

MARCADORES INMUNOQUÍMICOS

Para Screening Masivo



- Gabriel Sancho Fornes
- Programa de Doctorado de Técnicas Experimentales en Química
- Sergi Morais, Rosa Puchades y Ángel Maquieira
- Centro de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico, Departamento de Química.
- gabsanfo@upvnet.upv.es

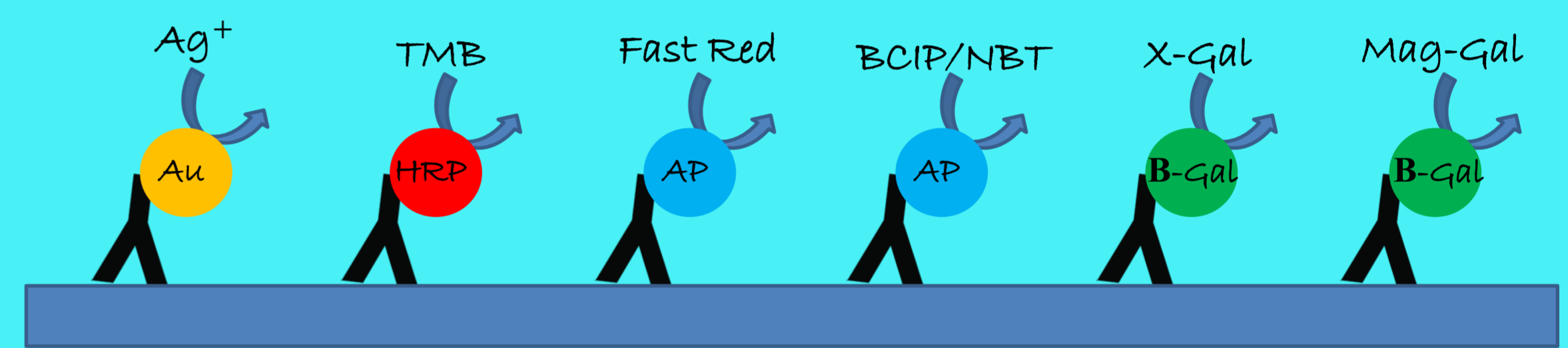


1) Introducción

El auge de las técnicas inmunoanalíticas en el campo del diagnóstico clínico es principalmente debido a la posibilidad de poder marcar las especies que intervienen en la interacción inmunológica (anticuerpo y antígeno), permitiendo el desarrollo de un enorme número de formatos y configuraciones inmunoanalíticas de elevada sensibilidad.

2) Objetivos

El objetivo es evaluar las propiedades mostradas por los marcadores enzimáticos habitualmente empleados en inmunoensayo (Fosfatasa Alcalina, Peroxidasa y β -Galactosidasa) así como nanopartículas esféricas de Oro, en lo referente a sensibilidad y posibilidad de utilización de la tecnología de disco compacto como sistema de medida sensible, robusto y de bajo coste.

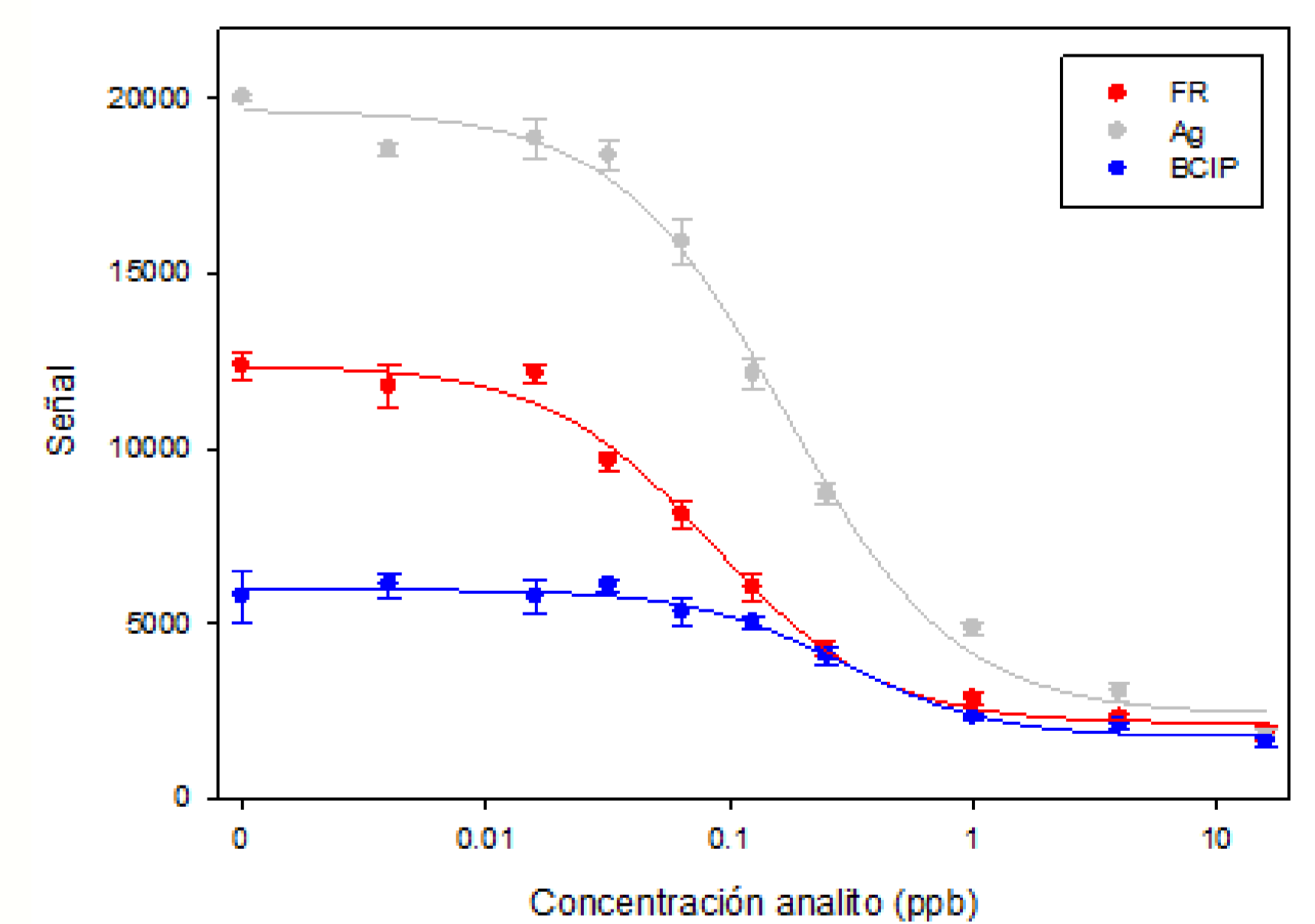
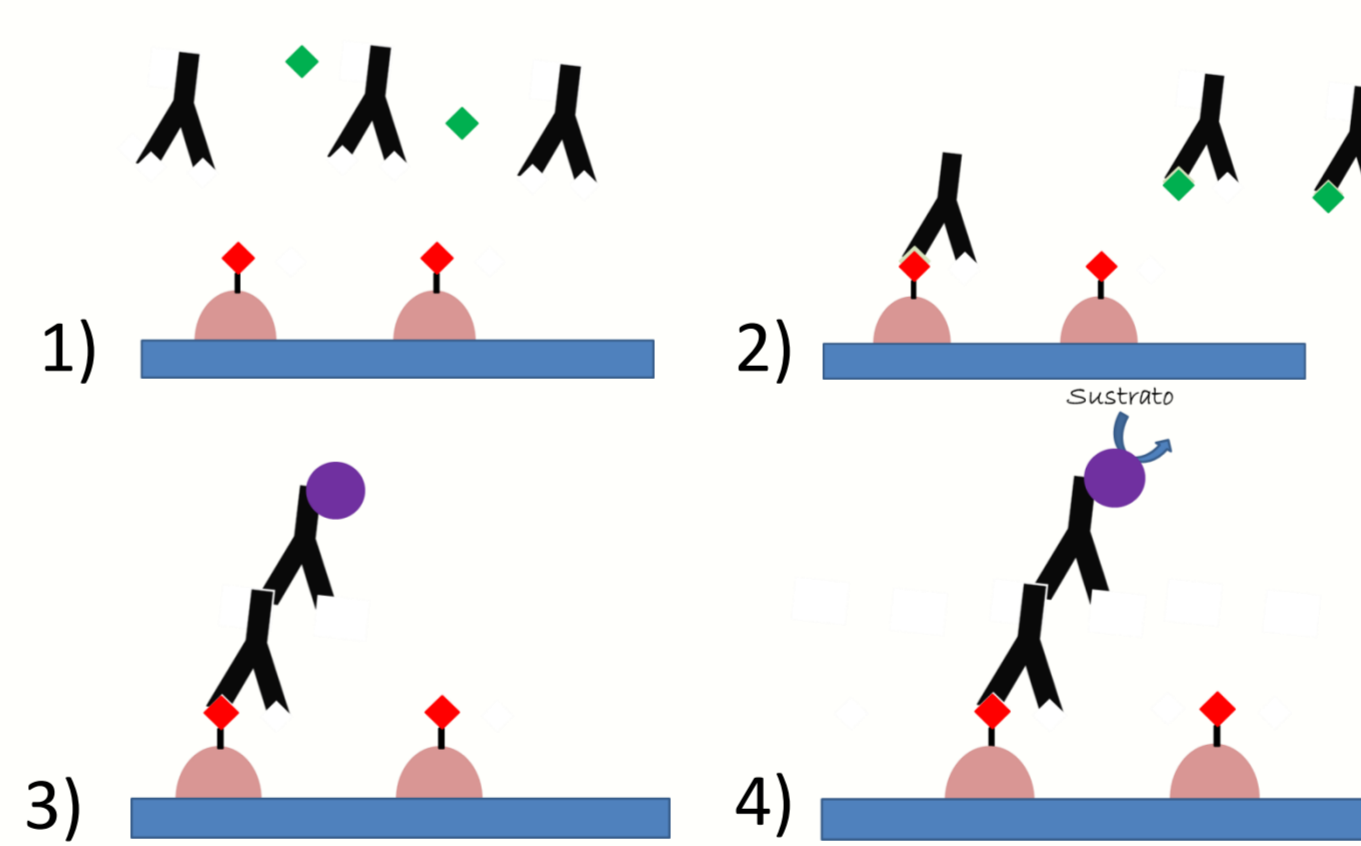


3) Optimización del inmunoensayo

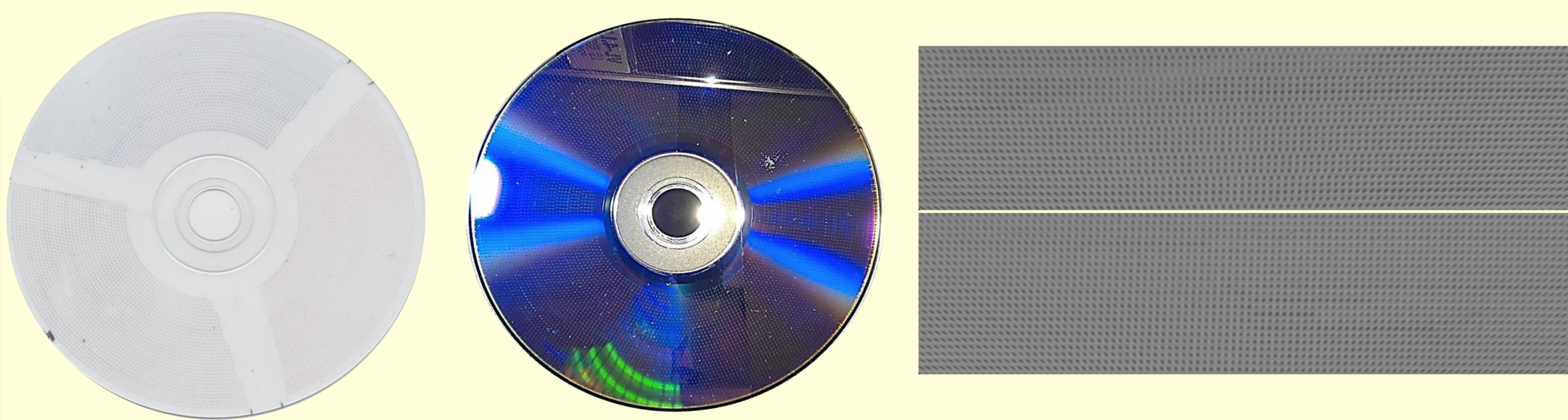
Trazador/Revelador	Concentración AB / ppm	Tiempo de AB 2º / min	Tiempo revelado / min	Señal
AP / BCIP/NBT	10	15	10	10300
AP / Fast Red	10	15	20	15800
HRP / TMB	20	20	10	6700
β -Gal / X-Gal	40	20	20 horas * 37°C	2100
β -Gal / Mag-Gal	40	20	20 horas * 37°C	No hay señal
Au / Ag	10	15	8	21100

4) Resultados actuales y conclusiones

Se escoge la Fosfatasa Alcalina con sus dos sustratos y las nanopartículas de Oro para realizar un inmunoensayo competitivo para la determinación de sulfasalacina por ser los que proporcionan las señales más altas.



5) Screening masivo



Ensayo en plancha con diferentes marcadores inmunoquímicos.

DVD en el cual se han realizando 8850 ensayos para un marcador inmunoquímico.

Imagen obtenida con la lectura del DVD.

	AP - BCIP/NBT	AP - Fast Red	Au - Ag
Señal máxima neta	6095	12356	20031
SNR máxima	82	158	225
RSD	6	2	1
IC ₅₀ ± SD	0.29 ± 0.05	0.08 ± 0.01	0.17 ± 0.02
R (IC ₅₀)	0.9947	0.9967	0.9960
Dinamic range (ppb)	0.51 - 0.07	0.31 - 0.04	0.38 - 0.06
Pendiente	- 2986	- 6730	- 11547
R (pendiente)	0.9919	0.9966	0.9992
Tiempo ensayo (min)	45	55	43
Coste ensayo (€)	2.58	2.55	3.98

6) Posibles utilidades

Se prevé la implementación de marcadores enzimáticos y sustratos de alta sensibilidad para realizar screening masivo mediante tecnología de disco compacto. Esta tecnología podría aplicarse en la detección de biomarcadores, tales como las citosinas, involucrados en diversos procesos celulares. Se podrá diagnosticar enfermedades transmisibles y no transmisibles de un modo económico, rápido y robusto pudiendo realizar el seguimiento de los tratamientos con mayor eficacia, adaptándose fácilmente a los sistemas comerciales actuales.

Los 3 sustratos escogidos pueden considerarse "sustratos de alta sensibilidad", siendo el Fast Red el que presenta los mejores parámetros de sensibilidad (IC₅₀ bajo).



Agradecimientos



- Al Ministerio Español de Economía y Competitividad (FEDER-CTQ2010-15943 y CTQ2013-45875-R)
- A la Generalitat Valenciana (Prometeo 2010/008)