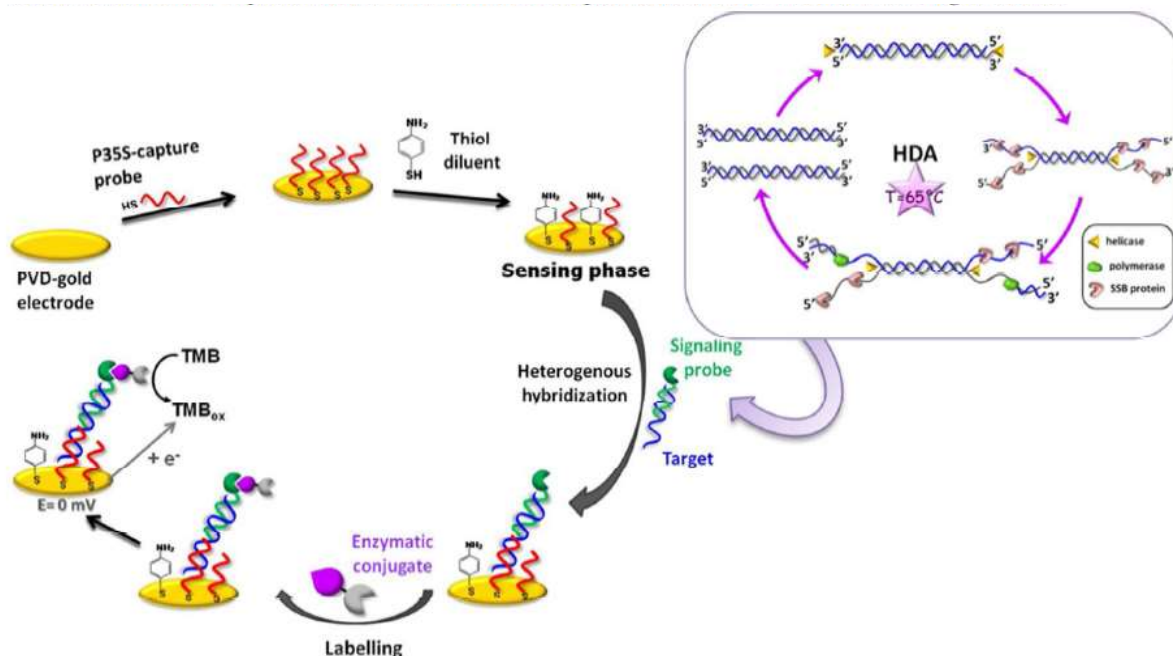
**Figura 18: Eletroforese em gel de agarose 0,8% (em *buffer* 1XTBE) de DNA genômico de *Zea mays*. Linha 1: Padrão de tamanhos, linha 3: Digestão por toda a noite de MON810-10%, linha 5: MON810-10% sem cortes, linha 7: MON810-0% digerido por toda a noite.**



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o objetivo de criar uma plataforma sensível para triagem de OGM, desenvolve-se um sistema combinando amplificação isotérmica de DNA dependente da helicase - (HDA) com alvo do elemento genético de CaMV35S, amplamente utilizado como promotor em plantas transgênicas e um genotipo *sandwich* heterogêneo, como representado na Figura 19.

**Figura 19: Representação esquemática das diferentes etapas que envolvem o Genossensor eletroquímico**

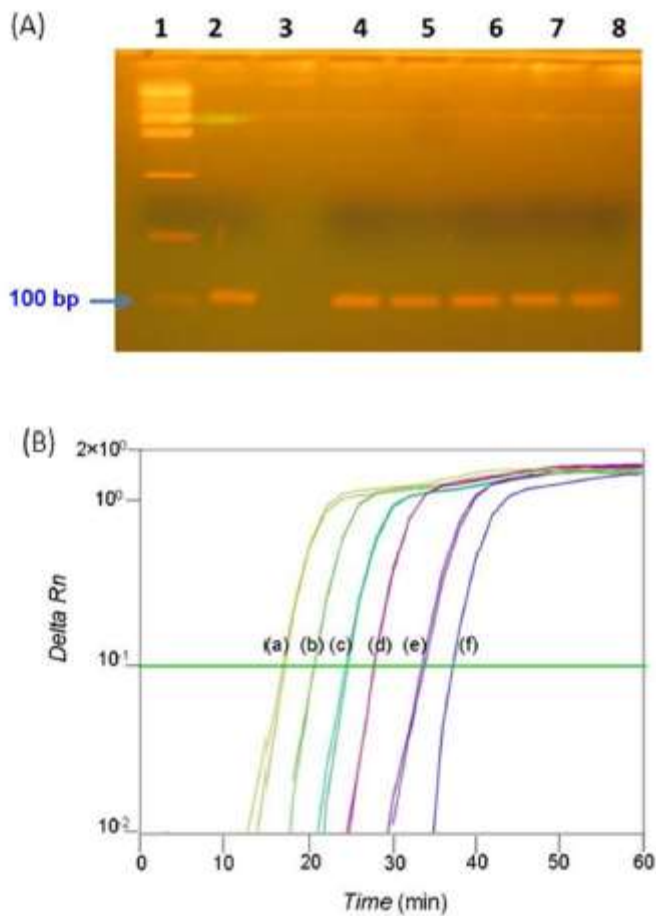


A reação de HDA produz pequenas cópias de DNA de fita dupla da sequência específica de *target* selecionada, quando está presente no DNA genômico extraído das amostras. Depois, os produtos finais hibridizam com a sonda indicadora modificada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e a sonda de captura tiolada imobilizada por quimissorção sobre um filme de ouro. A afinidade de interação do fragmento Fab FITC-antiFITC, subsequentemente permite a incorporação da molécula da enzima peroxidase (POD) por hibridização ternária. Tal enzima atua como redox de etiquetagem para detectar o evento de hibridização. Além disso, envolve a etiquetagem molecular do *target* e contribui para aprimorar a seletividade (aumentar) através dos dois eventos de reconhecimento pela molécula de *target*. O formato *sandwich* é particularmente utilizável para a detecção de sequências de ácidos nucleicos longos onde a alta energia impõe penalidade baseada em regras intermoleculares de outros formatos, (isto é, a maior parte dos alvos reais no mundo dos DNA's).

### **Amplificação HDA: Design e Avaliação**

A reação de HDA requer um design de dois *primers* específicos para o promotor constitutivo da subunidade ribossomal de 35S de rRNA do vírus do mosaico da couve-flor (GenBank AY326434). Para essa finalidade, utilizou-se o *software* Primer3<sup>29</sup>, com as seguintes restrições: o tamanho do *primer* e do amplicon com um intervalo entre 24 e 33 nt e 88-120 pb, respectivamente, temperatura de fusão ( $T_m$ ) no intervalo entre 60 e 74 °C para *primers* e 68-75 °C para os amplicons, para o GC% *primer* entre 35 e 60%<sup>30</sup>. Os *primers* obtidos (FP<sub>105</sub> e RP<sub>105</sub>, veja Tabela 10) geram amplicons de 105 pb (bases de 221-281, ambos incluídos) com um conteúdo de 47% GC e uma estrutura interna secundária com  $\Delta G = -17,03$  Kcal/mol a 20 °C e 0,3 M Na<sup>+</sup>, como previsto no Mfold<sup>31</sup> (ver Figura 13). Os *primers* especificamente selecionados, foram checados com uma ferramenta de *software* Primer-BLAST<sup>32</sup>. Nenhuma homologia foi encontrada, exceto em construções de GMO e vetores sintéticos.

**Figura 20 (A) eletroforese em gel de agarose 3% (buffer 1XTBE) de produtos de HDA iniciando com diferentes números de cópias de T<sub>105</sub>. Linha 1: Ladder (padrão), Linha 2: controle sem molde, Linhas 4-8 3x10<sup>5</sup>, 3x10<sup>4</sup>, 3x10<sup>3</sup>, 3x10<sup>2</sup> e 3x10<sup>1</sup> cópias por ensaio. (B) as curvas de amplificação isotérmica (T=65 °C) obtidas por HDA baseado em fluorescência de tempo real de T<sub>105</sub>. O número de cópias inicial de T<sub>105</sub> cópias por ensaio foi (a) 3x10<sup>5</sup>, (b) 3x10<sup>4</sup>, (c) 3x10<sup>3</sup>, (d) 3x10<sup>2</sup>, (e) 3x10<sup>1</sup>, (f) 0 (controle sem molde). A linha horizontal verde representa o número limite utilizado para obter a curva de calibração.**



Para amplificar o DNA genômico com prioridade, explorou-se a performance do par FP<sub>105</sub>/RP<sub>105</sub>, utilizando-se o *target* T<sub>105</sub> sintético como molde. As análises eletroforéticas em gel de agarose das misturas de amplificação, depois de um tempo de amplificação de 60 min, revelaram a presença de uma banda fechada para 100 pb do marcador (ver Figura 20A), a qual é indicativa de amplificação positiva. Confirma-se a especificidade da reação por HDA com análise de seqüenciamento dos produtos isolados pós eletroforese, as quais revelaram a sequência T<sub>105</sub> esperada. Destacamos que embora os produtos de HDA para um controle negativo tenham apresentado uma sequência diferente, não puderam ser distinguidos por eletroforese porque apresentam um tamanho similar àqueles específicos (Figura 20A), mostrando o limitado poder de discriminação desse método.

A cinética da HDA foi avaliada por fluorescência em tempo real, monitorando-se a reação de HDA isotérmica, utilizando-se EvaGreen e ROX como corantes de detecção e referência passiva. Uma característica exponencial aumenta com o sinal

de fluorescência como uma função do tempo de amplificação que é gravado, resultando de uma intercalação do corante *EvaGreen* dentro da fita dupla de DNA gerada (Figura 20B). Como esperado, quanto maior o molde de partida, menor tempo de incubação é exigido para aumentar a intensidade de fluorescência anteriormente citada e conhecida, isto é, menor tempo limite ( $t_T$ ). A variação linear para esse parâmetro com o logaritmo do número de cópias de DNA do modelo foi encontrado, considerando-se o nível do conjunto limite na região de crescimento da curva de amplificação na Figura 20B (linha verde):

$$t_T(\text{min}) = (-4,2 \pm 0,3) \log_{10}(\text{número de cópias de DNA}) + (39 \pm 1)$$

$$r = 0,996$$

A partir da inclinação dos mínimos quadrados lineares apropriados, uma eficiência de amplificação ( $E = 10^{1/\text{inclinação}}$ ) de 1,73 pode ser estimada, isto é, um aumento de 2 vezes no número de cópias de DNA a cada 76 segundos. Esses valores estão de acordo com os resultados prévios de HDA em tempo real para outros alvos.<sup>22,24</sup>

Um aumento significativo do sinal de fluorescência foi observado na ausência do molde de DNA (curva f na Figura 20B) depois de 36 min de amplificação isotérmica. Isso reflete um problema de amplificação não específica, o qual é consistente com os resultados obtidos por eletroforese. A falsa amplificação de produtos, embora seja comum para a PCR com um número elevado de ciclos, é frequentemente desconsiderada, apesar de serem decisivos, por causa do tamanho similar dos amplicons e seus produtos. Isso levou a relevantes interpretações errôneas de resultados<sup>21</sup>, mas pode ser mais inteligentemente e eficientemente contornado através da interação específica entre as sequências de ácidos nucleicos complementares, detectando produtos de amplificação com sensores de hibridização isto é, genossensores.

### **Design do Genossensor e Performance Analítica**

Quando um genossensor com formato *sandwich* é desenvolvido em combinação (acoplado) com uma prévia amplificação exponencial de DNA conduzida por um par de *primers*, como a HDA, algumas considerações anteriores devem ser levadas em conta para ultrapassar os equilíbrios concomitantes que poderiam levar a resultados falsos e reduzir a performance analítica. Diferentes

situações podem advir, dependendo de como cada terminação do *target* é definido para ser complementar para a sonda de captura (CP) imobilizada e para a sonda indicadora (SP).

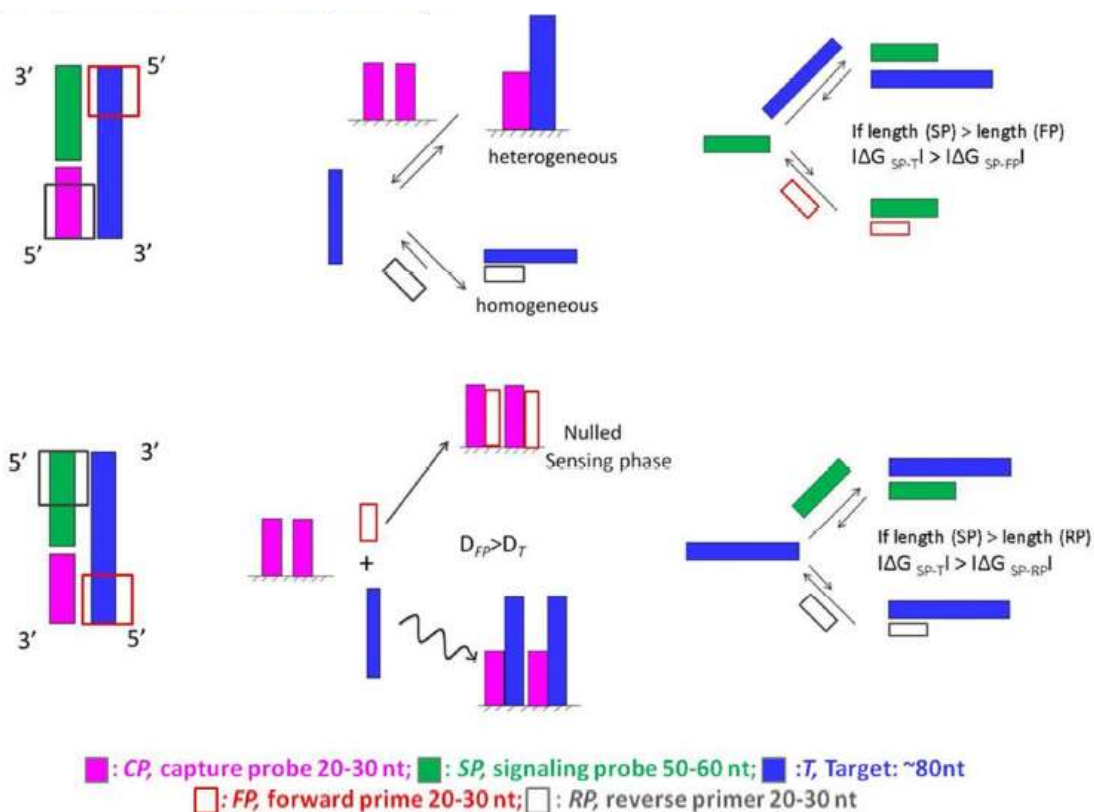
Se a CP hibridiza com o final 3' do *target* (Figura 21, parte superior), o *primer* reverso (RP) e a CP imobilizados, tipicamente similares em comprimento, ambos poderão hibridizar com a *target* (T), mas a ligação heterogênea desejada (CP-T) poderia ser termodinamicamente desfavorável.<sup>33</sup> Esse problema poderia ser contornado com a ancoragem (ligação) do RP com a sequência *target* específica. Por outro lado, o *primer* direto não consumido durante a amplificação poderia competir com o *target* pela sonda indicadora (SP), entretanto, trabalhando com uma SP maior que FP e com um grande excesso na concentração de FP, como usual, o equilíbrio pode ser fortemente deslocado pelo duplex de formação SP-T.

Quando a CP se liga ao final 5' do *target* (Figura 21, parte inferior), ocorre competição entre o *target* e o FP não alongado pela superfície de ancoragem CP, uma vez que o FP é menor que o T, o primeiro difunde mais rapidamente, saturando os sítios de ligações da superfície e anulando a superfície sensora. O FP ancorando no *target*, nos segmentos complementares para o CP, poderia resolver a questão. Além disso, a sequência RP coincide, em parte, com a SP; entretanto, normalmente essa última é mais longa. Assim, esta hibridização homogênea com o *target* é mais favorável energeticamente.

Consequentemente, *primers* que não estão contidos na sequência *target* específica que é reconhecida pelo genossensor, podem ancorar fortemente, em especial com o *primer* que define o final do *target* próximo à superfície do eletrodo. Isso dá origem aos segmentos em suspensão não hibridizados adjacentes à superfície, cuja influência na eficiência da hibridização heterogênea deveria também ser avaliada.

Observando-se que os amplicons de fita dupla são produzidos por HDA, mas a presença dessa margem totalmente complementar para o *target* poderia não ser subestimada. Nesse sentido, surge um parâmetro determinante que é o comprimento da superfície distal que apresenta uma cauda pendendo na fita simples de DNA *target*. A cauda sobressalente poderia estar disponível para reassociação com sua fita complementar, a qual poderia desestabilizar o duplex, o que levaria para um deslocamento sequencial conhecido como efeito zíper.<sup>34</sup>

Figura 21: Equilíbrio concorrente quando (parte superior) a sonda de captura se liga com o 3'-terminal do *target* e (parte inferior) sonda de captura hibridiza com o final 5' do *target*.



CP, sonda de captura 20-30 nt

SP, sonda indicadora 50-60 nt

T, *target*: ~80 nt

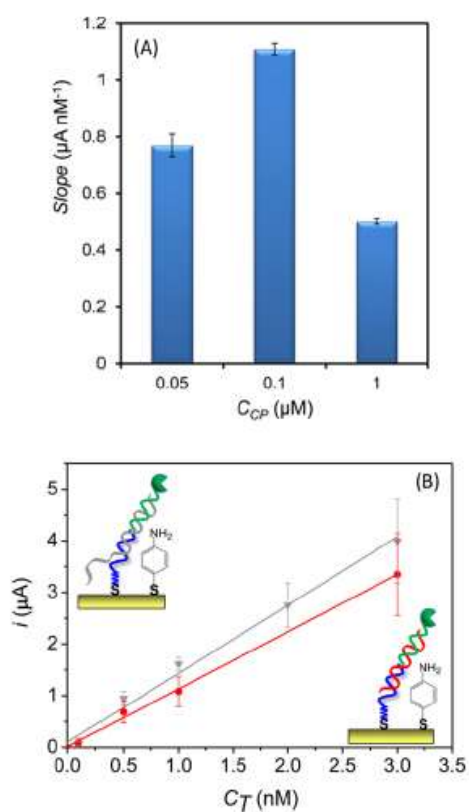
FP, *primer* direto 20-30 nt

RP, *primer* reverse 20-30 nt

Tendo todas essas considerações em mente, decidiu-se desenhar e desenvolver um genossensor do tipo *sandwich* com um alvo de sequência interna com 80 mer,  $T_{80}$ , que está contido na sequência específica  $T_{105}$ , com sonda de captura complementar para o final 5' do *target*, e conseqüentemente ancorado na superfície do eletrodo pelo seu terminal 3'. Depois da hibridização com  $T_{105}$ , foi formada uma cauda pendente com 21 nt localizado perto do eletrodo e uma cauda com 4 nt no terminal distal da superfície. Embora a tendência geral consista na ancoragem dos oligonucleotídeos pelo final 5' sobre um suporte sólido,

grosseiramente a mesma superfície coberta como relatado por sonda de DNA tiolado, pode-se ligar a partir de 3' e final 5'.<sup>35</sup> Portanto, respostas semelhantes são razoavelmente previsíveis para ambos os projetos, mas ancoragem CP por 3'-end, o que implica a utilização de um rotulado SP-5', irá resultar em um projeto mais econômico. Para quebrar a estrutura interna secundária de T<sub>80</sub> predeterminada por mfold ( $\Delta G = -12.0$  kcal/mol a 20°C e 0,3 M Na<sup>+</sup>)<sup>31</sup>, foi projetada uma sonda de captura (CP) de 27 mer complementar para a extremidade 5' de T<sub>80</sub> e uma sonda indicadora (SP) de 53 mer que hibridiza com o resto da sequência e com o mínimo de interação entre ambas as sondas.

**Figura 22: (A) Efeito da concentração da sonda de captura no coeficiente da curva de calibração. (B) Variação da resposta analítica com a concentração de DNA (pontos vermelhos) de T<sub>80</sub>, (triângulos cinzas) para T<sub>105</sub>.**



Como a reação restrita na superfície, a hibridização heterogênea é fortemente dependente da densidade da sonda de DNA de captura na superfície. A fim de maximizar a eficiência da hibridização e também a sensibilidade do ensaio do DNA, avaliou-se a resposta da fase sensora obtida a partir das soluções de imobilização



contendo diferentes concentrações da sonda de captura no intervalo de 0,05 a 1  $\mu$ M, de acordo com o procedimento descrito na seção experimental. Os resultados estão mostrados na Figura 22A. Um valor ótimo de sensibilidade (inclinação da curva de calibração entre 0,1 e 3 nM) foi encontrado como uma troca entre o número de receptores ancorados na superfície e sua sensibilidade para hibridização (aglomerados estéricos e interações eletrostáticas repulsivas), enquanto a resposta branco foi afetada de forma desprezível. Consequentemente, a concentração da sonda de captura de 0,1M foi sistematicamente usada posteriormente.

A performance analítica do genossensor foi primeiro examinada utilizando-se 80 mer de *target* específico sintético  $T_{80}$ . Uma resposta linear com  $T_{80}$  de concentração foi obtida com um intervalo 0,1 – 3nM

$$[i/\mu A = ((1,11 \pm 0,02) (C_{T_{80}}/nM) + (0,02 \pm 0,04) ; r = 0,9990 ; n=5]$$

Em altas concentrações, a intensidade de corrente estabilizada (fora de nível) foi detectada como consequência da saturação dos sítios de ligação. O limite de detecção calculado como três vezes o desvio padrão da medida do branco dividido pela inclinação da equação de regressão foi estimado em 9 pM (54 amol em 6  $\mu$ L de volume de hibridização) e a reproducibilidade do ensaio com um desvio padrão relativo de experimentos independentes com no mínimo 4 sensores diferentes foi encontrada em 7% para 100 pM e 24% para 3 nM de nível de concentração.

Para avaliar o possível impacto para a cauda de 21 nt na sensibilidade, a performance analítica do genossensor foi reexaminada para  $T_{105}$ . Mais uma vez o sinal amperométrico aumenta monotonicamente com a concentração de  $T_{105}$  e a curva de calibração e o intervalo dinâmico foram grosseiramente os mesmos obtidos para  $T_{80}$  [ $i/\mu A = (1,32 \pm 0,06)C_{80}/nM + (0,11 \pm 0,09)$ ;  $r = 0,995 ; n = 5$ ] no intervalo de 0,1 – 3 nM; portanto nenhum efeito deletério foi observado experimentalmente (ver Figura 22B). Resultados similares são relatados para caudas (extensões) de fitas simples de 22nt<sup>36</sup> e 48nt<sup>37</sup>, mesmo resistentes a uma desaceleração de uma cinética de hibridização como registrado no último caso que tornaram as correntes ligeiramente mais baixas no equilíbrio. Nesse caso, o efeito cinético não foi aparente desde que o tempo de hibridização de 120 min foi estabelecido desde o início. Por outro lado, uma cauda de 38 nt na proximidade da superfície condutora leva à obtenção de um sinal significativamente mais baixo com relação ao DNA *target* sem essas caudas. A discrepância pode ser explicada particularmente pela forma da

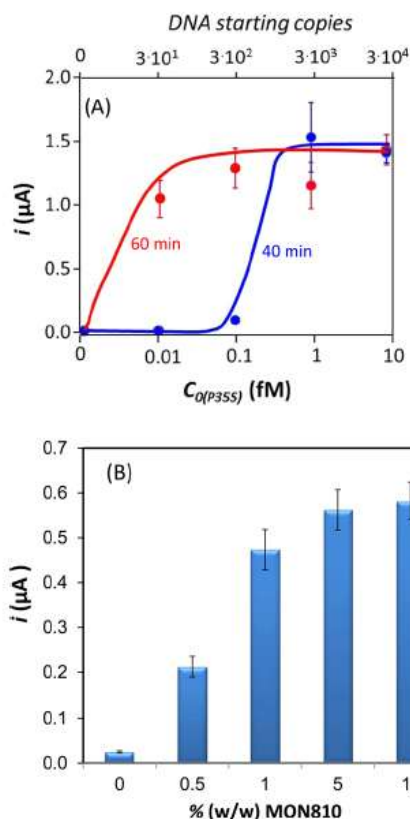
estrutura secundária particularmente forte da sequência *target* e a influência de um diluente diferente de tiol que pode conduzir a diferentes densidades de sonda de captura.<sup>38</sup>

Nos últimos anos, temos testemunhado a ampliação da caixa de ferramentas das análises de alimentos com o surgimento de tecnologias como os ensaios de hibridização e genossensores.<sup>39-41</sup> Embora muitos deles tenham demonstrado seu potencial com oligonucleotídeos sintéticos, como uma prova de conceito, o salto para o mundo real é a utilização de materiais de referência certificados que permanecem praticamente inexplorados. Diferentes abordagens de diferentes sinais de amplificação<sup>42-45</sup> têm sido descritos, encontrando sensibilidades em torno de nanomolar – picomolar, os quais em poucos casos têm sido um desafio com amostras de alimentos, relatando os resultados bem sucedidos difíceis de explicar, tendo em conta a sensibilidade dos ensaios descritos.<sup>42-45</sup>

Considerando a sensibilidade do genossensor eletroquímico aqui desenvolvido (limite de detecção mais baixo em torno de picomolar), decidiu-se testá-lo para detecção direta de DNA extraído de milho GM, sem DNA de amplificação. Entretanto, nenhuma das análises diretas de genoma sem digestão pelas endonucleases de restrição para liberar a sequência *target* do genoma completo foi realizada com êxito. O resultado não é tão inesperado, considerando a complexidade caracterizando o genoma de plantas com poliploidia e em particular o milho, o qual está no intervalo de tamanho do genoma humano<sup>46</sup>, bem como com baixo percentual de presença de material transgênico na amostra total bruta. Consequentemente, a restrição do tamanho avaliado para o DNA e a sensibilidade aparentemente melhorada parece ser indispensável para aplicação com sucesso para detectar por genossensor para o promotor CaMV35S em amostras de alimentos. Ambos os requisitos (exigências) são simultaneamente encontrados pela combinação de genossensor eletroquímico com uma amostra prévia de amplificação isotérmica de DNA, tal como a amplificação dependente da helicase (HDA) como demonstrado nesse trabalho.

**Figura 23: (A) correntes amperométricas obtidas iniciando com diferentes cópias de T<sub>105</sub> depois de 40 min (azul), 60 min de reação de HDA a 65 °C (vermelho). (B) variação da resposta eletroquímica para diferentes**

percentagens de MON 810 em DNA extraído de farinhas de milho depois de 60 min de amplificação isotérmica.



### Acoplando HDA e Genossensor Eletroquímico

Baseado nos resultados de HDA a tempo real, o tempo de reação de 40 min foi escolhido para realizar a amplificação isotérmica a 65 °C, utilizando-se a mesma mistura de reação dos experimentos a tempo real, exceto os fluoróforos. Os fragmentos gerados de 105 pb, partindo de diferentes cópias de  $T_{105}$ , foram diluídos cerca de 10 vezes para subsequente avaliação com o ensaio de hibridização eletroquímica. Dentro dessas condições, 3000 cópias de  $T_{105}$  foram inequivocamente detectadas, enquanto um aumento no tempo de amplificação de 20 min conduziu a uma melhora e detectabilidade mais confiável para 30 cópias de  $T_{105}$  (S/B=146), atendendo aos 0,9% exigidos dos requisitos para a testagem de OGM, tendo em consideração o limite de detecção europeu (Figura 23A).

O DNA genômico isolado de farinha de milho GM MON 810 10% (m/m) foi serialmente diluído para concentrações finais equivalentes a 1000, 500, 100 e 50 moléculas de DNA *target* (P35S cópias) por microlitro, considerando que uma molécula do genoma haploide corresponde a 2,6pg de DNA de milho<sup>47</sup>, e a

contribuição hemizigótica da construção do MON810 para o genoma extraído de um padrão certificado (50 ng de DNA de farinha de milho de MON810 10% ~ 20000 copias de genoma haploide ~ 1000 copias de P35S). A fim de nivelar (estabilizar) os efeitos do tratamento da amostra e minimizar a tendência associada com as diluições em série extraídas do genoma de milho GM, foi diluído com um não – GM (< 0,1% milho MON810) até uma quantidade total de 50 ng por tubo de reação. 1 microlitro para cada solução prévia foi utilizado para preparar um coquetel de reação de HDA que foi amplificado por 60 min a 65 °C e depois de uma desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos para uma amplificação eficiente. Os amplicons específicos de HDA foram detectados com um genossensor eletroquímico sem nenhum tratamento adicional ou purificação, ao contrário de outros ensaios de hibridização acoplados previamente à PCR<sup>48-49</sup>. Um resumo do protocolo geral está apresentado na Figura 17.

Como mostrado na Figura 23B, a combinação HDA – genossensor permite discriminar ambiguidades de 0,5 % (m/m) de MON810, abaixo do nível limite definido pela União Europeia para a rotulagem obrigatória (0,9%) com reprodutibilidade de 9,5%. Notavelmente, o sinal registrado para DNA genômico extraído de farinha certificada de milho com <0,1% de MON810 (0%) não é significativamente diferente do que foi obtido para controle negativo. A seletividade melhorada fornecida pela etapa adicional genossensora é aparente a partir dos sinais de branco negligenciados, mesmo em 60 min de tempo de amplificação, levando a resultados mais confiáveis em comparação com os de HDA isolado.

## CONCLUSÕES

Neste trabalho, é descrito um sistema de detecção de OGM eficiente, sensível e confiável combinando amplificação isotérmica de DNA dependente da helicase e a análise subsequente de amplicons sem purificação por um genossensor eletroquímico.

A notável especificidade do ensaio depende de dois pilares: da amplificação isotérmica do DNA dirigida por *primers* específicos e do acoplamento desses produtos de hibridização por HDA com sondas específicas de captura e indicadora. Embora a amplificação não específica tenha lugar em alguma extensão, os subprodutos não são detectados com os genossensores fornecidos que são simples,

mas com design criterioso de *primers* e sondas de hibridização que foram determinadas, compõem os pontos-chaves discutidos sob esse aspecto.

Este método requer um equipamento simples acessível e portátil (um bloco de aquecimento e um potenciostato) com baixo consumo de carga e acessível para detecção em campo, particularmente, mas não exclusivamente para a rotina de controle de materiais crus de alimentos e produtos. Isso pode ser vantajosamente aplicado para a detecção específica de pequenas quantidades de biomarcadores de ácidos nucleicos relevantes em análises diagnósticas, ambientais e alimentares.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pelo Ministério Espanhol de Economia e Competitividade Project CTQ2012-31157), o FP7 PEOPLE-2013-IRSES *Marie Curie Actions Programme* (GMOsensor project 612545) e co-financiado pelo Fundo FEDER. Agradecemos ao Dr. Jose Luís Martínez-Fernandez pela assistência na amplificação de HDA e sequenciamento. S. Moura-Melo, como aluna do Curso de Doutorado, agradece ao programa CAPES/FAPEPI pela bolsa de doutorado do Ministério de Educação do Brasil, R. Miranda-Castro agradece ao Governo do Principado de Astúrias e ao Contrato Clarín de Pós-Doutorado. Dedicado *in memoriam* ao Prof. Marco Mascini.

## REFERÊNCIAS

- (1) Celec, P.; Kukučkova, M.; Renczesova, V.; Natarajan, S.; Palffy, R.; Gardlik, R.; Hodosy, J.; Behuliak, M.; Vlkova, B.; Minarik, G.; Szemes, T.; Stuchlik, S.; Turňa, J. *Biomed. Pharmacother.* **2005**, *59*, 531.
- (2) Kumar, S.; Kumar V.; Yogender, D.; Khasa, P.; Kuhad, R.C. in Kuhad, R.C.; Singh, A. (Eds.) *Biotechnology for Environmental Management and Resource Recovery* **2013**, 191.
- (3) Saylor, G. S.; Ripp, S. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 286.
- (4) European Commission Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed *Off. J. Eur. Union L* **2003**, *268*, 1.
- (5) European Commission Regulation (EC) No 1830/2003 concerning the traceability and labelling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending Directive 2001/18/EC, 24–28.
- (6) James, C. *International Service for the Acquisition of Agribiotech Applications (ISAAA)* Brief No. 49. **2014** Ithaca, NY. (<http://www.isaaa.org>).

- (7) <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods> (last accessed 15.06.2015)
- (8) <http://gmdd.shgmo.org> GMO Detection Laboratory in Shanghai Jiao Tong University (GMODL-SJTU): GMO Detection method Database (GMDD) (last accessed 15.06.2015)
- (9) Morisset, D.; Novak, P.K.; Zupanič, D.; Gruden, K.; Lavrač, N.; Žel, J. *BMC Bioinformatics* 2014, 15, 258.
- (10) Wu, Y.; Wang, Y.; Li, J.; Li, W.; Zhang, L.; Li, Y.; Li, X.; Li, J.; Zhu, L.; Wu, G. *Nature Scientific Reports* 2014, 4, 7358.
- (11) Morisset, D.; Stebih, D.; Cankar, K.; Žel, J.; Gruden, K. *Eur. Food Res. Technol.* 2008, 227, 1287.
- (12) Zhang, F.; Wang, L.; Wang, R.; Ying, Y.; Wu, J. *Anal. Chem.* 2015, 87, 1523.
- (13) Xu, C.; Li, L.; Jin, W.; Wan, Y. *Int. J. Mol. Sci.* 2014, 15, 18197.
- (14) Huang, X.; Zhai, C.; You, Q.; Chen, H. *Anal. Bioanal. Chem.* 2014, 406, 4243.
- (15) Li, J.; Macdonald, J. *Biosens. Bioelectron.* 2015, 64, 196.
- (16) Deng, H.; Gao, Z. *Anal. Chim. Acta* 2015, 853, 30.
- (17) Vincent, M.; Xu, Y.; Kong, H. *EMBO Reports* 2004, 5, 795.
- (18) Li, B.; Chen, X.; Ellington, A.D. *Anal. Chem.* 2012, 84, 8371.
- (19) Jiang, Y.S.; Bhadra, S.; Li, B.; Wu, Y.R.; Milligan, J.N.; Ellington, A.D. *Anal. Chem.* 2015, 87, 3314.
- (20) An, L.; Tang, W.; Ranalli, T. A.; Kim, H.-J.; Wytiaz, J.; Kong H. *J. Biol. Chem.* 2005, 280, 28952.
- (21) Mahalanabis, M.; Do, J.; AlMuayad, H.; Zhang, J. Y.; Klapperich, C. M. *Biomed. Microdevices* 2011, 13, 599.
- (22) Barreda-García, S; González-Álvarez, M.J.; de-los-SantosÁlvarez, N.; Miranda-Ordieres, A.J.; Lobo-Castañón, M.J. *Biosens. Bioelectron.* 2015, 68, 122.
- (23) Chow, W.H.A.; McCloskey, C.; Tong, Y.; Hu, L.; You, Q.; Kelly, C.P.; Kong, H.; Tang, Y.-W.; Tang, W. *J. Mol. Diagn.* 2008, 10, 452.
- (24) Kivlehan, F.; Mavré, F.; Talini, L.; Limoges, B.; Marchal, D. *Analyst* 2011, 36, 3635.
- (25) Tong, Y.; McCarthy, K.; Kong, H.; Lemieux, B. *J. Mol. Diagn.* 2012, 14, 569.
- (26) Miranda-Castro, R.; de-los-Santos-Álvarez, P.; Lobo- Castañón, M.J.; Miranda-Ordieres, A.J.; Tuñón-Blanco, P. *Anal. Chem.* 2007, 79, 4050.
- (27) Barroso, M.F.; Freitas, M.; Oliveira, M.B.P.P.; de-los- Santos-Álvarez, N.; Lobo-Castañón, M.J.; Delerue-Matos, C.; *Talanta* 2015, 134, 158.
- (28) Han, J.; Wu, Y.; Huang, W.; Wang, B.; Sun, C.; Ge, Y.; Chen, Y. *Food Control* 2012, 25, 696.
- (29) <http://gmdd.shgmo.org/primer3> *Primer3* software. (last accessed 15.06.2015)
- (30) [http://www.biohelix.com/products/IsoAmpII\\_tHDA\\_kit.asp](http://www.biohelix.com/products/IsoAmpII_tHDA_kit.asp) (last accessed 15.06.2015)
- (31) Zuker, M. *Nucleic Acid Res.* 2003, 31, 3406. MFOLDROOT (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold>, last accessed 15.06.2015).
- (32) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast> (last accessed 15.06.2015) *Primer-BLAST*
- (33) Irving, D.; Gong, P.; Levicky, R. *J. Phys. Chem. B* 2010, 114, 7631.
- (34) Reynaldo, L. P.; Vologodskii, A. V.; Neri, B. P.; Lyamichev, V. I. *J. Mol. Biol.* 2000, 297, 511.
- (35) Tavallaie, R.; Darwish, N.; Gebala, M.; Hibbert, D.B.; Gooding, J.J. *ChemElectroChem.* 2014, 1, 165.
- (36) Miranda-Castro, R.; de-los-Santos-Álvarez, N.; Lobo- Castañón, M.J.; Miranda-Ordieres, A.J.; Tuñón-Blanco, P. *Biosens. Bioelectron.* 2009, 24, 2390.

- (37) Lai, R.Y.; Lagally, E.T.; Lee, S.-H.; Soh, H.T.; Plaxco, K. W.; Heeger, A.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 4017.
- (38) Martín-Fernández, B.; Miranda-Ordieres, A.J.; Lobo- Castañón, M.J.; Frutos-Cabanillas, G.; de-los-Santos-Álvarez, N.; López-Ruiz, B. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *60*, 244.
- (39) Manzanares-Palenzuela, C.L.; Martin-Fernandez, B.; Sanchez- Paniagua Lopez; M., Lopez-Ruiz, B. *TrAC* **2015**, *66*, 19.
- (40) Arugula, M.A.; Zhang, Y.; Simonian, A.L. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 119.
- (41) Elenis, D.S.; Kalogianni, D. P.; Glynou, K.; Ioannou, P. C.; Christopoulos, T. K. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, 392, 347.
- (42) Huang, L.; Zheng, L.; Chen, Y.; Xue, F.; Cheng, L.; Adelojua, S. B.; Chen, W. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *66*, 431.
- (43) Guven, B.; Boyaci, I.H.; Tamer, U.; Acar-Soykut, E.; Dogan, U. *Talanta* **2015**, *136*, 68.
- (44) Wang, X.; Teng, D.; Guan, Q.; Tian, F.; Wang, J. *Food Chem.* **2015**, *173*, 1022.
- (45) Liao, W.-C.; Chuang, M.-C.; Ho, J.-A. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *50*, 414.
- (46) Schnable P.S. et al *Science* **2009**, *326*, 1112.
- (47) Arumyanathan, K.; Earle, E.D. *Plant. Mol. Bio. Report.* **1991**, *9*, 208.
- (48) Wang, R.; Minunni, M.; Tombelli, S.; Mascin, M. *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *20*, 598.
- (49) Chaumpluk, P.; Kerman, K.; Takamura, Y.; Tamiya, E.; *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2007**, *8*, 323.

## Comentários e Perspectivas

Nesse trabalho foi obtido um sistema confiável e simples que permite detectar cereais transgênicos mediante amplificação do seu material genético pela técnica de HDA e posterior análise dos amplicons resultantes diretamente, sem purificação, com um genossensor eletroquímico que aporta uma extraordinária seletividade ao sistema. Sua aplicação em amostras reais permite detectar até 0,5% do promotor P35S em amostras certificadas de milho transgênico, abaixo do limite legal estabelecido pela Comunidade Europeia (Organismos mundiais mais exigente no que se refere ao controle de alimentos transgênicos).

Esse dispositivo poderá utilizar outras matrizes transgênicas, tais como soja e/ou outras, tendo a vantagem de ser um ensaio qualitativo que pode ser utilizado onde a amostra está, ou seja, em campo ou na indústria de beneficiamento de alimentos. Outros trabalhos poderão ser realizados utilizando produtos regionais e que tenham sofrido alterações genéticas, tais como a manga e o caju.

O estágio *sandwich* proporcionou-me uma experiência ímpar, permitindo que uma vez tendo retornado e com o apoio do orientador e da instituição que se instale uma nova linha de pesquisa e também um convênio internacional que permitirá a participação de outros alunos junto à Universidade de Oviedo – Espanha.

Dada a experiência adquirida e a instalação de uma linha de pesquisa no Grupo BioEletroquímica que permitirá a interação entre o Grupos (Grupo de Investigación de Electroanálisis – GEUO – Universidad de Oviedo – España), GRAC (Isep – Instituto Politécnico do Porto – Universidade do Porto – Portugal), Grupo de Pesquisa em Biotecnologia da Universidade de Pernambuco – UPE, Laboratório de Imuno Biologia – LIB – UFPI e NupCelt (Núcleo de Pesquisa em Células Tronco – UFPI), existe a possibilidade tornar real a interação entre pesquisadores que trabalham com DNA de plantas transgênicas e a consequente realização de estudos que transformem a realidade atual através da aplicação dos conhecimentos somados nessa interação.



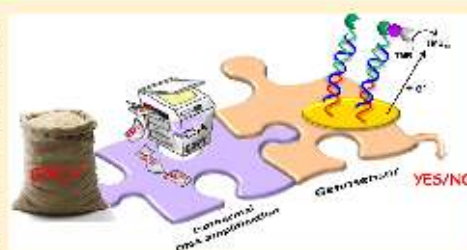
## **Apêndice (artigo e suplemento)**

## Targeting Helicase-Dependent Amplification Products with an Electrochemical Genosensor for Reliable and Sensitive Screening of Genetically Modified Organisms

Suely Moura-Melo,<sup>†,‡</sup> Rebeca Miranda-Castro,<sup>†</sup> Noemí de-los-Santos-Álvarez,<sup>†</sup> Arturo J. Miranda-Ordieres,<sup>†</sup> J. Ribeiro Dos Santos Junior,<sup>‡</sup> Rosana A. da Silva Fonseca,<sup>§</sup> and María Jesús Lobo-Castañón<sup>\*†</sup><sup>†</sup>Departamento de Química Física y Analítica, Universidad de Oviedo, 33006 Oviedo, Spain<sup>‡</sup>Departamento de Química, Centro de Ciências da Natureza, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 64049-550 PI, Brazil<sup>§</sup>Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco, Recife, 50670-901 PE, Brazil

## Supporting Information

**ABSTRACT:** Cultivation of genetically modified organisms (GMOs) and their use in food and feed is constantly expanding; thus, the question of informing consumers about their presence in food has proven of significant interest. The development of sensitive, rapid, robust, and reliable methods for the detection of GMOs is crucial for proper food labeling. In response, we have experimentally characterized the helicase-dependent isothermal amplification (HDA) and sequence-specific detection of a transgene from the Cauliflower Mosaic Virus 35S Promoter (CaMV35S), inserted into most transgenic plants. HDA is one of the simplest approaches for DNA amplification, emulating the bacterial replication machinery, and resembling PCR but under isothermal conditions. However, it usually suffers from a lack of selectivity, which is due to the accumulation of spurious amplification products. To improve the selectivity of HDA, which makes the detection of amplification products more reliable, we have developed an electrochemical platform targeting the central sequence of HDA copies of the transgene. A binary monolayer architecture is built onto a thin gold film where, upon the formation of perfect nucleic acid duplexes with the amplification products, these are enzyme-labeled and electrochemically transduced. The resulting combined system increases genosensor detectability up to 10<sup>3</sup>-fold, allowing Yes/No detection of GMOs with a limit of detection of ~30 copies of the CaMV35S genomic DNA. A set of general utility rules in the design of genosensors for detection of HDA amplicons, which may assist in the development of point-of-care tests, is also included. The method provides a versatile tool for detecting nucleic acids with extremely low abundance not only for food safety control but also in the diagnostics and environmental control areas.



The transfer of engineered foreign genes into wild populations resulting in a genetically modified organism (GMO) is being increasingly applied for biomedical,<sup>1</sup> bioremediation,<sup>2,3</sup> and food purposes, although it is in the latter case where major controversy has been raised, turning out to be a sensitive aspect of agro-food science. This has led many countries, including the European Union (EU), to put into force regulations that guarantee consumers protection and freedom of choice. For example, European Commission (EC) regulations<sup>4,5</sup> establish mandatory labeling of GMO and GMO-derived food and feed products with a threshold GMO content of 0.9%. Since the number of commercialized GMOs is growing rapidly worldwide,<sup>6</sup> testing the compliance of food and feed samples with stated food legislation is becoming increasingly difficult and expensive. Therefore, to enhance the efficiency of the analyses, cost-effective screening approaches able to detect

the presence/absence of as many GM events as possible are needed.

In the international enforcement framework, PCR and its quantitative variant (qPCR) are the gold standard for GMO screening purposes,<sup>7,8</sup> primarily because of their high sensitivity (potential for a single DNA molecule amplification). In order to assess the potential presence of GMOs with the minimum number of PCR analyses, several tools have been developed,<sup>9</sup> which suggest the most suited screening assays for a given sample. Between these, the Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter, CaMV35S or P35S, has become a widely used target,

Received: June 16, 2015

Accepted: July 22, 2015

Published: July 22, 2015

Table 1. Sequences of the Primers, Synthetic Targets, Capture, and Signaling Probe

name	function	oligonucleotides 5'→3'
T <sub>105</sub>	105-mer target	GTA AGG GAT GAC GCA CAA TCC CAC TAT CCT TCG CAA GAC CCT TCC TCT ATA TAA GGA AGT TCA TTT GAT TTG GAG AGG ACA CGC TGA CAA GCT GAC TTT AGC AGA
CP	capture probe	AGA GGA AGG GTC TTG CGA AGG ATA GTG-SH
SP	signaling probe	FTC-CTA GAG TGA GCT TGT CAG CGT GTC CTC TCC AAA TGA AAT GAA UTT CCT TAT AT
FP <sub>105</sub>	P155-105-forward primer	GTA AGG GAT GAC GCA CAA TCC CAC TAT
RP <sub>105</sub>	P155-105-reverse primer	TCT GCT AGA GTC AGC TTG TCA GCG TGT
FP <sub>139</sub>	plant 139-forward primer	CCT GAT TTT ACC AAA GAT GAT GA
RP <sub>139</sub>	plant 139-reverse primer	TTC TTC GCA TGT ACC CGC AG

because of its frequent presence in the chimerical genes designed for expression in food plants.<sup>11</sup>

All the above-mentioned methods require specialized laboratories, equipped with expensive instruments and staffed with qualified personnel. Therefore, there is a clear need to develop reliable screening assays capable of operating in field settings. In this regard, isothermal amplification techniques come to the fore as an alternative for PCR also in the context of food quality/safety.<sup>11–13</sup> The possibility of proceeding at a single temperature simplifies the analytical instrumentation (energy- and cost-effective apparatus), thereby being more appropriate for on-site analysis, outside a large facility. Numerous isothermal DNA/RNA amplification methods have been developed, each one with strong and weak points.<sup>13,16</sup>

Helicase-dependent amplification (HDA)<sup>17</sup> is one of the most appealing isothermal amplification schemes developed in recent years, because of its exponential nature and its simple reaction scheme. In HDA, three enzymes—polymerase, helicase, and single-stranded binding protein (SSB)—act in concert under the same reaction conditions, along with two primers to accomplish amplification. Using chemical energy from ATP hydrolysis, helicase disrupts hydrogen bonds between complementary DNA strands, generating single-stranded templates for primer hybridization and subsequent elongation. SSB acts as an assistant, stabilizing the unwound DNA.

Common to isothermal amplification techniques, especially in the powerful exponential ones,<sup>16,19</sup> is a pernicious susceptibility to false amplification whose origin, beyond a possible carry-over contamination, is presumably related to primers (extension of improperly annealed primers or primer-dimer formation). In the case of HDA amplification, it is recommended to keep the primer size between 24 and 33 nucleotides, thus significantly longer than those for PCR. This issue, along with mild temperature amplification (~65 °C), would favor the primer-dimer-type nonspecific amplification. In addition, because of the limited processivity of the thermophilic helicase, the system is only capable of amplifying short DNA sequences (70–120 bp<sup>20</sup>), which is not so different from possible primer dimers.<sup>11</sup> Current methods for the detection of HDA amplicons, however, usually rely on nonspecific signal transduction schemes using dsDNA intercalating agents. In response to this problem, several HDA-based methods involving asymmetric formats<sup>21,22</sup> or melting curve analysis of the generated products<sup>23,24</sup> have been described. Herein, we report the efficacy of a sandwich-type hybridization assay onto an electrochemical genosensor to provide the required extra selectivity to HDA. This novel combined

technology is successfully applied to the detection of as few as 30 copies of a DNA sequence specific to the promoter CaMV35S, which is one of the most common DNA elements of the construct inserted in GMOs. The ability to detect this transgene could thus provide an easy-to-adapt screening technology for rapid and accurate identification of GMOs. We further report guidelines to help the design of genosensors for detecting HDA amplicons that could be applied to the development of effective genetic detection tools in applications ranging from food safety control and environmental monitoring to clinical diagnosis.

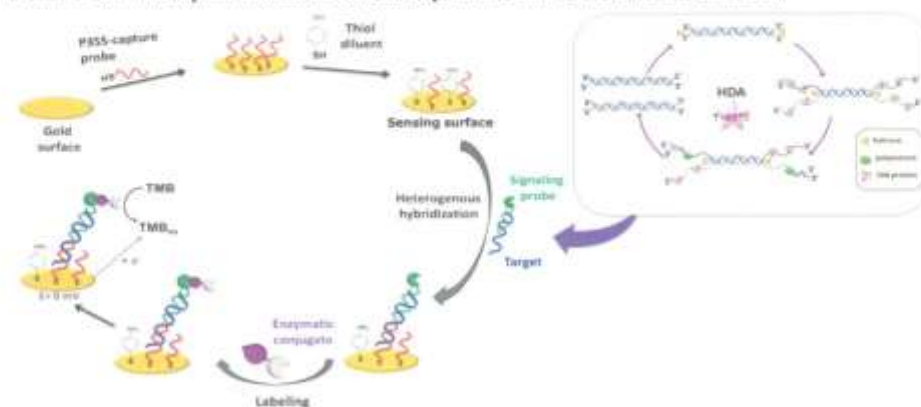
## EXPERIMENTAL SECTION

**Reagents.** Desalted synthetic DNA oligonucleotides (probes, target sequences, and primers) were purchased from (IDT, Leuven, Belgium). Their sequences are listed in Table 1. *p*-Aminothiophenol (*p*-ATP), bovine serum albumin (BSA), dithiothreitol (DTT), and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) in a ready-to-use format (K-blue low activity substrate, including H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) were purchased from Sigma-Aldrich (Spain) and used as received. Concentrated saline sodium phosphate-EDTA (20× SSPE, pH 7.4) and phosphate buffer saline (10× PBS) were obtained from Sigma-Aldrich (Spain) and used to prepare buffer solutions. Thermo Scientific (Spain) provided 1% w/v casein blocking solution in 1× PBS, and the conjugate anti-fluorescein-POD Fab Fragments (anti-FITC-POD) was obtained from Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germany). NAP-10 columns of Sephadex G-25 were obtained from Life Technologies (Spain).

IsiAmp II Universal (HDA kit) was used for HDA experiments (BinHelix Corporation). DNA intercalating dye EvaGreen (20×, Biotium) and ROX reference dye (50×, Invitrogen) were used for real-time fluorescence-based HDA monitoring. Other chemicals were of analytical grade. Unless otherwise stated, all solutions were prepared with Milli-Q water (18 MΩ cm) from a Millipore system.

**Helicase-Dependent DNA Amplification.** HDA reaction mix composition was as follows: 1× annealing buffer, 40 mM NaCl, 4 mM MgSO<sub>4</sub>, 7% v/v dNTPs and enzyme mix, 75 nM each primer, and varying concentrations of DNA template in a final volume of 50 μL. In real-time HDA reactions, the DNA intercalating dye 0.2× EvaGreen and 1× ROX reference dye were added to the mixture. In this case, the final volume was adjusted to 25 μL with sterile deionized water. Real-time HDA reactions were conducted in the ABI Prism 7900HT Sequence Detection Instrument (Applied Biosystems) with the program described below: 30 cycles of 5 s at 66 °C and 115 s at 65 °C (1 cycle number equals 2 min) with fluorescence signal being

Scheme 1. Schematic Representation of the Different Steps Involved in the Electrochemical Genosensor



collected at the end of each cycle. Data collection and analysis were performed by the ABI Prism Sequence Detection Software (SDS version 2.2, Applied Biosystems). Notice that the cycling temperature is not required for the isothermal HDA assay but for data collection system, which was originally conceived for thermal-cycling reactions. End-point HDA reactions were driven at a fixed temperature ( $T = 65\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) in a Thermomixer Comfort system (Eppendorf AG, Hamburg, Germany).

**Sensing Surface Construction.** The sensor was built onto a gold film that had been previously cleaned and conditioned as described in the Supporting Information. A binary self-assembled monolayer that was composed of a single-stranded DNA probe partially complementary to the target and an amine-terminated aromatic thiol was constructed. With that objective,  $6\text{ }\mu\text{L}$  of  $0.1\text{ }\mu\text{M}$  thiolated capture probe (CP) solution in  $2\times$  SSPE, pH 7.4, was used to cover the freshly cleaned gold electrode surface and incubated overnight at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  in a water-saturated atmosphere. CP (Table 1) was provided with a disulfide group at the 3'-terminus and previously unprotected by reaction with dithiothreitol (DTT) to yield the free thiol, as indicated elsewhere.<sup>28</sup> After that, the surface was washed with  $2\times$  SSPE, pH 7.4, to displace the unspecifically adsorbed probe, and carefully dried under a stream of nitrogen gas. The surface-attached DNA strands were interspersed by incubation with  $6\text{ }\mu\text{L}$  of  $1\text{ mM}$  *p*-aminothiophenol in  $2\times$  SSPE, pH 7.4, in the refrigerator for 50 min. This thiol prevented oligonucleotides from lying down on the electrode surface, thus attaining a more favorable orientation for hybridization, hindering nonspecific gold binding as well. We have recently found that *p*-aminothiophenol is a particularly convenient backfilling agent, which leads to lower background signals and more stable mixed self-assembled monolayer than those formed from conventional alkanethiols. The modified electrode surface was finally washed with a  $2\times$  SSPE, pH 7.4, solution and dried in a nitrogen gas ( $\text{N}_2$ ) flow to be ready for use in the hybridization assay.

**Hybridization Assay and Electrochemical Detection.** A two-step sandwich hybridization assay was performed for specific detection of CaMV35S promoter (Scheme 1). Ten

microliters ( $10\text{ }\mu\text{L}$ ) of either synthetic target or amplified sample without any purification, were diluted to  $100\text{ }\mu\text{L}$  with  $2\times$  SSPE, pH 7.4, containing  $0.1\text{ }\mu\text{M}$  FITC-signaling probe and 2.5% BSA to assist in homogeneous hybridization, thus avoiding typical thermal shock.<sup>27</sup> After 30 min of incubation at room temperature,  $6\text{ }\mu\text{L}$  of this solution were placed onto the sensing surface, and heterogeneous hybridization reaction proceeded for 120 min at room temperature. Subsequently, the working electrode surface was washed with casein blocking buffer (1% (w/v) in  $1\times$  PBS, pH 7.4). Target DNA bound to the surface via the ternary duplex formation was determined by enzymatic labeling with anti-FITC Fab-POD (0.5 U/mL in casein blocking buffer) at room temperature for 30 min. Excess of enzyme conjugate was removed by carefully washing with  $1\times$  PBS pH 7.4. The immobilized POD activity, directly related to the hybridized target, was determined by immersion of the working surface into  $450\text{ }\mu\text{L}$  of enzyme substrates solution (TMB +  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) followed by chronoamperometric detection of the oxidized TMB, enzymatically generated after 30 s of reaction, by applying a fixed potential of 0 V.

**Preparation of Food Samples.** Certified reference materials in the form of homogenized seed powder of GM maize event MON810 (0, 2 and 10% (w/w)) were obtained from the Institute of Reference Materials and Measurements through Sigma. Genomic DNA of aforementioned flours was extracted and purified using a Nucleospin food kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany), according to the manufacturer's instructions, with minor modifications (see the Supporting Information). Extracted DNA quantity and purity were determined spectrophotometrically. Conventional PCR was carried out for DNA quality control using a vegetal-universal primer pair designed on chloroplast *rbcL* gene.<sup>29</sup> The analysis of the amplification products was performed by electrophoresis in agarose gel and ethidium bromide staining; the resulting fragments also were sequenced. See the Supporting Information for detailed protocols.

## RESULTS AND DISCUSSION

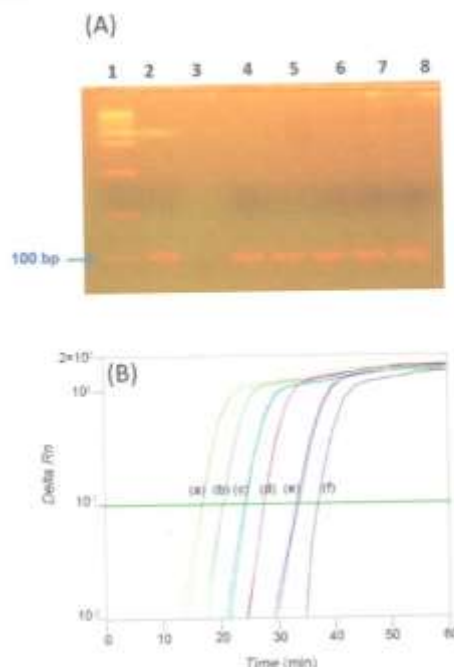
With the objective of creating a sensitive platform for GMO screening, we designed a system by combining helicase-

dependent DNA isothermal amplification (HDA), targeting the genetic element CaMV35S, which is widely used as a promoter in plant transgenes, and a heterogeneous sandwich genosensor (cf. Scheme 1). HDA reaction produces short double-stranded copies of the selected specific target sequence when present in the genomic DNA extracted from samples. Afterward, the final products hybridize with a signaling probe modified with fluorescein isothiocyanate (FITC) and a thiolated capture probe immobilized by chemisorption onto a gold film. The affinity interaction FITC-antiFITC Fab fragment subsequently allows incorporating a peroxidase enzyme molecule (POD) per tertiary hybrid. Such a redox enzyme acts as a label to detect the hybridization event. Besides circumventing molecular target labeling and contributing to an enhanced selectivity through two recognition events per target molecule, the sandwich format is particularly useful for the detection of long nucleic acid sequences where a high energy penalty that is imposed by intramolecular base-pairing rules out other formats (that is, most of the real-world DNA targets).

**HDA Amplification: Design and Evaluation.** HDA reaction requires the design of two primers specific for the constitutive promoter of the subunit 35S of rRNA of Cauliflower Mosaic Virus (GenBank AY326434). To this end, we used Primer3 software,<sup>29</sup> with the following restrictions: primer and amplicon size within the intervals of 24–33 nt and 80–120 bp, respectively; melting temperature ( $T_m$ ) ranges of 60–74 °C for primers and 68–75 °C for amplicons; and primer GC% values from 35% to 60%.<sup>30</sup> The obtained primers (FP<sub>105</sub> and RP<sub>105</sub>; see Table 1) generate 105 bp amplicons (bases from 221 to 281, both included) with a 47% GC content and an internal secondary structure with a  $\Delta G = -17.03$  kcal/mol at 20 °C and 0.3 M Na<sup>+</sup> as predicted by mfold<sup>31</sup> (see Figure S2). The specificity of selected primers was checked with the software tool Primer-BLAST.<sup>32</sup> No homology was found except in GMO constructs and synthetic vectors.

Prior to amplify genomic DNA, we explored the performance of FP<sub>105</sub>/RP<sub>105</sub> pair using the synthetic target T<sub>105</sub> as the template. Agarose gel electrophoretic analysis of the amplification mixtures after 60 min of amplification time revealed the presence of a band close to the 100 bp marker (see Figure 1A), which is indicative of positive amplification. We confirmed the specificity of the HDA reaction by sequencing analysis of the isolated products after electrophoresis, which revealed the T<sub>105</sub> expected sequence. Of note, although HDA products for a negative control have a different sequence, they cannot be distinguished by electrophoresis, because they have similar size to the specific ones (Figure 1A), showing the limited discrimination power of this method.

The kinetics of HDA was assessed by real-time fluorescence monitoring of isothermal HDA reaction, using EvaGreen and ROX as detection and passive reference dyes, respectively. A characteristic exponential increase in fluorescence signal as a function of amplification time is recorded, resulting from the intercalation of EvaGreen dye into the double-stranded DNA generated (Figure 1B). As expected, the larger the starting template amount, the lower incubation time is required to rise the fluorescence intensity above the background, i.e., lower threshold time ( $t_T$ ). A linear variation of this parameter with the logarithm of the initial number of DNA template copies was found, by considering the threshold level set in the exponential growth region of the amplification curve in Figure 1B (green line):



**Figure 1.** (A) 3% Agarose gel electrophoresis (in 1× TBE buffer) of HDA products from different starting copies of T<sub>105</sub> (lane 1, ladder; lane 2, no-template control; lane 4, 3 × 10<sup>5</sup> copies per assay; lane 5, 3 × 10<sup>4</sup> copies per assay; lane 6, 3 × 10<sup>3</sup> copies per assay; lane 7, 3 × 10<sup>2</sup> copies per assay; and lane 8, 3 × 10<sup>1</sup> copies per assay). (B) Isothermal amplification curves ( $T = 65$  °C) obtained for real-time fluorescence-based HDA of T<sub>105</sub>. The initial number of T<sub>105</sub> copies per assay was (a) 3 × 10<sup>5</sup>, (b) 3 × 10<sup>4</sup>, (c) 3 × 10<sup>3</sup>, (d) 3 × 10<sup>2</sup>, (e) 3 × 10<sup>1</sup>, (f) no-template control. The horizontal green line represents the threshold level used to obtain the calibration curve.

$$t_T \text{ (min)} = (-4.2 \pm 0.3) \log_{10}(\text{DNA copy number}) + (39 \pm 1)$$

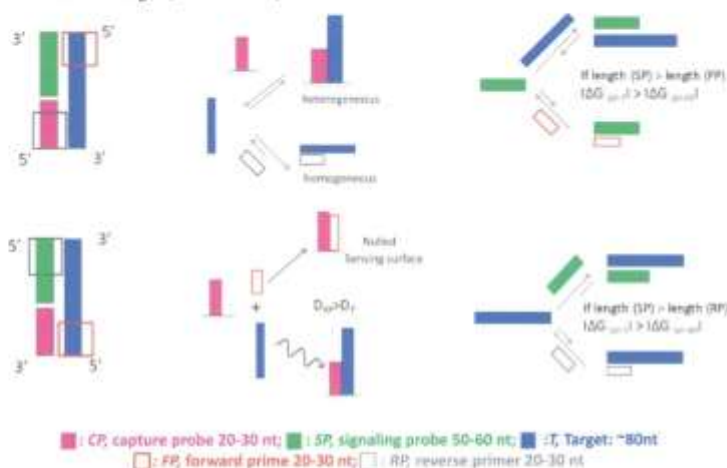
$$r = 0.996$$

From the slope of the linear least-squares fitting, an amplification efficiency ( $E = 10^{1/(-0.49)}$ ) of 1.73 can be estimated, that is, a 2-fold increase in the number of DNA copies every 76 s. These values are in good agreement with previous real-time HDA results for other targets.<sup>22,24</sup>

A significant increase in fluorescence signal was observed in the absence of DNA template (curve f in Figure 1B) after 36 min of isothermal amplification. It reflects a problem of nonspecific amplification, which is consistent with the results obtained by electrophoresis. The spurious amplification of byproducts, although common to PCR at a high number of cycles, is frequently set aside, despite being decisive, because of the similar size of amplicons and byproducts. This has led to relevant misinterpretations of results<sup>33</sup> but can be smartly and efficiently circumvented through the specific interaction between complementary nucleic acid sequences, by detecting amplification products with hybridization sensors (i.e., genosensors).

**Genosensor Design and Analytical Performance.** When a sandwich-format genosensor is developed in

**Scheme 2. Concurrent Equilibria When the Capture Probe Binds the 3'-End Target (Top Panel) and the Capture Probe Hybridizes with the 5'-End Target (Bottom Panel)\***



\* $D_i$  represents the diffusion coefficient of sequence  $i$ .

combination with a previous exponential DNA amplification conducted by a pair of primers, such as HDA, some previous considerations should be taken into account to overcome concurrent equilibria that could lead to false negative results or reduced analytical performance. Different situations can arise, depending on which target terminus is designed to be complementary to the immobilized capture probe (CP) and to the signaling probe (SP).

If CP hybridizes with the 3'-end target (Scheme 2, top panel), reverse primer (RP), and the immobilized CP, typically similar in length, both would hybridize with target (T) but the desired heterogeneous binding (CP-T) would be thermodynamically unfavorable.<sup>33</sup> This problem would be circumvented with a RP flanking the specific target sequence. On the other hand, the forward primer (FP) not consumed during amplification would compete with the target for the signaling probe (SP); however, working with a SP longer than FP and in a large excess over the FP concentration, as usual, the equilibrium could be strongly displaced toward the SP-T duplex formation.

When CP binds the 5'-end target (Scheme 2, bottom panel), competition between the target and the nonelongated FP for the surface-anchored CP occurs and, since FP is shorter than T, the former diffuses more rapidly, saturating the surface binding sites and nullifying the sensing surface (see the Supporting Information for experimental evidence of this issue). FP flanking the target segment complementary to CP could solve the issue. Besides, the RP sequence matches, in part, with SP; however, normally, the latter is longer, so its homogeneous hybridization with the target is more energetically favorable.

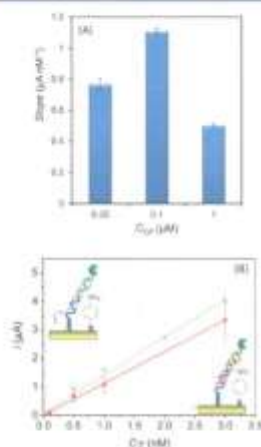
Accordingly, primers not contained in the specific target sequence recognized by the genosensor but flanking it are strongly recommended, especially the primer defining the target end proximal to the electrode surface. It gives rise to nonhybridized hanging segments adjacent to the surface, whose

influence on the heterogeneous hybridization efficiency should be also evaluated. Notice that double-stranded amplicons are generated by HDA, so the presence of the strand totally complementary to the target should not be underestimated. In this regard, a determining parameter appears to be the length of the surface-distal overhanging tail of the target DNA strand. The protruding tail could be available for reassociation with its complementary strand, which could destabilize the duplex, leading to a sequential displacement known as the zipper effect.<sup>34</sup>

Bearing all these considerations in mind, we decided to design and develop a sandwich-type genosensor targeting an internal 80-mer sequence ( $T_{80}$ ), contained in the specific sequence  $T_{200}$ , with the capture probe complementary to the 5'-end of the target, and consequently tethered to the electrode surface by its 3' terminus. After hybridization with  $T_{100}$ , a 21 nt overhanging tail located close to the electrode and a 4 nt protruding tail at the terminus distal to the surface are formed. Although the general trend consists in anchoring oligonucleotides by their 5'-end onto a solid support, roughly the same surface coverage has been reported for thiolated DNA probes tethered from the 3'- and 5'-end.<sup>35</sup> Therefore, similar responses are reasonably anticipated for both designs, but anchoring CP by the 3'-end, which implies the use of a 5'-labeled SP, will result in a more cost-effective design. To disrupt the internal secondary structure of  $T_{80}$  predicted by mfold ( $\Delta G^\circ = -12.0$  kcal/mol at 20 °C and 0.3 M Na<sup>+</sup>),<sup>31</sup> we designed a 27-mer capture probe (CP) complementary to the 5'-end of  $T_{80}$  and a 53-mer signaling probe (SP) that hybridizes with the rest of the sequence, with minimal interaction between both probes.

As a surface-confined reaction, DNA heterogeneous hybridization is strongly dependent on the surface DNA CP density. To maximize hybridization efficiency and thus DNA assay sensitivity, we evaluated the response of sensors obtained from immobilization solutions containing different CP concentra-

tions, ranging from 0.05  $\mu\text{M}$  to 1  $\mu\text{M}$ , according to the procedure described in the Experimental Section. Results are shown in Figure 2A. An optimum value of sensitivity (slope of a



**Figure 2.** (A) Effect of the capture probe concentration on the slope of the calibration curve. (B) Variation of the analytical response with the concentration of DNA (red circles) from  $T_{80}$  (gray inverted triangles) from  $T_{100}$ .

calibration curve between 0.1 and 3 nM) was found as a tradeoff between the number of surface-tethered receptors and their accessibility for hybridization (steric crowding and repulsive electrostatic interactions), while the blank response was negligibly affected. Accordingly, a DNA CP concentration of 0.1  $\mu\text{M}$  was systematically used thereafter.

The analytical performance of the genosensor was first examined using the 80-mer specific synthetic target  $T_{80}$ . A linear response with the  $T_{80}$  concentration was obtained within the range of 0.1–3 nM [ $i$  ( $\mu\text{A}$ ) =  $(1.11 \pm 0.02)C_{T_{80}}$  (nM) +  $(0.02 \pm 0.04)$ ;  $r = 0.9990$ ;  $n = 5$ ]. At higher concentrations, a level-off in the current intensity was detected as a consequence of the saturation of the binding sites. The detection limit, calculated as three times the standard deviation of the blank divided by the slope of the regression equation, was estimated to be 9 pM (54 amol in a hybridization volume of 6  $\mu\text{L}$ ), and the assay reproducibility assessed as the relative standard deviation from independent experiments with at least four different sensors was found to be 7% at the 100 pM concentration level and 24% at the 3 nM concentration level.

To evaluate the possible impact of the 21 nt overhang on the sensitivity, the analytical performance of the electrochemical genosensor was re-examined for  $T_{100}$ . Once again, the amperometric signal increased monotonically with the concentration of  $T_{100}$ , and the calibration curve and dynamic range were roughly the same as those obtained for  $T_{80}$  [ $i$  ( $\mu\text{A}$ ) =  $(1.32 \pm 0.06)C_{T_{100}}$  (nM) +  $(0.11 \pm 0.09)$ ;  $r = 0.995$ ;  $n = 5$  in the range of 0.1–3 nM]; therefore, no deleterious effect was observed experimentally (see Figure 2B). Similar results were reported for single-stranded tails of 22 nt<sup>36</sup> and 48 nt,<sup>37</sup> although a slowdown in hybridization kinetics was recorded in

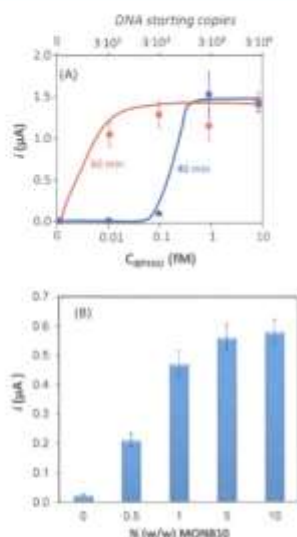
the latter case that rendered slightly lower currents at equilibrium. In our case, the kinetic effect was not apparent since a hybridization time of 120 min was already established from the beginning. On the other hand, a 38 nt tail at the proximity of the electrode surface led to a significantly lower signal, with respect to the target DNA without overhangs. The discrepancy might be explained by the particularly strong secondary structure of that target sequence and the influence of a different diluent thiol that might lead to different capture probes densities.<sup>31</sup>

During the recent years, we are witnessing the broadening of the food analysis tool box with emerging technologies, such as hybridization assays and genosensors.<sup>32–41</sup> Although most of them have demonstrated their potential with synthetic oligonucleotides, as a proof of concept, the jump to the real world by using certified reference materials remains mostly unexplored. Different signal amplification approaches<sup>42–44</sup> have been described achieving nanomolar–picomolar level sensitivities, which, in a few cases, have been challenged with food samples, reporting successful results difficult to explain taking into account the sensitivity of the described tests.<sup>42,43</sup>

Considering the sensitivity of the electrochemical genosensor here developed (detection limit in the low picomolar range), we decided to test it for direct detection of GM-maize-extracted DNA without DNA amplification. However, neither the direct genome analysis nor its digestion with restriction endonucleases to release the target sequence from the entire genome led to a successful outcome (see the Supporting Information for details). The result is not so unexpected, considering the complexity characterizing plant genomes with rampant polyploidy and, in particular, that of maize, which is in the size range of the human genome,<sup>45</sup> as well as the low percentage of transgenic material present in the total raw sample. Consequently, size restriction of the assessed DNA and sensitivity improvement seem to be indispensable for successful application of the genosensor to detect the CaMV35S promoter in food samples. Both requirements are simultaneously met by combining the electrochemical genosensors with a previous isothermal DNA sample amplification such as helicase-dependent amplification (HDA).

**Combining HDA and Electrochemical Genosensor.** On the basis of the real-time HDA results (*vide supra*), a reaction time of 40 min was chosen to perform the end-point isothermal amplification at 65 °C, by using the same reaction mixture as in real-time experiments, except the fluorophores. The generated 105 bp fragments from different starting  $T_{100}$  copies were then 10-fold diluted for subsequent evaluation with the electrochemical hybridization assay. Under these conditions, 3000 copies of  $T_{100}$  were unequivocally detected, while an increase in amplification time of 20 min led to an improved and very convenient detectability of 30  $T_{100}$  copies (S/B = 146) fulfilling the 0.9% European requirements for GMO testing with regard to the limit of detection (Figure 3A).

Genomic DNA isolated from 10% (w/w) MON810 maize GM flour was serially diluted to final concentrations equivalent to 1000, 500, 100, and 50 target DNA molecules (P35S copies) per microliter, considering that one haploid genome molecule corresponds to 2.6 pg of maize DNA,<sup>47</sup> and the hemizygous contribution of the MON810 construct to the genome extracted from the certified standard (50 ng of maize DNA from 10% MON810 flour ~20 000 haploid genome copies ~1000 P35S copies). In order to level the effects from sample treatment and minimize the bias associated with serial dilutions,



**Figure 3.** (A) Amperometric current obtained for different starting  $T_{105}$  copies after 40 min (blue) and 60 min (red) of HDA reaction at 65 °C. (B) Variation of the electrochemical response for different percentages of MON810 in maize flours after 60 min of isothermal amplification of the extracted DNA.

extracted GM maize genome was diluted with non-GM one (<0.1% MON810 maize) up to a total amount of DNA of 50 ng per reaction tube. One microliter of each previous solution was used to prepare the HDA reaction cocktail that was amplified for 60 min at 65 °C after an initial denaturation at 95 °C for 5 min, for efficient amplification. HDA specific amplicons were detected with the electrochemical genosensor without any additional treatment or purification, unlike other previous PCR-coupled hybridization assays.<sup>45,47</sup> A summary of the general protocol is presented in Scheme S1 in the Supporting Information.

As shown in Figure 3B, the HDA–genosensor combination allows unambiguous discrimination of 0.5% (w/w) MON810, below the threshold level defined by the European Union for mandatory labeling (0.9%), with a reproducibility of 9.5%. Remarkably, the signal recorded for genomic DNA extracted from the maize flour certified as <0.1% MON810 (0%) is not significantly different from that for the negative control. The improved selectivity provided by the additional genosensing step is apparent from the negligible blank signals, even at an amplification time of 60 min, leading to more-reliable results, in comparison with HDA alone.

## CONCLUSIONS

In this work, an efficient, sensitive and reliable GMO detection system that combines helicase-dependent isothermal DNA amplification and subsequent analysis of unpurified amplicons by an electrochemical genosensor is reported.

The remarkable specificity of the assay hinges on two pillars: the isothermal DNA amplification directed by specific primers,

coupled to the hybridization of HDA products with specific capture and signaling probes. Although nonspecific amplification takes place to some extent, the byproducts are not detected with the genosensors, provided that simple but judicious design of primers and hybridization probes is performed; key points are discussed in this regard.

This method requires simple, affordable, and portable equipment (a heating block and a potentiostat) with low-power consumption and easily amenable to in-field detection, particularly, but not exclusively, for the routine control of raw materials in food and feed. It could be advantageously applied for specific detection of scarce amounts of nucleic acid biomarkers relevant in diagnostic, environmental, and food analysis.

## ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.analchem.5b02271.

Details of experiments and additional information as noted in the text (PDF)

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*Tel.: +34 985 106235. E-mail: mjlc@uniovi.es

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was financially supported by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (Project No. CTQ2012-31157), the FP7 PEOPLE-2013-IRSES Marie Curie Actions programme (GMOsensor Project No. 612545) and cofinanced by FEDER funds. We thank Dr. José Luis Martínez-Fernández for technical assistance in real-time HDA amplification and sequencing. S.M.-M., as a participant of Curso de Doutorado em Biotecnologia, thanks the CAPES/PAPEPI program for a predoctoral grant supported by the Ministry of Education of Brazil. R.M.-C. thanks Principado de Asturias government and FICYT for a Clarín postdoctoral contract. Dedicated in memory of Prof. Marco Mascini.

## REFERENCES

- Celez, P.; Kukočková, M.; Rencziová, V.; Natarajan, S.; Pálffy, R.; Gardlik, R.; Hodový, J.; Behálak, M.; Vlková, B.; Misárik, G.; Szemes, T.; Stachlik, S.; Tuzla, J. *Biomol. Biotechnol.* **2005**, *18*, 531.
- Kumar, S.; Kumar, V.; Yogender, D.; Khosa, P.; Rohad, R. C. In *Biotechnology for Environmental Management and Resource Recovery*; Kishor, R. C.; Singh, A., Eds.; Springer: New Delhi, India, 2013; p 191.
- Saylor, G. S.; Ripp, S. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 286.
- European Commission. *Off. J. Eur. Union* **2003**, *268*, L1–L22.
- European Commission. Regulation (EC) No. 1831/2003 concerning the traceability and labelling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending Directive 2001/18/EC. *Off. J. Eur. Union* **2003**, *268*, L24–L28.
- James, C. *Brief No. 49: Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops 2014*. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA); Ithaca, NY, 2014. (<http://www.isaaa.org>.)
- <http://gmo-cfjpc.ec.unova.eu/gnomethods> (last accessed June 15, 2015).



- (8) GMO Detection Laboratory in Shanghai Jiao Tong University (GMODL-SJTU); GMO Detection Method Database (GMDD). <http://gmdd.sjtu.edu.cn> (last accessed June 15, 2015).
- (9) Morisset, D.; Novak, P. K.; Zupanič, D.; Gruden, K.; Lavrač, N.; Žel, J. *BMC Bioinf.* **2014**, *15*, 258.
- (10) Wu, Y.; Wang, Y.; Li, J.; Li, W.; Zhang, L.; Li, Y.; Li, X.; Li, J.; Zhu, L.; Wu, G. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 7358.
- (11) Morisset, D.; Stebih, D.; Camkar, K.; Žel, J.; Gruden, K. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *227*, 1387.
- (12) Zhang, F.; Wang, L.; Wang, R.; Ying, Y.; Wu, J. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 1523.
- (13) Xu, C.; Li, L.; Jin, W.; Wan, Y. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 18197.
- (14) Huang, X.; Zhai, C.; You, Q.; Chen, H. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406*, 4243.
- (15) Li, J.; Masclmald, J. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *64*, 196.
- (16) Deng, H.; Gao, Z. *Anal. Chim. Acta* **2015**, *853*, 30.
- (17) Vincent, M.; Xu, Y.; Kong, H. *EMBO Rep.* **2004**, *5*, 793.
- (18) Li, B.; Chen, X.; Ellington, A. D. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 8371.
- (19) Jiang, Y. S.; Bhadra, S.; Li, B.; Wu, Y. R.; Milligan, J. N.; Ellington, A. D. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 3314.
- (20) An, L.; Tang, W.; Ranalli, T. A.; Kim, H.-J.; Wytiaz, J.; Kong, H. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 28952.
- (21) Mahalanabis, M.; Do, J.; AlMuyad, H.; Zhang, J. Y.; Klapperich, C. M. *Bioméd. Microscopica* **2011**, *13*, 599.
- (22) Barreda-García, S.; González-Álvarez, M. J.; de los-Santos-Álvarez, N.; Palacios-Gutiérrez, J. J.; Miranda-Ortíz, A. J.; Lobo-Castafón, M. J. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *68*, 122.
- (23) Chow, W. H. A.; McCloskey, C.; Tong, Y.; Hu, L.; You, Q.; Kelly, C. P.; Kong, H.; Tang, Y.-W.; Tang, W. *J. Mol. Diagn.* **2008**, *10*, 452.
- (24) Kivlehan, F.; Mavrè, F.; Talini, L.; Lamoges, B.; Marchal, D. *Analyst* **2011**, *136*, 3635.
- (25) Tong, Y.; McCarthy, K.; Kong, H.; Lamière, B. *J. Mol. Diagn.* **2012**, *14*, 569.
- (26) Miranda-Castro, R.; de los-Santos-Álvarez, P.; Lobo-Castafón, M. J.; Miranda-Ortíz, A. J.; Tuñón-Blanco, P. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 4050.
- (27) Barroso, M. F.; Freitas, M.; Oliveira, M. B. P. P.; de los-Santos-Álvarez, N.; Lobo-Castafón, M. J.; Delerue-Matos, C. *Talanta* **2015**, *134*, 158.
- (28) Han, J.; Wu, Y.; Huang, W.; Wang, B.; Sun, C.; Ge, Y.; Chen, Y. *Food Control* **2012**, *23*, 696.
- (29) Primer3 software. <http://gmdd.sjtu.edu.cn/primer3> (last accessed June 15, 2015).
- (30) [http://www.biohelix.com/products/lowAmpII\\_HFDNA\\_kit.asp](http://www.biohelix.com/products/lowAmpII_HFDNA_kit.asp) (last accessed June 15, 2015).
- (31) (a) Zuker, M. *Nucleic Acid Res.* **2003**, *31*, 340610.1093/nar/gkg595. (b) MFOLDROOT. <http://www.bicinfo.rpi.edu/applications/mfold> (last accessed June 15, 2015).
- (32) Primer-BLAST. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast> (last accessed June 15, 2015).
- (33) Irving, D.; Gong, P.; Leckey, R. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 7631.
- (34) Reynaldo, L. P.; Vologodskii, A. V.; Neri, B. P.; Lyamichov, V. I. *J. Mol. Biol.* **2000**, *297*, 511.
- (35) Tavaillat, R.; Darwish, N.; Gebala, M.; Hibbert, D. B.; Gooding, J. J. *ChemElectroChem* **2014**, *1*, 165 and references therein.
- (36) Miranda-Castro, R.; de los-Santos-Álvarez, N.; Lobo-Castafón, M. J.; Miranda-Ortíz, A. J.; Tuñón-Blanco, P. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 2390.
- (37) Lai, R. Y.; Lagally, E. T.; Lee, S.-H.; Soh, H. T.; Plazco, R. W.; Hoeger, A. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 4037.
- (38) Martín-Fernández, B.; Miranda-Ortíz, A. J.; Lobo-Castafón, M. J.; Frutos-Cabanillas, G.; de los-Santos-Álvarez, N.; López-Ruiz, B. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *60*, 244.
- (39) Manzanera-Palencia, C. L.; Martín-Fernández, B.; Sánchez-Paniagua López, M.; López-Ruiz, B. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2015**, *66*, 19.
- (40) Arugula, M. A.; Zhang, Y.; Simonian, A. L. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 119.
- (41) Elena, D. S.; Kalojianni, D. P.; Glyson, K.; Ioannou, P. C.; Christopoulos, T. E. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *392*, 347.
- (42) Huang, L.; Zheng, L.; Chen, Y.; Xue, F.; Cheng, L.; Adeloju, S. B.; Chen, W. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *66*, 431.
- (43) Güven, B.; Boyacı, I. H.; Tamet, U.; Acar-Soykut, E.; Dogan, U. *Talanta* **2015**, *136*, 68.
- (44) Wang, X.; Teng, D.; Guan, Q.; Tian, F.; Wang, J. *Food Chem.* **2015**, *173*, 1022.
- (45) Liao, W.-C.; Chuang, M.-C.; Ho, J.-A. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *50*, 434.
- (46) Schmale, P. S.; et al. *Science* **2009**, *326*, 1112.
- (47) Arumuganathan, K.; Earle, E. D. *Plant Mol. Biol. Rep.* **1991**, *9*, 208.
- (48) Wang, R.; Minunni, M.; Tombelli, S.; Mascini, M. *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *20*, 598.
- (49) Chamsuphak, P.; Kerman, K.; Takamura, Y.; Tamiya, E. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2007**, *8*, 323.

# **Targeting helicase-dependent amplification products with an electrochemical genosensor for reliable and sensitive screening of genetically-modified organisms**

S. Moura-Melo, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez, A.J. Miranda-Ordieres, J. Ribeiro Dos Santos Junior, R. A. da Silva Fonseca, M. J. Lobo-Castañón

## **Supporting Information**

CONTENT:

Electrochemical instrumentation

DNA structural analysis from mfold web server

Genosensor design

DNA isolation from food samples

Enzymatic digestion of genomic DNA

Supplementary figures and schemes

### *1. Instrumentation*

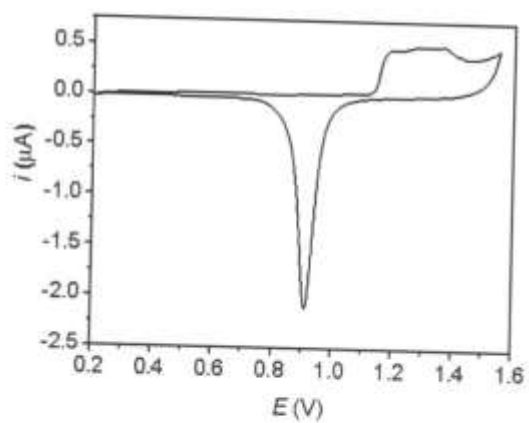
The electrochemical measurements were driven by a  $\mu$ Autolab type II potentiostat/ galvanostat computer-controlled with GPES 4.9007 software (EcoChemie B.V., The Netherlands) using a conventional three-electrode configuration. It consisted of a gold working electrode obtained by physical vapor deposition, an Ag | AgCl | KCl (sat) reference electrode with an external saturated solution of  $\text{KNO}_3$  to avoid the leakage of chloride ions to the cell solution (0.201 mV with respect to SHE), and a platinum counter electrode.

The gold thin-film deposition was conducted in an Edwards auto 306 vacuum coater by thermal evaporation of a gold wire (99.9% purity) in high vacuum ( $10^{-6}$  torr) and subsequent condensation on a polyester workpiece previously irradiated with UV (365 nm) for 5 days to enhance polymer insaturation grade, which favors gold film adherence. The resulting gold-plated sheet (Au layer thickness of 65-80 nm) was cut into pieces of about  $30 \times 10$  mm. A copper strip was coupled to each fragment to provide the electrical contact, and an adhesive tape with a hole of 2 mm in diameter allowed defining the electrode surface ( $0.0314 \text{ cm}^2$  geometric area). Finally, lateral sides were wrapped with Teflon to protect them from the solution.

For cleaning and conditioning, the gold surface was firstly held at 1.8 V for 10 s. Next, the electrode was cyclically cleaned under acidic conditions (scan rate 0.1 V/s; in 0.5 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) in the potential range from 0.2 to 1.55 V, until a stable redox wave was obtained (**Fig S1**). Afterward, the electrode was washed with Milli-Q water, dried with  $\text{N}_2$  and immediately modified with the biosensing phase.

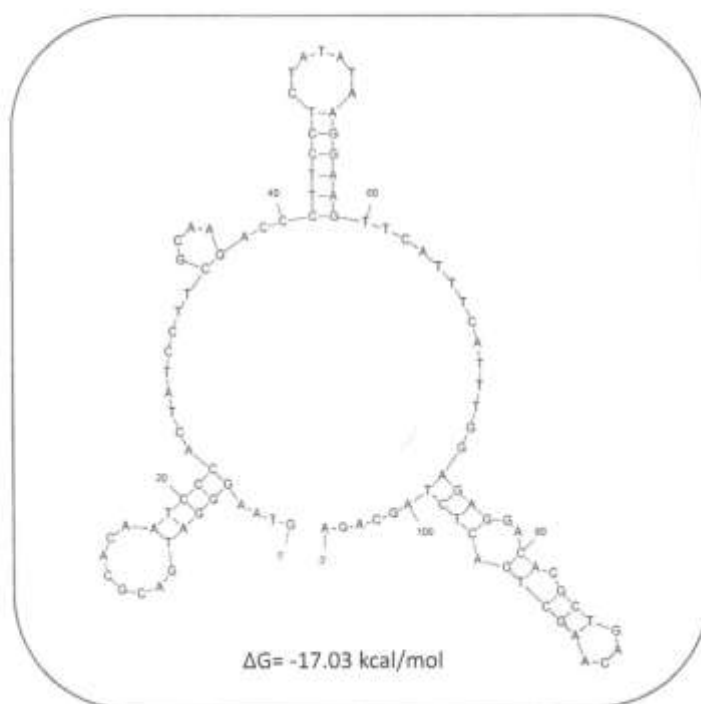
Chronoamperometric measurements were performed by immersing the working electrode in a microcell (maximum working volume of 500  $\mu\text{L}$ ) designed by our group. At the bottom, a filter

paper salt bridge allows the electrical contact with the external solution where reference and counter electrodes are placed.



**Figure S1:** Cyclic voltammogram in 0.5 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  obtained with a cleaned gold electrode. Scan rate  $100 \text{ mV s}^{-1}$

2. Structural analysis obtained from mfold web server

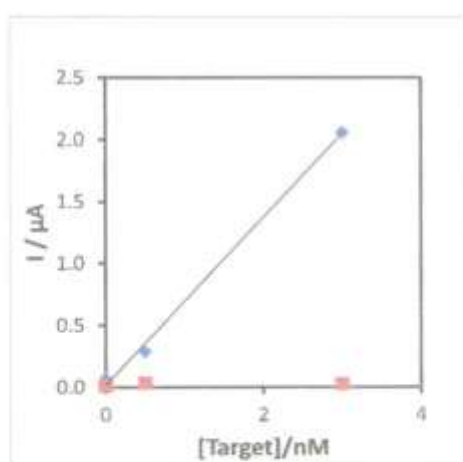


**Figure S2:** Most stable structure of  $T_{105}$  (105-nt target) at 20°C and 0.3 M  $\text{Na}^+$  from mfold web server<sup>31</sup>

<sup>31</sup> S1. Zuker, M. *Nucleic Acid Res* **2003**, *31*, 3406. MFOLDROOT (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold>).

### 3. Genosensor design

Experiment that evidences the competition between the forward primer and the target for the immobilized capture probe when the latter one is complementary to the primer, **Figure S3**:



**Figure S3:** Electrochemical genosensor response for target concentration ranging from 0 to 3 nM in the absence (blue) or presence (red) of 75 nM of forward primer.

#### ***4. DNA isolation from food samples: purity and quality control***

Genomic DNA of certified reference materials was extracted and purified using the Nucleospin® food kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer recommendations. Briefly, each sample (approximately 100 mg homogenized powder) was put into a 1.5 mL sterile tube with 700 µL of lysis solution preheated at 65 °C and 10 µL of proteinase K (10 mg/mL) to be incubated in a thermal block (Thermomixer Comfort, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) at 65 °C for 1 h with continuous medium stirring, and vortexed every 20 min to help break down the cell wall. 2 µL RNase A (10 mg/mL; Thermo Scientific) were then added and, after a 10-min incubation at 37 °C to digest RNA, the tube was centrifuged at 4 °C at 17000 g. Clear supernatant liquid was transferred to a new sterile tube where the same volume of binding buffer and ethanol (96-100 %) was added, and homogenization was subsequently carried out by inversion. Then, each mixture was transferred to one spin column and centrifuged at room temperature (11000 g, 1 min). The silica membrane was washed with the recommended buffers followed, in each case, by a 2-min centrifugation at 11000 g; and the flow-through was discarded. The column was placed in a new sterile tube and, after 5-min incubation with 80 µL of double distilled water preheated at 70 °C, DNA elution was performed by centrifugation (11000 g, 1 min). Sterile pipette tips with aerosol filter were used to prevent cross contamination.

DNA concentration was evaluated for each sample by measuring the absorbance at 260 nm on a UV-vis spectrophotometer (Cary 60 Agilent) with a mirrored ultramicrovolume cuvette cap (1 mm path length) allowing the direct measurement of 3 µL of DNA sample. DNA purity was determined from the absorbance ratio  $A_{260}/A_{280}$  (values ranging from 1.7-1.9 in accordance with kit specifications).

Conventional PCR was carried out for DNA quality control using a primer pair *FP<sub>159</sub>/RP<sub>159</sub>* (Table 1). These universal primers were designed on chloroplast *rbcL* gene<sup>2</sup> encoding the large subunit of ribulose 1,5 biphosphate carboxylase/ oxygenase (RUBISCO), widely used for plant phylogenetic analyses. The amplification was performed in 25  $\mu$ L of PCR mixture containing 2  $\mu$ L DNA template, 1 $\times$  buffer PCR, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 250  $\mu$ M dNTPs, 0.2  $\mu$ M each primer, and 2.5 U Immolase<sup>TM</sup> DNA polymerase (Ecogen, Spain). Reactions were run in a thermal cycler (GeneAmp<sup>®</sup> PCR System2700 thermocycler (Applied Biosystems, Spain)) programmed according to the following protocol: 5 min at 95 °C, followed by 40 repetitions of 30 s at 95 °C, 30 s at 58 °C, and 90 s at 72 °C. A final elongation step was performed at 72 °C for 7 min.

PCR results were evaluated by electrophoresis (1 $\times$  TBE running buffer) on 2 % (w/v) agarose gel and ethidium bromide staining (0.5  $\mu$ g/ mL) at 80 V. Visualization of DNA in agarose gel (UV transilluminator) showed a single band of the expected length (about 190bp) compared to the DNA ladder (100bp DNA Ladder, Invitrogen). The resulting amplified fragments were purified (E.Z.N.A. Gel Extraction Kit, Omega Bio-Tek) to be sequenced using the Genome Walker kit (Clontech, USA) along with the ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer. The sequences were contrasted with those stored in GenBank, using the NCBI BLAST algorithm (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) confirming the identity of the sample (*Zea mays* cultivar B73 chloroplast accession number AY928077.1) with 99% homology.

Blank extractions were also done in parallel, and their absorbance and PCR amplificability were assessed, leading to the expected negative results.

---

S2. Han, J.; Wu, Y.; Huang, W.; Wang, B.; Sun, C.; Ge, Y.; Chen, Y. *Food Control* **2012**, *25*, 696.



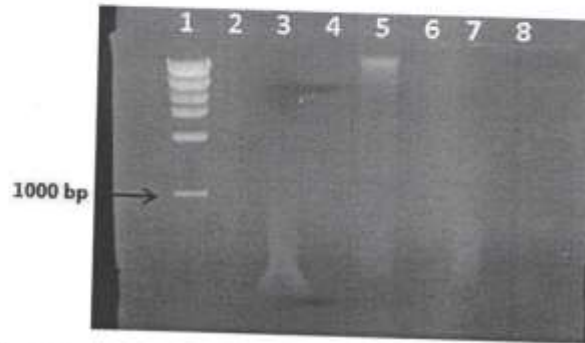
DNA extracts were aliquoted and stored (-20°C) until use, and repetitive freeze-thaw cycles were minimized to maintain sample integrity.

#### **5. Enzymatic digestion of genomic DNA:**

1 µg genomic DNA was digested with a couple of restriction enzymes, MmeI and HpyCH4III from New England BioLabs Inc., using 2 units/ µg DNA in 25 µL reaction mixture containing 1× CutSmart Buffer (final concentration) supplemented with 50 µM S-adenosylmethionine (SAM), cofactor for MmeI. The digestion was performed at 37 °C overnight, followed by 30 min at 65 °C for enzyme inactivation. Non-GM maize genomic DNA was also subjected to enzymatic digestion and used as a control.

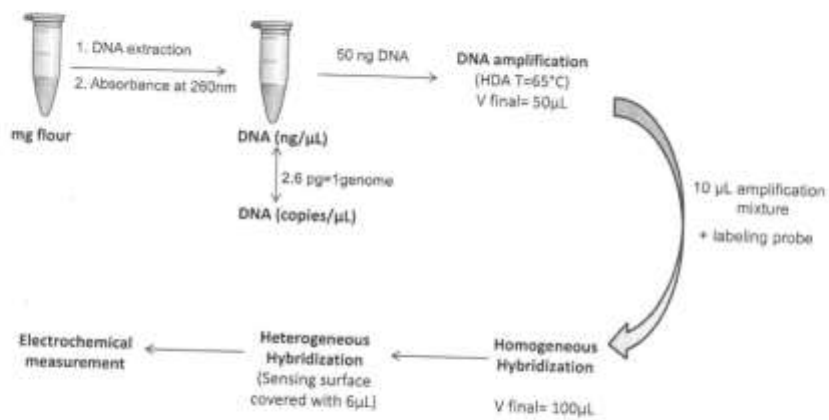
The restriction endonucleases were selected with the tool NEBcutter V2.0 (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2>), a double digest finder, considering the 35S promoter DNA sequence, and controlling the absence of recognition sites for both enzymes within the target sequence. A 134-nucleotide region including the target sequence is expected to be released from whole genome.

The digested DNA was analyzed by agarose gel electrophoresis (0.8 % w/v stained with 0.5 µg/mL ethidium bromide) at 90 V. Roughly the same amount of total DNA was loaded in each well. The smearing detected in lanes 3 and 7 (**Fig. S3**) means many bands close enough in size are generated and smaller than 1000 bp. This is reasonable since the enzymes used in the digestion recognize a sequence of 6 bases (6-base cutters) and these sites can be found many times in the maize genome. Conversely, uncut genomic DNA got stuck in the well (lane 5 in **Fig. S4**).



**Figure S4:** 0.8 % Agarose gel electrophoresis (in 1×TBE buffer) of Zea mays genomic DNA. Lane1: Ladder, lane 3: overnight digestion of MON810-10%, lane 5: uncut MON810-10%, lane 7: overnight digestion of MON810-0%.

**6. General protocol of sample analysis:**



**Scheme S1:** General protocol of sample analysis, including DNA content units and equivalences.

## **Anexos**

(Certificados dos DNA e prêmio da  
Comunidade Espanhola de Química  
Analítica)



INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES

1404414

Order No: 2314477  
Ref No: 66849580

Sequence - Target Pairs

200 nmoles DNA oligo, 80 Bases

5- CAC TAT CCT TCG CAA GAC CCT TCC TCT ATA TAA GGA AGT TCA TTT CAT TTG GAG AGG ACA CAC TCA  
CAA GCT GACTCT AG 3

Properties	Amount of Oligo	Shipped To
Tm (50 mM NaCl): 88.4 °C	85.3	MARIA JESUS LOBO
GC Content: 45%	00 nM	UNIVERSIDAD DE OVIEDO
Molecular Weight: 24031.9	nMoles	FAC QUIMICA OPTO QUIMICA FISICA
mw:ODN: 1.3		OVIEDO, 33006
sp:ODN: 32.1		SPAIN
Ext. Coefficient: 79400 (1/mole cm)		(349) 851-0296
		Customer No: 4225446 P.O. No: 11-04-2014

Oligo Base Types	Quantity	Modifications and Services	Quantity
DNA Sides	80	Standard Densitog Mfg. ID: 139364E3	1

\* Integrated services may appear as either a purchase item or a credit item. This service does not affect the quantity of the oligo.  
\* Please arrange pickup prior to shipping. Some of the product may have been shipped already shipping.



140414

Sequence - Capurap358-3H

Order No. 2314477  
 Ref No. 66849581  
 250 nmole DNA oligo 27 bases

5-ADA GGA AGG GTC TTG CGA AGG AAG GTG GTTACCTC-G-3

Properties	Amount of Oligo	Shipped To
Tm (50 mM NaCl) 61.4 °C	42.5 = 150.8 = 1.32	MAIYA, ESTIUS LERO
GC Content 51.9%	OD ml	UNIVERSIDAD DE OVIEDO
Molecular Weight 8732.8	nMoles	FAC QUIMICA OPTO QUIMICA FISICA
Amol/ODuv 31.5	ng	OVIEDO, 33006
sp/ODuv 30.9		SPAIN
ET Coefficient 28200 (U/mole-cm)		(349) 951-0298
		(Customer No. 4225446) 11-04-2014

Oligo Base Types	Quantity	Modifications and Services	Quantity
27A bases	27	5' 3'ph Master C3 5.8 (Quality) Standard Cleaning	1
		MS-01 (11/5/2007)	

**Disclaimer**

The information provided is for informational purposes only. It is not intended to be used for clinical, diagnostic, or product development purposes.

Bayer Raw  
 Absorbance = E · b · C

- Application covers only material as shown in the order form at the time of purchase. The customer does not affect the quality of the product. They have been developed during shipping.

DA: 23/JABR/2014



INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES

140614

Order No: 2314477  
Rev No: 66849582

Sequence - **hsp25-f1M**

200 nmole DNA oligo: 33 Bases

5'-**ATGTAACCTA GAA TCA CCTTCT CAG CTT CTC CTC TCC AAA TGA AAT GAA CTT CCT TAT AT -3**

<b>Properties</b>	<b>Amount of Oligo</b>	<b>Shipped To</b>
Tm (0.1M NaCl): 66.9 °C	49.3 = 143.4 = 1.89	MARIA JESUS LOBO
G/C Content: 41.5%	OD 2M	UNIVERSIDAD DE GUAYMA
Molecular Weight: 18794	micromoles	UNIVERSIDAD DE GUAYMA
residue count: 19	mg	CALLE GUAYMA PRTO GUAYMA P.R. 00981
up/down: 13/6		TEL: (787) 835-1028
Ext. Concentr: 52480 U/micromole		Created on: 4/23/14 6:07 PM

Oligo Base Types	Count	Modifications and Services	Count
DNA Bases	33	5'-3' Amino Standard Desalting 480 up 13170915	1

**Disclaimer**

See our website page (www.xid.com) for A/B/T/U usage, what factors, and product availability

- Labeled nucleotides may appear as primer or terminator (N) or a single product. This is due to the nature of the synthesis process and the quality of the reagents.
- Please contact us before placing an order to ensure that the product you have been ordered is being shipped.



18/05/14

Order No. 2356398  
Ref No. 67645398

Sequencia - Promotor-10mer  
PAGE UltraMax® DNA Oligo, 100 Bases

5'-GTA AGG GAT GAC GCA CAA TCC CAC TAT CCT TCG GAA GAC CCT TCC TCT ATA TAA GGA AGT TCA TTT  
CAT TTG GAG AGG ACA CAC TGA CAA GCT GAC TCT AGC AGA -3'

Properties	Amount of Oligo	Shipped To
Tm (50 mM NaCl): 71.2 °C	3.2 = 3.2 = 0.1	MARIA JESUS LOBO
GC Content: 48.7%	00 ug = nMoles	UNIVERSIDAD DE OVIEDO
Molecular Weight: 3203	mg	FAC QUIMICA DPTO QUIMICA FISICA
Amplification: 1		OVIEDO, 33006
spCt: 31.7		SPAIN
Ext. Coefficient: 1018600		(349) 851-0296
(Lyophilized)		Customer No. 4229446 P.O. Box 17-9-2014

Oligo Base Types	Quantity	Modifications and Services	Quantity
DNA Bases	105	PAGE Purification	1
		406-00-13784733	

Humidifica cuidadosamente

Reserva 100 µl en 300 µl → 10 µM → 100 µl → 10 µM → 100 µl → 10 µM → 100 µl → 10 µM

$$\frac{3.2 \times 10^{-9} \text{ mol} \times 1000}{3.2 \times 10^{-6} \text{ L}} = 100 \mu\text{M}$$

100 µl → 10 µM → 100 µl → 10 µM → 100 µl → 10 µM → 100 µl → 10 µM

Lyophilized contents may appear as either a translucent film or a white powder. This material does not affect the quality of the oligo.  
Please centrifuge tubes prior to opening. Some of the product may have been damaged during shipping.

## CERTIFICATE OF ANALYSIS

ERM® - BF413ak (blank maize)

430

MAIZE SEED POWDER	
	Mass fraction
	Certified value <sup>2)</sup> [g/kg]
MON 810 maize <sup>1)</sup>	< 0.9 → < 0.03 %
<p>1) The MON 810 maize is genetically modified and corresponds to the unique identifier MON-ØØ81Ø-Ø.</p> <p>2) The CRM has been produced from conventional, non-modified maize seeds. No contamination was detected in this material when applying event-specific real-time PCR targeting the MON 810 event. The limit of detection for the pure GM MON 810 maize used in the CRM set ERM-BF413ak-gk was 0.9 g/kg. With a 95 % probability, the true value of the material is below this level. The certified value is traceable to the International System of Units (SI).</p>	

This certificate is valid for one year after purchase.

Sales date: 04. Juli 2014

The minimum amount of sample to be used is 100 mg.

### NOTE

European Reference Material ERM®-BF413ak was produced and certified under the responsibility of the Institute for Reference Materials and Measurements of the European Commission's Joint Research Centre according to the principles laid down in the technical guidelines of the European Reference Materials® co-operation agreement between BAM-IRMM-LGC. Information on these guidelines is available on the internet (<http://www.erm-crm.org>).

Accepted as an ERM®, Geel, August 2009

Latest revision: July 2011

Signed: \_\_\_\_\_



Prof. Dr. Hendrik Emons  
 European Commission  
 Joint Research Centre  
 Institute for Reference Materials and Measurements  
 Retieseweg 111  
 B-2440 Geel, Belgium



## CERTIFICATE OF ANALYSIS

ERM<sup>®</sup> - BF413ek (2.10 MON 810) 46g

MAIZE SEED POWDER		
	Certified value	Uncertainty <sup>5)</sup>
MON 810 maize mass fraction <sup>1)</sup>	19.8 g/kg <sup>2)</sup> 20g (acc) 0.9	1.5 g/kg
MON 810 maize DNA copy number ratio <sup>3)</sup>	0.77 % <sup>4)</sup>	0.08 %

1) Mass fraction of MON 810 maize (unique identifier code MON-00810-6) based on the masses of genetically modified MON 810 maize powder and non-modified maize powder and their respective water content.  
 2) The certified value is traceable to the International System of Units (SI).  
 3) Copy number ratio of MON 810 maize (unique identifier code MON-00810-6) as defined by the real-time Polymerase Chain Reaction detection method ISO 21570:2005, Annex D2, calibrated with the plasmid DNA Certified Reference Material ERM<sup>®</sup>-AD413.  
 4) The certified value is the unweighted mean of 17 accepted data sets, independently obtained from 11 laboratories. The value is traceable to the International System of Units (SI).  
 5) The certified uncertainty is the expanded uncertainty estimated in accordance with the Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM) with a coverage factor  $k = 2$ , corresponding to a level of confidence of about 95 %.

This certificate is valid for one year after purchase.

Sales date: 03. Nov. 2014


The minimum amount of sample to be used is 100 mg.

### NOTE

European Reference Material ERM<sup>®</sup>-BF413ek was produced and certified under the responsibility of the Institute for Reference Materials and Measurements of the European Commission's Joint Research Centre according to the principles laid down in the technical guidelines of the European Reference Materials<sup>®</sup> co-operation agreement between BAM-IRMM-LGC. Information on these guidelines is available on the internet (<http://www.erm-crm.org>).

Accepted as an ERM<sup>®</sup>, Geel, August 2009  
 Latest revision: July 2011

Signed: \_\_\_\_\_

  
 Prof. Dr. Hendrik Emons  
 European Commission  
 Joint Research Centre  
 Institute for Reference Materials and Measurements  
 Retieseweg 111  
 B-2440 Geel, Belgium

## CERTIFICATE OF ANALYSIS

ERM<sup>®</sup>-BF413gk (100%) 7160210

755

MAIZE SEED POWDER		
	Mass fraction	
	Certified value <sup>2)</sup> [g/kg]	Uncertainty <sup>3)</sup> [g/kg]
MON 810 maize <sup>1)</sup>	99	5

1) The MON 810 maize is genetically modified and corresponds to the unique identifier MON-00810-6.  
 2) The certified value is based on the masses of mixed dried genetically modified MON 810 maize seed powder and of dried non-modified maize seed powder, taking into account their respective purity with regard to MON 810 maize and their respective water content. The certified value is traceable to the International System of Units (SI).  
 3) The certified uncertainty is the expanded uncertainty estimated in accordance with the Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM) with a coverage factor  $k = 2$ , corresponding to a level of confidence of about 95 %.

This certificate is valid for one year after purchase.

Sales date: 08. Juli 2014


The minimum amount of sample to be used is 100 mg.

### NOTE

European Reference Material ERM<sup>®</sup>-BF413gk was produced and certified under the responsibility of the Institute for Reference Materials and Measurements of the European Commission's Joint Research Centre according to the principles laid down in the technical guidelines of the European Reference Materials<sup>®</sup> co-operation agreement between BAM-IRMM-LGC. Information on these guidelines is available on the internet (<http://www.erm-crm.org>).

Accepted as an ERM<sup>®</sup>, Geel, August 2009  
 Latest revision: July 2011

Signed: \_\_\_\_\_

  
 Prof. Dr. Hendrik Emons  
 European Commission  
 Joint Research Centre  
 Institute for Reference Materials and Measurements  
 Retielesweg 111  
 B-2440 Geel, Belgium

# ACTUALIDAD ANALÍTICA



BOLETÍN

de la

Sociedad Española de Química Analítica



SEQA/2015

Número 51, Septiembre, 2015

---

## ACTUALIDAD ANALÍTICA

---

ÍNDICE	2
EDITORIAL	4
NOTICIAS SEQA: XX SEQA 2015	5
<b>COMUNICACIONES PREMIADAS EN LA XX SEQA 2015</b>	
<b>DOCENCIA:</b>	
<b>-PREMIO CRC A LA MEJOR COMUNICACIÓN PÓSTER:</b>	
A. Muñoz de la Peña, D. Muñoz de la Peña, M.C. Hurtado-Sánchez, M.P. Godoy-Caballero, A. Espinosa Mansilla, I. Durán-Merás	
EVALUACIÓN AUTOMÁTICA DE COMPETENCIAS EN UN EJERCICIO DE INTERCOMPARACIÓN MEDIANTE ANOVA	
Departamento de Química Analítica e IACYS, Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, Avd. de Elvas S/N, Badajoz, 06006, Spain.	
Departamento de Ingeniería de Sistemas y Automática, Escuela Técnica Superior de Ingeniería, Universidad de Sevilla, Camino de los Descubrimientos, S/N, 41092, Sevilla, Spain. <a href="mailto:lduran@unex.es">lduran@unex.es</a>	6
<b>INVESTIGACIÓN:</b>	
<b>- PREMIOS SEQA COMUNICACIONES ORALES</b>	
Suely Moure-Melo, Rebeca Miranda-Castro, Noemí de-los-Santos-Álvarez, Arturo J. Miranda-Ordieres, J. Ribeiro Dos Santos Junior, Rosana A. da Silva Fonseca, María Jesús Lobo-Castañón.	
ELECTROCHEMICAL GENOSENSOR FOR THE CONTROL OF GMO IN FOOD AND FEED USING HELICASE-DEPENDENT AMPLIFICATION	
Department of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Oviedo, c/ Julián Clavería, 8, ES-33006, Oviedo.	
Federal University of Piauí, Institut of Biological Sciences, University of Pernambuco. <a href="mailto:mjc@uniovi.es">mjc@uniovi.es</a>	10
D. García-Gómez, L. Bregy, C. Barrios-Collado, G. Vidal-de-Miguel, R. Zenobi.	
REAL-TIME HIGH-RESOLUTION TANDEM MASS SPECTROMETRY IDENTIFIES FURAN DERIVATIVES IN EXHALED BREATH	
Department of Chemistry and Applied Biosciences (D-CHAB), ETH Zürich, Vladimir-Prelog-Weg 3, 8093, Zürich, Switzerland. <a href="mailto:gomez@org.chem.ethz.ch">gomez@org.chem.ethz.ch</a>	14
<b>- PREMIOS SEQA COMUNICACIONES PÓSTER:</b>	
R. Rodríguez, E. Peña Vázquez, P. Bermejo Barrera	
SÍNTESIS DE NUEVOS MATERIALES PARA LA DETERMINACIÓN DE MERCURIO Y METILMERCURIO EN MUESTRAS MEDIOAMBIENTALES	
Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Química, Universidad de Santiago de Compostela, Av. Das Ciencias s/n, 15782 Santiago de Compostela, A Coruña, Spain. <a href="mailto:rol.rodriguez@usc.es">rol.rodriguez@usc.es</a>	18
M. López-Claros, F.J. Fortes, S. Guirado, J.J. Laserna	
CHEMICAL FINGERPRINTS IN AN UNDERWATER ARCHAEOLOGICAL SHIPWRECK USING A REMOTE LASER-INDUCED BREAKDOWN SPECTROSCOPY SYSTEM	
Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Málaga, Campus de Teatinos s/n, 29071, Málaga, Spain. <a href="mailto:laserna@uma.es">laserna@uma.es</a>	21
S. Sonnberg, S. Armenta, S. Garrigues, M. de la Guardia	
DETECTION OF TETRAHYDROCANNABINOL RESIDUES ON HANDS BY ION MOBILITY SPECTROMETRY. CORRELATION WITH SALIVA ANALYSIS	
Department of Analytical Chemistry, University of Valencia, Research Building, 50th Dr. Moliner St., 46100 Burjassot (Valencia), Spain. <a href="mailto:sergio.armenta@uv.es">sergio.armenta@uv.es</a>	25

## INVESTIGACIÓN

### PREMIO SEQA COMUNICACIONES ORALES: 05

#### "ELECTROCHEMICAL GENOSENSOR FOR THE CONTROL OF GMO IN FOOD AND FEED USING HELICASE-DEPENDENT AMPLIFICATION"

Suely Moura-Melo, Rebeca Miranda-Castro, Noemí de los Santos-Ahvaraz, Arturo J. Miranda-Ordieres, J. Ribeiro Dos Santos Junior, Rosana A. de Silva Fonseca, María Jesús Lobo-Castañón.  
Department of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Oviedo, c/Julian Clavería 8, ES-33006, Oviedo.  
Federal University of Piauí, Institut of Biological Sciences, University of Pernambuco

Los organismos modificados genéticamente (OMGs o GMOs de sus siglas en inglés, genetically modified organisms) son organismos cuyo material genético ha sido manipulado mediante técnicas de ingeniería genética, con las que se consiguen incorporar al genoma de plantas y animales genes de bacterias o virus, dando lugar a organismos que no se producen en la naturaleza mediante métodos de cruzamiento tradicionales. Esta interferencia del hombre en el proceso natural de evolución se produce en principio para aportar beneficios a la humanidad. Prácticamente todos los OMGs comerciales están diseñados para aumentar la producción de los cultivos, incorporando genes extraños que aportan resistencia a la aplicación directa de herbicidas, permiten producir insecticidas, dan una mayor resistencia a la sequía etc. Sin embargo este tipo de organismos suscita no solo esperanzas sino también temores en la sociedad moderna. Sus defensores mantienen que el cultivo de OMGs resulta imprescindible para que la humanidad pueda afrontar las actuales tasas de crecimiento de la población, así como los problemas asociados al cambio climático. Sus detractores aseguran que el impacto de los mismos en la diversidad natural es imprevisible, sin que se haya demostrado inequívocamente que no producirán a largo plazo efectos negativos sobre la salud de personas y animales<sup>1</sup>.

En medio de esta controversia la extensión de cultivos de plantas transgénicas lleva creciendo a un ritmo anual del 3-4% durante las últimas dos décadas, alcanzándose en 2014 un total de 181,5 millones de hectáreas cultivadas<sup>2</sup>. Lo que es indudable es que los ciudadanos tienen derecho a realizar una elección fundamentada de los alimentos que consumen. De ahí que resulte fundamental el etiquetado de los alimentos derivados de OMGs, para garantizar la elección informada de los mismos. De hecho, la UE tiene una de las políticas más estrictas respecto al ingreso de productos que contienen OMGs<sup>3</sup>. Desde 2003 es obligatorio el etiquetado de todos los alimentos que los contengan a excepción de que su porcentaje sea inferior al 0,9% y su presencia sea inadvertida o técnicamente inevitable<sup>4</sup>.

En este contexto, la Química Analítica debe aportar herramientas fiables para evaluar la presencia de OMGs en alimentos. Actualmente, el análisis de estos componentes se realiza preferentemente mediante PCR en tiempo real<sup>5</sup>, pero su alto coste unido a la necesidad de realizar varios

análisis por muestra para determinar la identidad del transgénico, limita su uso a grandes laboratorios. Motivados por la necesidad de disponer de herramientas alternativas que permitan la detección rápida y fiable de OMGs en alimentos, el grupo de Electroanálisis de la Universidad de Oviedo (GEUO) (<http://www.uniovi.es/electroanalisis>) forma parte de un consorcio de 10 instituciones de España, Portugal, Francia, Brasil y Argentina (Figura 1), compuesto por más de 40 investigadores, encargado de ejecutar el proyecto europeo PIRSES-GA-2013-612545 GMOSensor en el marco de las Acciones Marie Curie (<http://www2.lseop.lpb.pt/gmosensor/>)



Figura 1: Distribución de los grupos que participan en la red europea GMOSensor y foto del grupo de electroanálisis de la Universidad de Oviedo.

El citado proyecto de dos años de duración, tiene como objetivo general el desarrollo de biosensores ópticos y electroquímicos para el cribado y detección rápida y de bajo coste de OMGs en piensos y productos alimenticios. Teniendo en cuenta las estrategias de análisis, se han establecido tres grupos de trabajo. El primero de ellos está

## INVESTIGACIÓN

dedicado a la obtención de métodos de cribado basándose en i) el análisis de regiones comunes a la mayoría de las secuencias transgénicas (genosensores), ii) el análisis de las proteínas transgénicas (inmunosensores). Con estas herramientas se pueden descartar las muestras que no contienen GMOs pasando a un análisis específico sólo las que sean positivas. El segundo grupo está dedicado al desarrollo de métodos específicos de cada construcción transgénica, que únicamente pueden llevarse a cabo a través de la detección de la región inserción del ADN extraño. El proyecto se centra principalmente en dos de los eventos transgénicos más comunes: el maíz MON810, resistente al taladro del maíz, y la soja Roundup ready, resistente al insecticida del mismo nombre. El tercer grupo utiliza métodos basados en PCR para la validación de los sensores y su aplicación a muestras reales, así como a la realización de estudios interlaboratorio. Mediante el intercambio de investigadores se ha podido combinar el know-how de cada equipo para alcanzar propuestas innovadoras, como el empleo de nanoestructuras portadoras de marcas electroactivas o esquemas isotérmicos de amplificación como los presentados en esta comunicación.

Dentro del primer grupo de estrategias, uno de los objetivos de nuestro grupo ha sido el diseño de un genosensor que pueda utilizarse en etapas de cribado y permita racionalizar esfuerzos y recursos a los laboratorios encargados de controlar la presencia de estos organismos en alimentos. Dentro de la construcción típica de los transgénicos (Figura 2) seleccionamos como diana una secuencia de ADN específica del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, que es uno de los más comunes en la composición molecular de las plantas genéticamente modificadas.



Figura 2: Construcción típica de los transgénicos y secuencia de ADN seleccionada como diana.

Los genosensores han demostrado hasta el momento su capacidad para detectar de manera rápida y sensible oligonucleótidos de ADN y ARN, pero para detectar ADN genómico, la complejidad de la diana a menudo limita sus aplicaciones. Por esta razón suele ser necesario combinar el genosensor con un proceso previo de amplificación de ácidos nucleicos que permita restringir el tamaño del ADN diana, facilitando su hibridación en superficie, al tiempo que mejora la sensibilidad del método. En este trabajo nos planteamos explorar una estrategia alternativa a la PCR, que no requiera ciclos de temperatura y por tanto facilite

las etapas de integración y miniaturización del dispositivo final desarrollado. Entre los diferentes métodos de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos descritos seleccionamos uno de los más sencillos: la amplificación isotérmica dependiente de helicasa (HDA).

Por tanto nuestra propuesta para desarrollar un método simple y robusto que permita detectar una secuencia de ADN específica del promotor P35S, es combinar la reacción HDA con un sensor electroquímico basado en la reacción de hibridación como reacción de reconocimiento. Como superficie de transductor utilizamos electrodos de oro, obtenidos mediante un proceso de deposición del oro por evaporación térmica a alto vacío sobre láminas de poliéster. Sobre esta superficie inmovilizamos un oligonucleótido sintético que constituye la capa selectiva para detectar los productos de amplificación HDA.

Mediante el software Primer 3 (<http://emdd.shgmo.org/primer3>) seleccionamos dentro de la secuencia del promotor P35S el fragmento más adecuado para su amplificación y los cebadores directo e inverso que permiten amplificar la secuencia de 105 bases seleccionada (Figura 2). La amplificación HDA sigue un esquema similar a la PCR. Su característica más distintiva es el empleo de una enzima helicasa que rompe los puentes de hidrógeno entre bases complementarias y separa la doble hebra, lo que en combinación con una proteína de unión a hebra simple (SSB) que estabiliza esta estructura, permite la hibridación de los cebadores y su posterior elongación por la polimerasa, todo ello a 65 °C, sin necesidad de utilizar ciclos de temperatura.

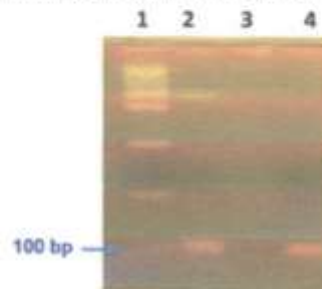


Figura 3: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación HDA obtenidos para un control negativo (2) y para  $3 \times 10^3$  copias del ADN diana (4). Marcador de tamaños (1).

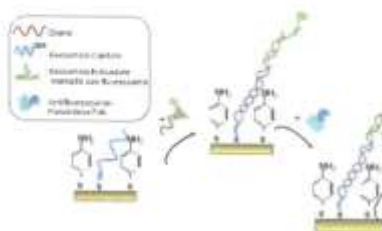
Comenzamos explorando la eficacia y selectividad de la reacción de amplificación empleando oligonucleótidos sintéticos. El análisis mediante electroforesis en gel de agarosa de los productos obtenidos después de 1 hora de amplificación (Figura 3) revela la presencia de una banda de aproximadamente 100 pares de bases, indicativo de

## INVESTIGACIÓN

amplificación positiva. La selectividad de la reacción de amplificación fue confirmada mediante la secuenciación de los productos generados, que en efecto presentan la secuencia esperada. Sin embargo, es preciso destacar que un control negativo sometido a idénticas condiciones de amplificación da lugar a productos con una secuencia diferente pero que no pueden diferenciarse por su tamaño en la electroforesis.

Para caracterizar la cinética del proceso de amplificación se utilizaron medidas de fluorescencia a tiempo real. La formación de los productos de amplificación, detectados mediante intercalación de un fluoróforo (EvaGreen) en la doble hebra, es rápida, tanto más cuanto mayor es el número de copias de la secuencia diana de partida. De este estudio se concluye que es posible duplicar el número de hebras iniciales en poco más de 60 segundos. Sin embargo, de nuevo se observa que un control negativo da lugar a productos que no pueden diferenciarse de los específicos a partir de 36 minutos.

La presencia de productos de amplificación inespecíficos es muy común en procesos isotérmicos de amplificación y se cree que es debida a la extensión de los cebadores parcialmente hibridados. Puesto que la secuencia de estos productos es diferente a la de los específicos, este problema podrá resolverse mediante un sistema de detección específico de secuencia como es el genosensor.



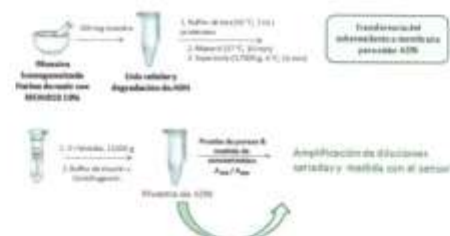
**Figura 4:** Representación esquemática del funcionamiento del sensor

Por esta razón, diseñamos un genosensor capaz de detectar los productos de amplificación específicos. Para evitar la competencia entre cebadores y amplificones por unirse a la superficie del sensor, diseñamos un genosensor dirigido contra una secuencia central de 80 bases, contenida en la secuencia de 105 bases de los amplificones (Figura 4). Una secuencia de ADN complementaria al extremo 5' de la diana y con un tiol terminal actúa como secuencia de captura. Esta se inmoviliza por quimisorción sobre los electrodos de oro. Para orientarla adecuadamente y favorecer la reacción de hibridación se usa p-aminotiofenol como bloqueante. Esta molécula no solo desplaza secuencias adsorbidas sino que además elimina sitios de adsorción inespecífica sobre la superficie del transductor, disminuyendo las señales del blanco.

Como secuencia indicadora se emplea una secuencia complementaria al otro extremo de la diana con una molécula de fluoresceína terminal. De esta forma, en presencia de la secuencia diana se forma un dúplex temario en superficie con una fluoresceína terminal, que permite el posterior enlace del conjugado fragmento Fab de antifluoresceína-peroxidasa, empleado como molécula informadora. La señal analítica se genera tras la adición de los sustratos de la peroxidasa (tetrametilbenzidina, TMB y peróxido de hidrógeno) y medida cronopotométrica de los productos generados enzimáticamente.

Inicialmente se evaluaron de manera comparada las características de respuesta del genosensor diseñado para la medida de las secuencias diana de 80 y 105 bases. La primera forma un dúplex perfecto en la superficie del sensor, mientras que la segunda da lugar a un dúplex con 21 bases sobrantes en el extremo próximo a la superficie. Es destacable que no se observan efectos perjudiciales asociados a una mayor longitud de la secuencia diana, obteniéndose en ambos casos sensibilidades comparables ( $1,11 \pm 0,02 \mu\text{A nM}^{-1}$  para la secuencia de 80 bases y  $1,32 \pm 0,06 \mu\text{A nM}^{-1}$  para la de 105 bases), con un límite de detección de 9 pM, un intervalo lineal hasta 3 nM y una reproducibilidad, expresada como desviación estándar relativa de tres medidas a un nivel de concentración 0.1 nM, del 7%.

La excelente sensibilidad del sensor desarrollado nos animó a probarlo para detectar directamente ADN genómico obtenido mediante extracción, siguiendo el protocolo esquematizado en la Figura 5, de harina de maíz con un contenido certificado en el maíz transgénico Monsanto 810 (MON810) del 10%. Sin embargo, ni la detección directa en estos extractos, ni la detección de los productos obtenidos tras un proceso de digestión enzimática con enzimas endonucleasas dio resultados positivos.



**Figura 5:** Protocolo de extracción de ADN a partir de muestras de harina de maíz.

Por tanto, se procedió a aplicar la amplificación HDA a diluciones seriadas del ADN extraído, usando el sensor para detectar los productos de amplificación. Después de 40 minutos de amplificación es posible distinguir del

## INVESTIGACIÓN

control negativo hasta 3000 copias del ADN diana. La detectabilidad puede alcanzar las 30 copias del fragmento de 105 bases del promotor P35S si el tiempo de amplificación se extiende hasta 60 minutos. En estas condiciones, se puede detectar la presencia del transgén en muestras con solo un 0,5% de transgénico, por debajo del límite de 0,9% establecido por la Comunidad Europea para el etiquetado de este tipo de productos. Cabe destacar que una muestra de maíz con 0% de transgénico da una señal despreciable, equivalente a la que se obtiene con controles negativos, incluso después de 60 minutos de amplificación, lo que demuestra la mayor fiabilidad del sistema propuesto en ensayos de cribado si se compara con la detección de los productos de amplificación mediante electroforesis capilar o fluorescencia a tiempo real.

Los resultados que se resumen aquí y que fueron presentados en la XX reunión de la Sociedad Española de Química Analítica, han sido recientemente aceptados para su publicación en la revista *Analytical Chemistry*<sup>6</sup> donde pueden consultarse. Entre las conclusiones más relevantes del trabajo presentado queremos resaltar la selectividad adicional que aporta el genosensor a la amplificación HDA y la posibilidad que ofrece el ensayo descrito para detectar un 0,5% de material transgénico, por debajo del límite legalmente establecido por la Comunidad Europea. El siguiente reto que nos planteamos en GEUO es el diseño de un sistema que permita integrar ambas etapas: amplificación y detección basada en la hibridación.

### Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado con el soporte económico del Gobierno de España (Proyecto CTQ2012-31157) y de las Acciones Marie Curie de la Comunidad Europea (Proyecto IRSES 612545). RMC agradece al Principado de Asturias la concesión de un Contrato post-doctoral del Programa Clarín. Agradecemos a la Sociedad Española de Química Analítica la concesión de este Premio.

### Referencias

1. Spiroux de Vendômois, J., Cellier, D., Vélot, C., Clair, E., Mesnage R., Séralini, G-E., *Int. J. Biol. Sci.* 6 (2010) 590-598
2. James, C. 2014. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2014. ISAAA Brief No. 49. ISAAA: Ithaca, NY.
3. Davison, J., *Plant Science* 178 (2010) 94-98
4. European Commission Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed *Off. J. Eur. Union L* 2003, 268, 1.
5. García-Cañas, V. Cifuentes, A., González R. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44 (2004) 425-436
6. S. Moura-Melo, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez, A.J. Miranda-Ordieres, J. Ribeiro Dos Santos Junior, R. A. da Silva Fonseca, M.J. Lobo-Castañón. "Targeting helicase-dependent amplification products with an electrochemical genosensor for reliable and sensitive screening of genetically-modified organisms." 2015. *Analytical Chemistry* 87 (2015) 8547-8554