

## DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS Y NANOTECNOLOGÍA: EL GRAN POTENCIAL DE LOS ENSAYOS A PEQUEÑA ESCALA

*Keith Harshman*

*Departamento de Inmunología y Oncología  
Centro Nacional de Biotecnología/CSIC. Madrid*

### INTRODUCCIÓN

La investigación biológica y biomédica está experimentando un período de extraordinario crecimiento en cuanto a información se refiere. Principalmente motivados por la aplicación de secuencias automatizadas y métodos computacionales, los biólogos tienen ahora acceso a una completa, o más completa, secuencia del genoma de una creciente y diversa lista de organismos, en la que está incluido el *Homo sapiens*. Como resultado, una lista más completa de genes está disponible por cada uno de los organismos que están siendo estudiados.

Sin embargo, aunque la información de la secuencia producida pretende ser amplia, en muchos casos la simple secuencia de genes contenidos dentro del genoma de un organismo no nos dice mucho de cómo los genes funcionan o cómo cooperan en la ruta génica que controla su fisiología. El reto de la llamada era post-genómica es hacer el máximo uso de la enorme cantidad de información sobre el genoma para comprender la compleja naturaleza de las células vivas. La genómica funcional busca afrontar este reto construyendo un puente entre la inmensidad de secuencias y la utilidad de la función génica.

### ARRAYS Y MICROARRAYS DE DNA: TECNOLOGÍAS Y LIMITACIONES

El éxito de los proyectos de secuenciación del genoma, hecho que ha sido posible gracias a la innovación y mejoras tecnológicas, requiere de mayores avances tecnológicos para explotar eficazmente esta enorme cantidad de información. La genómica funcional ha respondido con el desarrollo de nuevas herramientas y tecnologías, y una de las más poderosas es el *microarray* de DNA.

Un *microarray* de DNA es una red muy precisa de alta densidad de muestras de ácido nucleico de una sola cadena unida a un soporte sólido. La utilidad del DNA en este formato proviene de la propiedad que tiene el ácido nucleico de cadena simple para hibridar con alta especificidad con una segunda cadena que contenga la secuencia complementaria formando moléculas de ácido nucleico de doble cadena. Debido a esto, los *microarrays* de DNA pueden ser utilizados para “interrogar” mezclas complejas de miles de ácidos nucleicos en presencia y en grandes cantidades de la secuencia conocida.

La habilidad para interrogar cualitativa y cuantitativamente mezclas de ácidos nucleicos hacen de los *microarrays* de DNA una tecnología extremadamente útil con una amplia variedad de aplicaciones. Hasta hoy, el uso más extendido de esta tecnología ha sido el análisis de expresión génica y, en menor grado, el análisis de variación de DNA.

Los *microarrays* de DNA son el último paso en la evolución de un grupo de técnicas bioanalíticas desarrolladas en los años 1960' y 1970' (1). Todas estas técnicas -nuevas y anteriores- hacen uso de la mencionada habilidad de las moléculas de ácido nucleico de una sola cadena para hibridar con moléculas de secuencia complementaria para formar una molécula dúplex de doble cadena. En el desarrollo de *microarrays* de DNA es de particular relevancia aquellas técnicas

diseñadas para analizar DNA y RNA en la que los clones de DNA son inmovilizados en soporte sólido, inicialmente membranas de nitrocelulosa (2).



*D. Keith Harshman*

La principal diferencia física entre los *microarrays* de hoy y sus predecesores de los años 1970' y 1980' es la utilización de un soporte sólido impermeable -generalmente vidrio- al que unir el ácido nucleico, mucho mejor que las membranas de nitrocelulosa o nylon. Un soporte rígido como el vidrio tiene más ventajas prácticas que una membrana flexible el array resultante es más uniforme, puede llevar a cabo una densidad de muestras más elevada, y puede ser utilizado en ensayos que requieren menos tiempo e incorporar mejores tecnologías de detección, con frecuencia de fluorescencia.

Una variedad de tecnologías y formatos son utilizados en la fabricación de *microarrays* de DNA. Predominan tres formatos diferentes, cada uno con sus ventajas y desventajas de costes, flexibilidad, versatilidad y facilidad en la puesta a punto. Dos formatos dependen de la síntesis *in situ* de sondas de oligonucleótidos cuya secuencia se extrae de la secuencia de genes conocidos (3).

El primero de éstos es la utilización de métodos fotolitográficos adaptados, procedentes de la industria de la microelectrónica para sintetizar oligonucleótidos de hasta 30 bases *in situ* en la superficie de un sustrato de vidrio. Este método permite la fabricación de *microarrays* de DNA de extremada alta densidad: cientos de miles de diferentes secuencias de oligonucleótidos por  $\text{cm}^2$ . Aunque la longitud de los oligonucleótidos producidos por este método es relativamente corta, no obstante se necesitan múltiples sondas por gen investigado. Por lo tanto, la densidad de genes cuestionables por  $\text{cm}^2$  en estos arrays es actualmente del orden de 15.000 a 20.000.

El segundo método *in situ* es conceptualmente similar al primero, los oligonucleótidos de secuencia predefinida son sintetizados nucleótido por nucleótido en una superficie de vidrio. Este método utiliza tecnologías de *inkjet* (similar a las utilizadas en muchas impresoras a color) para construir los *microarrays*. La densidad en estos *microarrays* está actualmente en el rango de 1.700 a 2.000 genes por  $\text{cm}^2$ .

El tercer formato utiliza dispositivos robóticos de alta precisión para transferir mecánicamente muestras de ácidos nucleicos a un soporte sólido. La transferencia al soporte sólido frecuentemente se realiza por el contacto físico de un array de pins similar en estructura y diseño a una estilográfica

pequeña que ha sido previamente cargada con las muestras de ácido nucleico para ser transferidas. Menos frecuentemente, tecnologías de inkjet, que físicamente no están en contacto con la superficie del portaobjetos, son utilizadas para llevar la muestra al soporte sólido (4).

Con metodologías de transferencia mecánica, la muestra de ácido nucleico puede ser de cualquier variedad, pero suele ser un producto de PCR generado a partir de clones de cDNA, o menos frecuente, un oligonucleótido cuyo diseño esta basado en secuencias de genes conocidas. Las densidades de las muestras en estos *microarrays* son del orden de 1.700 a 2.000 genes por  $\text{cm}^2$ .

Un asunto que frecuentemente queda fuera de las liberaciones sobre el nuevo array y sobre las tecnologías de *microarrays* es que, a pesar del espectacular aumento de información y contenido de los arrays actuales, comparándolos con aquellos de hace 20 ó 30 años -desde el rango de 5 por  $\text{cm}^2$  en los años 70s hasta 20.000 por  $\text{cm}^2$  de los *microarrays* de hoy-, la sensibilidad en las medidas de expresión permanecen más o menos inalterables.

Cuando la sensibilidad se define como la mínima cantidad de molecular de una especie específica requerida para permitir la detección y una precisa cuantitación, los tres principales formatos de arrays de DNA de los últimos 30 años -macroarrays de nylon, *microarrays* de DNA de vidrio y *microarrays* de oligonucleótidos- todos tienen aproximadamente igual sensibilidad, en una variedad de 20 millones de moléculas (5); desde la publicación de este trabajo, mejoras en los protocolos utilizados con *microarrays* de cDNA y de oligonucleótidos han mejorado las sensibilidades de estos métodos, pero la mínima cantidad de muestra de RNA que se requiere para la detección de todas las plataformas de arrays son todavía aproximadamente equivalentes).

Con referencia al formato del array y método de detección, el simple hecho es que para muchas de las potencialmente más utilizadas aplicaciones de arrays de DNA, la cantidad requerida de material es enorme. Por ejemplo, la cantidad de ácido nucleico que puede ser aislado de una muestra de la biopsia de un tumor suele ser 1/100 -o menos- de la cantidad que se requiere para su detección. Lo mismo ocurre con cualquier célula o muestra de tejido de pequeño tamaño (generalmente, menos de un millón de células).

Existen métodos enzimáticos para amplificar la cantidad de ácido nucleico en la muestra original, pero ésto es técnicamente difícil, pobremente reproducible y, todavía peor, muy frecuentemente introduce una significativa tendencia, que los componentes de la muestra amplificada no son los mismos de las muestras originales.

De la discusión precedente se pueden sacar dos conclusiones importantes. Primero, a pesar de los avances técnicos en ciertos aspectos de las tecnologías de arrays (densidad de información, facilidad de fabricación, etc), las mejoras en los ensayos de sensibilidad han sido relativamente pocas; segundo, muchas de las potencialmente más poderosas e importantes aplicaciones de las tecnologías de *microarrays* de DNA son actualmente posibles o están limitadas dado el nivel limitado de sensibilidad de las tecnologías. Claramente, las nuevas tecnologías que permitieran la precisa detección y cuantificación de los ácidos nucleicos serían tremendamente valiosas si pudieran ser empleadas con éxito cantidades pequeñas de muestras que las que actualmente se requieren en los formatos de array de DNA.

## **APLICACIÓN DE NANOTECNOLOGÍAS PARA LA DETECCIÓN DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.**

La nanotecnología -o nanoaparato- abarca una amplia variedad de tecnologías que tienen como característica común por lo menos una dimensión en la escala del nanometro (por ejemplo,  $1 \times 10^9$  metro). Recientes progresos en diferentes áreas de la nanotecnología han sido significativas. Para su aplicación en la detección de ácidos nucleicos, estas tecnologías ofrecen muchas ventajas: su pequeño

tamaño generalmente significa que se requieren relativamente pequeñas cantidades de la muestra; es frecuentemente posible diseñar instrumentos que automaticen muchos pasos de procesos multi-pasos; y lo que es más importante, la detección de ácidos nucleicos de un número de nanotecnologías es, en algunos casos, varios ordenes de magnitud más sensible que muchos de los métodos de detección actuales.

Ha habido algunos casos en que se ha aplicado la nanotecnología en análisis y detección de ácidos nucleicos. Resultados iniciales indican que la nanotecnología puede ser utilizada para reducir el tamaño del array y, lo que es más importante, aumentar en gran medida la sensibilidad de los ensayos llevados a cabo (8-11). Se ha demostrado que los dispositivos basados en nanomecánica detectan específicamente bases simples incompatibles en la hibridación de oligonucleótidos. En estos ensayos, los ácidos nucleicos han sido inmovilizados a un lado de *nanocantilever*.



*Mesa de los ponentes participantes en el Seminario-debate sobre Nanociencia y Nanotecnología celebrado en la UAM*

La exposición del *nanocantilever* a una muestra que contiene el ácido nucleico de la secuencia complementaria hace que el *nanocantilever* se doble o desvíe unos pocos nanómetros. Esta respuesta se debe al cambio en la carga de la superficie de un lado del *nanocantilever* -con el oligonucleótido inmovilizado- con respecto al otro lado. El desvío es medido con resolución de sub-nanómetro con un sistema óptico en el que un rayo láser refleja la parte de atrás del cantilever en una posición sensible al foto-detector. La sensibilidad que se puede lograr con estos sistemas es sorprendente -puede ser detectada la hibridación de una molécula de oligonucleótido con su secuencia complementaria- (13,14).

Se está desarrollando un dispositivo (J. Tamayo, L. Lechuga, del Centro Nacional de Microelectrónica, IMM-CNM-CSIC, Madrid y sus colaboradores en el Departamento de Inmunología y Oncología dirigido por Carlos Martínez-A., del Centro Nacional de Biotecnología/CSIC, Madrid) para medir rutinariamente la variación cualitativa en ácido nucleico (por ejemplo, detección de

polimorfismo de un simple nucleótido), así como la variación cuantitativa (por ejemplo, niveles de expresión de RNA).

Los dispositivos basados en el *nanocantilever* son solamente un método posible de nanotecnología que puede ser potencialmente aplicado en la detección de ácidos nucleicos. Hay otras muchas nanotecnologías que podrían encontrar importantes y grandes aplicaciones en la detección de estas u otras biomoléculas.

La colaboración entre médicos, ingenieros, bioquímicos y biólogos moleculares estimulará la exploración y aplicación de una variedad de nanotecnología para la detección de biomoléculas y acelerarán los datos cuando estas tecnologías sean comunes no solamente en los laboratorios de investigación, sino también en medicina clínica.

*(Agradecimientos: El autor desea agradecer a Daisy Fernández por traducir este artículo desde el inglés. El Departamento de Inmunología y Oncología fué fundado y es financiado por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y Pharmacia Corporation).*

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. E. M. Southern (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 98, 503.
2. G. A. Beltz *et al.* (1983): Isolation of Multigene Families and Determinations of Homologies by Filter Hybridization Methods. *Methods in Enzymology* 100, 266.
3. R.J. Lipshutz *et al.* (1999): High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nature Genetics* 21, 20.
4. D.J. Duggan *et al.* (1999): Expression profiling using cDNA microarrays. *Nature Genetics* 21, 10.
5. F. Bertucci *et al.* (1999): Sensitivity issues in DNA array-based expression measurements and performance of nylon microarrays for small samples. *Human Molecular Genetics* 8, 1715.
6. J. Fritz *et al.* (2000): Translating biomolecular recognition in nanomechanics. *Science* 288, 316.
7. Hansen *et al.* (2001): Cantilever-based optical deflection assay for discrimination of DNA single-nucleotide mismatches. *Analytical Chemistry* 73, 1567.
8. Wu *et al.* (2001): Bioassay of prostate-specific antigen (PSA) using microcantilevers. *Nature biotechnology* 19, 856.
9. J. Tamayo *et al.* (2001): Chemical sensors and biosensors in liquid environment based on microcantilevers with amplified quality factor. *Ultramicroscopy* 86, 167.
10. T. Strunz *et al.* (1999): Dynamic force spectroscopy of single DNA molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 96, 11277.
11. P. Hinterdorfer *et al.* (1996): Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 93, 3477.