

Otimização e desenvolvimento de um biossensor eletroquímico de DNA

Bassam B. Júnior¹, Marina R. Batistuti¹, Marcelo Mulato¹

¹ Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto-SP, Brasil.

Introdução: Biossensores são dispositivos que utilizam componentes biológicos como forma de reconhecimento gerando um sinal correspondente a reação analito-alvo. Os biossensores de DNA são compostos por uma fita simples de DNA e imobilizada na superfície de um eletrodo. As fitas de DNA possuem cargas negativas intrínsecas devido aos grupos fosfato. Ao reconhecer a fita complementar e formar a dupla fita, o eletrodo atua como um sensor de hibridização, aumentando proporcionalmente a carga negativa na superfície. O sinal, no caso dos biossensores eletroquímicos “label-free”, ocorre através de um par redox em solução, e pode ser quantificado através da técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE). A técnica de EIE consiste na aplicação de um potencial fixo em uma célula eletroquímica no qual não há processos de oxirredução. A variação de frequência deste potencial perturba o sistema, que por sua vez pode ser observado através da variação de corrente. Através dessas informações é possível determinar a impedância do sistema. Após a hibridização, há um aumento do bloqueio na interface eletrodo/solução, aumentando assim o valor da resistência de transferência de carga. Nesse estudo, a plataforma para desenvolvimento do sensor foi otimizada eletroquimicamente através do cálculo da densidade de fitas imobilizadas na superfície do eletrodo.

Métodos: Eletrodos de ouro (Metrohm) foram polidos com aluminas de três diferentes granulometrias, e submetida a uma limpeza eletroquímica em meio ácido (0,5 M H₂SO₄). A sequência de DNA sintética (Sigma-Aldrich) que corresponde ao MicroRNA-21 (5'-TCAACATCAGTCTGATAAGCTA-3') foi marcado com um grupo tiol em uma das extremidades para realizar ligação covalente com o ouro. Após a limpeza, o eletrodo foi co-imobilizado com diferentes proporções entre a sequência de DNA e uma molécula espaçadora, no caso 6-mercaptop-hexanol (MCH). A caracterização eletroquímica foi realizada através da EIE utilizando 2 mM de Fe²⁺/Fe³⁺ em 10 mM de tampão fosfato. A hibridização foi realizada por 30min utilizando diferentes concentrações de fita complementar. Para determinação das densidades de fitas imobilizadas antes da hibridização, a técnica de cronocoulometria foi realizada com Ru(NH₂)₆³⁺, variando o potencial de -300mV para -800mV por 5 segundos.

Resultados e Discussões: Foram testadas as proporções entre DNA e o total de tiol da superfície conforme descrito na Figura 1, na qual é possível verificar a variação da impedância em relação a variação de DNA imobilizado. Essa variação não é linear, e assim, para afirmar qual proporção é capaz de fornecer a melhor hibridização foi necessário investigar o sistema através da cronocoulometria.

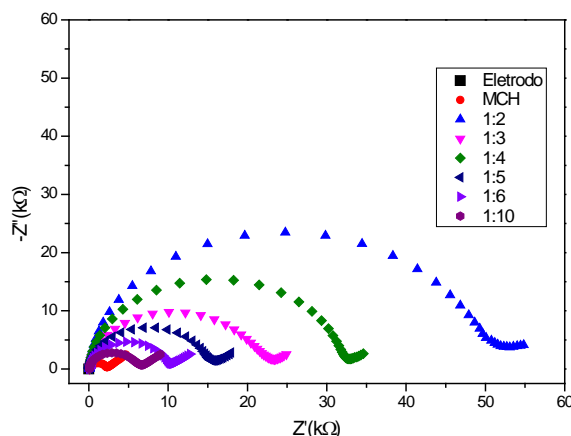


Figura 1 – Diagrama de Nyquist para fita simples de DNA (simple-sample DNA - ssDNA) em diferentes proporções

Conclusões: A otimização da proporção entre DNA e espaçador é de grande importância no trabalho, pois permite quantificar as fitas por cm² imobilizadas e conseqüentemente, o obter o valor máximo de hibridização do biossensor de DNA.