

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 730 808**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

C12N 15/115 (2010.01)

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 27/414 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.02.2010 E 17157804 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019 EP 3192881**

54 Título: **Procedimiento de detección de material diana que usa aptámero**

30 Prioridad:

16.02.2009 KR 20090012287

16.02.2009 KR 20090012288

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

12.11.2019

73 Titular/es:

**DONGGUK UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC
COOPERATION FOUNDATION (100.0%)**

26, Pil-dong, 3-ga Jung-gu

Seoul 100-715, KR

72 Inventor/es:

KIM, SO YOUN

74 Agente/Representante:

BOTELLA REYNA, Juan

ES 2 730 808 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de detección de material diana que usa aptámero

5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a un procedimiento y un kit de detección de un material diana que usa un aptámero, y más en particular a un procedimiento y un kit para la detección de un material diana, en los que se añade una muestra y un segundo aptámero a un primer aptámero inmovilizado en una fase sólida de manera que se forma una
10 unión intercalada entre el primer aptámero, el material diana y el segundo aptámero.

TÉCNICA ANTERIOR

El desarrollo de nuevas plataformas de sensores para detectar con sensibilidad y especificidad pequeñas moléculas
15 en soluciones es muy importante para el seguimiento y control de metabolitos relacionados con enfermedades, contaminantes ambientales y toxinas de los alimentos. Los materiales de bajo peso molecular, tales como metabolitos, contaminantes ambientales y toxinas de los alimentos, se han analizado en general mediante técnicas complejas, tales como GC/MS o HPLC, que consumen mucho tiempo incluso en manos de trabajadores expertos y que no pueden aplicarse en análisis *in situ* (Stales, C. A. y col., *Environ. Toxicol. Chem.*, 20: 2450, 2001). Para lograr
20 una detección en tiempo real *in situ* con éxito se han necesitado sistemas a pequeña escala y reactivos de unión específicos.

Como plataformas portátiles para la detección de materiales de bajo peso molecular, se conocen plataformas de detección tales como plataformas de resonancia de plasmones de superficie, aunque se sabe que es difícil que
25 estas plataformas detecten materiales que tienen un peso molecular muy bajo de 400 o menos. Además, se comunicó que, cuando se realizó un análisis que usaba un aptámero que se une específicamente a 17- β -estradiol (PM: 272) a la concentración de 1 μ M (272 ppm), el análisis para materiales de bajo peso molecular tal como se describe anteriormente es impracticable como se muestra en la FIG. 1 (Kim y col., *Biosens. Bioelectron.*, 22:2525, 2007). Así, se ha demandado el desarrollo de nuevas plataformas capaces de detectar incluso materiales de bajo
30 peso molecular de una forma específica y sensible.

Además, para una detección específica y sensible de analitos se requieren reactivos que se unen específicamente a analitos tales como anticuerpos. Sin embargo, los materiales de bajo peso molecular son en general demasiado pequeños para generar anticuerpos en animales o son altamente tóxicos de manera que no pueden producir
35 anticuerpos. Por este motivo se han demandado nuevos reactivos de unión específicos que se unan a moléculas pequeñas.

Por otra parte, el término "aptámero" tal como se usa en la presente memoria se refiere a un oligonucleótido monocatenario (molécula de ADN o ARN monocatenario) que puede unirse específicamente a su diana con alta
40 afinidad. El aptámero puede usarse como un elemento de biosensores capaz de unirse a una molécula en un sistema de detección/análisis, y así ha sido reconocido como un sustituto de anticuerpo. En particular, los aptámeros pueden usarse como moléculas que se dirigen a diversos materiales orgánicos e inorgánicos, lo que incluye toxinas, a diferencia de anticuerpos, y una vez que se aísla un aptámero que se une específicamente a un cierto material, puede reproducirse de forma consistente a bajo coste usando procedimientos automatizados de síntesis de
45 oligómeros. Dado que un biosensor basado en aptámeros para medir una proteína diana que usa un aptámero marcado por fluorescencia fue desarrollado por primera vez en 1996, se han desarrollado biosensores de aptámeros basándose en las ventajas y las propiedades estructurales del aptámero (Yeon-Seok KIM y Man-Bock GU, *NICE*, 26(6):690, 2008).

50 Sin embargo, los procedimientos de análisis anteriores que emplean aptámeros fueron procedimientos de análisis competitivo en un aptámero unido a un material específico que se desprende o se deja unir a otros materiales. Así, se ha requerido el desarrollo de un procedimiento de uso de un aptámero para detectar un material de una forma más directa y sencilla.

55 Por otra parte, los biosensores basados en nanotubos de carbono (NTC) son plataformas portátiles altamente atractivas para la detección de materiales de bajo peso molecular. Los transistores de efecto de campo (FET) de nanotubos de carbono de pared simple (NTCps) fueron útiles como sensores a pequeña escala para la detección con alta sensibilidad de materiales químicos, en comparación con otras plataformas de detección, tales como sensores de microequilibrio de cristal de cuarzo, sensores de espectrometría por impedancia electroquímica,
60 sensores de resonancia de plasmones de superficie y sensores potenciométricos direccionables por luz (LAPS)

(Kim, T. K. y col., *Advanced Materials*, 20:1, 2008; Kong, J. y col., *Science*, 287:622, 2000; Snow, E. S. & Perkins, F. K., *Nano. Lett.*, 5:2414, 2005).

5 Sin embargo, los recientes FET-NTCps para la detección de moléculas pequeñas se han limitado sólo a una fase gaseosa o de vapor más que a una fase líquida que contiene la mayoría de los metabolitos biológicos o toxinas de interés. Además, debido a que las moléculas pequeñas no polares en soluciones no se situaron dentro del intervalo de detección de los sensores basados en FET, era difícil detectar moléculas pequeñas usando los sensores basados en FET (Heller, I. y col., *Nano. Lett.*, 8:591, 2008).

10 El documento US-2002/037.506 describe ensayos en sándwich de unión en dos sitios basados en aptámeros, que emplean ligandos de ácidos nucleicos como moléculas de captura y reportera. La molécula de captura se inmoviliza en un soporte sólido, incubado con una molécula diana, y se detecta un complejo formado usando una molécula reportera, que puede marcarse con un fluoróforo.

15 Ikebukuro K, y col.: "Novel electrochemical sensor system for protein using the aptamers in sandwich manner", *Biosensors and Bioelectronics*, Elsevier BV, NL, vol. 20, nº 10, 15 de abril de 2005, páginas 2168-2172, describe un sistema de sensores electroquímicos para la detección de proteínas usando aptámeros en un ensayo en sándwich. Se inmoviliza un aptámero de captura por medio de una interacción biotina-avidina en la superficie de un electrodo.

20 Song, y col.: "Aptamer-based biosensors", *TRAC*, vol. 27, nº 2, febrero de 2008, páginas 108-117, describe ensayos en sándwich para la detección de moléculas diana mediante el uso de aptámeros como reactivos de unión.

Para detección de analitos de buena sensibilidad y especificidad, se requiere que los sensores FET-NTCps tengan reactivos de unión específicos tales como anticuerpos como grupos funcionales, y las moléculas pequeñas son, en
25 general, demasiado pequeñas para generar anticuerpos en animales o son altamente tóxicas de manera que no pueden producir anticuerpos.

Así, los autores de la presente invención han hecho intensos esfuerzos para proporcionar un nuevo procedimiento de detección capaz de detectar incluso una molécula pequeña, especialmente en una solución, y, como resultado,
30 han encontrado que, cuando se añade una muestra y un segundo aptámero a un primer aptámero inmovilizado en una fase sólida de manera que forme una unión intercalada entre el primer aptámero, el material diana y el segundo aptámero, en el que el primer aptámero o el segundo aptámero se seleccionan entre los aptámeros representados por secuencias de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 2 a 28, puede detectarse incluso un material de bajo peso molecular no polar tal como bisfenol A, completando con ello la presente invención.

35 Los autores de la presente invención han encontrado también que puede detectarse incluso un material de bajo peso molecular no polar presente en un nivel de pM inmovilizando un primer aptámero como una sonda en un sensor FET, añadiendo una muestra y un segundo aptámero al mismo y a continuación midiendo un cambio en la corriente eléctrica en el sensor FET.

40 Los autores de la presente invención han encontrado también que puede detectarse incluso un material de bajo peso molecular no polar inmovilizando un aptámero como una sonda en un sensor OAA, añadiendo una muestra al mismo y a continuación midiendo un cambio en la capacitancia en el sensor OAA.

45 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

PROBLEMA TÉCNICO

Un objeto de la presente invención es proporcionar un nuevo procedimiento para la detección de un material diana,
50 que puede detectar incluso un material de bajo peso molecular en una solución.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un kit para la detección de un material diana, que puede detectar incluso un material de bajo peso molecular en una solución.

55 SOLUCIÓN TÉCNICA

Para conseguir los objetos anteriores, la presente invención proporciona un procedimiento de detección de un material diana que usa aptámeros, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

60 (a) adición de una muestra que contiene un material diana, y un segundo aptámero que se une específicamente al

material diana y que tiene una etiqueta unida al mismo, a un primer aptámero inmovilizado en una fase sólida y que se une específicamente al material diana, para formar una mezcla, e incubación de la mezcla, en la que el primer aptámero o el segundo aptámero se seleccionan entre aptámeros representados por las secuencias de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 2 a 28; y

5

(b) análisis de la etiqueta para detectar el material diana.

La presente invención también proporciona un procedimiento de detección de un material diana que usa aptámeros, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

10

(a) adición de una muestra que contiene un material diana, y un segundo aptámero que se une específicamente al material diana, a un primer aptámero inmovilizado en una fase sólida y que se une específicamente al material diana, para formar una mezcla, e incubación de la mezcla, en la que el primer aptámero o el segundo aptámero se seleccionan entre aptámeros representados por las secuencias de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 2 a 28;

15

(b) unión de una etiqueta al segundo aptámero; y

(c) análisis de la etiqueta para detectar el material diana.

20 La presente invención también proporciona un kit para la detección de un material diana, comprendiendo el kit: una fase sólida que ha inmovilizado en la misma un primer aptámero que se une específicamente al material diana; y un reactivo de detección que contiene un segundo aptámero que se une específicamente al material diana, en el que el primer aptámero o el segundo aptámero se seleccionan entre aptámeros representados por las secuencias de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 2 a 28.

25

La presente invención describe también un kit para la detección de bisfenol A, comprendiendo el kit: una fase sólida que ha inmovilizado en la misma un primer aptámero que se une específicamente a bisfenol A; y un reactivo de detección que contiene un segundo aptámero que tiene una etiqueta unida al mismo y se une a específicamente a bisfenol A, en el que el primer aptámero o el segundo aptámero se seleccionan entre aptámeros representados por las secuencias de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 2 a 28.

30

La presente invención describe también un fragmento de ácido nucleico para marcar un aptámero, teniendo el fragmento de ácido nucleico una etiqueta unida al mismo y siendo capaz de unirse de forma complementaria al extremo del aptámero.

35

La presente invención describe también un procedimiento de detección basado en sensores de transistor de efecto de campo (FET) de un material diana que usa aptámeros, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

(a) adición de una muestra que contiene un material diana, y un segundo aptámero que se une específicamente al material diana, a un sensor FET que comprende un sustrato, un electrodo metálico de fuente y un electrodo metálico de drenaje, que se forman en los dos lados del sustrato, respectivamente, y una puerta formada en el sustrato de manera que entre en contacto con los electrodos metálicos de fuente y de drenaje, en el que el primer aptámero que se une específicamente al material diana está inmovilizado en forma de una sonda en una cualquiera o más de las superficies del electrodo metálico de fuente, la puerta y el electrodo metálico de drenaje; y

45

(b) medida de un cambio en la corriente eléctrica entre el electrodo metálico de fuente y el electrodo metálico de drenaje del sensor FET, produciéndose el cambio cuando el material diana y el segundo aptámero se unen al primer aptámero inmovilizado en el sensor FET, detectando de este modo el material diana.

50 La presente invención describe también un kit para la detección de un material diana, comprendiendo el kit:

un sensor FET que comprende un sustrato, un electrodo metálico de fuente y un electrodo metálico de drenaje, que se forman en los dos lados del sustrato, respectivamente, y una puerta formada en el sustrato de manera que entre en contacto con los electrodos metálicos de fuente y de drenaje, en el que el primer aptámero que se une específicamente al material diana está inmovilizado en forma de una sonda en una cualquiera o más de las superficies del electrodo metálico de fuente, la puerta y el electrodo metálico de drenaje; y

55

un reactivo de detección que contiene un segundo aptámero que se une específicamente al material diana.

60 La presente invención describe también un kit para la detección de bisfenol A, comprendiendo el kit: un sensor FET

que comprende un sustrato, electrodos de Au formados en los dos lados del sustrato, respectivamente, y una región de canal que comprende nanotubos de carbono de pared simple que entran en contacto con los electrodos de Au y se proporcionan en el sustrato para formar un canal, en el que un primer aptámero que se une específicamente a bisfenol A está inmovilizado en forma de una sonda en la superficie de los electrodos de Au; y un reactivo de detección que contiene un segundo aptámero que se une específicamente a bisfenol A, en el que el primer aptámero o el segundo aptámero se seleccionan entre aptámeros representados por las secuencias de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 2 a 28.

La presente invención también proporciona un procedimiento de detección basado en sensores de óxido de aluminio anódico (OAA) de un material diana que usa aptámeros, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

(a) adición de una muestra que contiene un material diana a un sensor OAA que comprende un sustrato, un óxido de aluminio anódico formado en el sustrato y que tiene poros nanodimensionados, y un metal recubierto en la superficie del óxido de aluminio anódico, en el que un aptámero que se une específicamente al material diana está inmovilizado en forma de una sonda en la superficie del metal; y (b) medida de un cambio en la capacitancia del sensor OAA, produciéndose el cambio cuando el material diana se une al aptámero, detectando de este modo el material diana.

La presente invención describe también un kit para la detección de un material diana, comprendiendo el kit: un sensor de óxido de aluminio anódico (OAA) que comprende un sustrato, un óxido de aluminio anódico formado en el sustrato y que tiene poros nanodimensionados, y un metal recubierto en la superficie del óxido de aluminio anódico; y un aptámero que se une específicamente al material diana.

Otras características y realizaciones de la presente invención serán más evidentes a partir de las siguientes descripciones detalladas y de las reivindicaciones adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 muestra los resultados de realizar la detección de 17- β -estradiol usando un aptámero según el procedimiento SPR de la técnica anterior.

La FIG. 2 es una vista esquemática que muestra un procedimiento de unión a bisfenol A y un aptámero marcado a un aptámero inmovilizado según un procedimiento de la presente invención.

La FIG. 3 muestra los resultados de realización de la detección de bisfenol A por unión de tipo sándwich según el procedimiento de la presente invención.

La FIG. 4 es una vista esquemática que muestra un procedimiento de detección de bisfenol A (BPA) usando un sensor FET-NTCps y el procedimiento de la presente invención.

La FIG. 5 es un grupo de gráficas que muestran los resultados de medir los cambios en la corriente eléctrica, producidos cuando se añadió cada una de entre una solución de BPA (a), una solución mixta de BPA y aptámero anti-BPA (b) y una solución de aptámero anti-BPA (c) a un sensor FET-NTCps y cuando se añadió una solución mixta de una solución de aptámero anti-BPA y cada una de las soluciones de BPA, BPB, 6F y BP (d) a un sensor FET-NTCps.

La FIG. 6 es una vista esquemática de un sensor OAA multicanal.

La FIG. 7 muestra los resultados de medir la capacitancia en el intervalo de frecuencias de 0 a 1.000 Hz cuando un aptámero se unió a un sensor y cuando se introdujo bisfenol A en un sensor.

La FIG. 8 muestra los resultados de detección de bisfenol usando un sensor OAA, en el que la FIG. 8(a) muestra los resultados de un experimento realizado usando un sensor OAA al que no se unió aptámero, y la FIG. 8(b) muestra los resultados de medir los cambios en la capacitancia en un sensor OAA al que se unió un aptámero.

La FIG. 9 es una gráfica que muestra cambios en la capacitancia cuando se introdujo bisfenol A en concentraciones de 1 nM, 10 nM y 100 nM en un sensor OAA al que se unió un aptámero.

60

MEJOR MODO DE REALIZAR LA INVENCION

Salvo que se defina lo contrario, todos los terminos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende normalmente un experto en la materia al que corresponde la invención. En general, la nomenclatura usada en la presente memoria y los procedimientos de experimentos que se describirán más adelante son bien conocidos y se emplean comúnmente en la técnica.

La definición de los terminos principales usados en la descripción detallada de la invención es la siguiente.

10 Tal como se usa en la presente memoria, el término “aptámero” se refiere a un oligonucleótido monocatenario que puede unirse a su diana con alta afinidad.

Tal como se usa en la presente memoria, el término “muestra” se refiere a una composición que podría contener un material diana de interés para su análisis. Puede detectarse en una muestra recogida de uno o más de entre
 15 líquidos, suelo, aire, comida, residuos, órganos animales y vegetales y tejidos animales y vegetales, pero no se limita a ellos. En la presente memoria, los líquidos pueden ser agua, sangre, orina, lágrimas, sudor, saliva, líquidos linfático y cefalorraquídeo, en los que el agua incluye agua de río, agua de mar, agua de lagos y agua de lluvia, los residuos incluyen aguas fecales y aguas residuales, y los animales incluyen el cuerpo humano. Además, los tejidos animales y vegetales incluyen los tejidos de mucosas, pieles, caparazones, pelos, escamas, globos oculares,
 20 lenguas, mejillas, pezuñas, picos, bocas, pies, manos, labios, pezones, orejas, narices y similares.

Tal como se usa en la presente memoria, el término “sensor de transistor de efecto de campo (FET)” significa un sensor que comprende un sustrato, electrodos metálicos de fuente y de drenaje formados en los dos lados del sustrato de manera que tengan una polaridad opuesta a la del sustrato, y una puerta formada en el sustrato mientras
 25 entra en contacto con los electrodos metálicos de fuente y de drenaje, en el que se inmoviliza una sonda en la superficie de la puerta o la superficie de los electrodos metálicos, de manera que la unión entre la sonda y el material diana es detectada por la medición eléctrica de un cambio en la corriente eléctrica, que tiene lugar cuando el material diana se une a la sonda.

30 Tal como se usa en la presente memoria, el término “nanotubos de carbono” se refiere a un material en el que un átomo de carbono se une a otros átomos de carbono para formar un panal hexagonal y que tiene un diámetro en la escala nanométrica. Los nanotubos de carbono pueden clasificarse, según el número de láminas de grafito enrolladas, en nanotubos de pared simple, nanotubos de pared múltiple y nanotubos de tipo cuerda.

35 Tal como se usa en la presente memoria, el término “óxido de aluminio anódico” (OAA) se refiere a una alúmina porosa nanodimensionada que tiene regularidad en la superficie, formada usando un procedimiento de anodización de aluminio oxidante por medios electroquímicos.

En un aspecto, la presente invención se dirige a un procedimiento de detección de un material diana que usa
 40 aptámeros, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

(a) adición de una muestra que contiene un material diana, y un segundo aptámero que se une específicamente al material diana y que tiene una etiqueta unida al mismo, a un primer aptámero inmovilizado en una fase sólida y que se une específicamente al material diana, para formar una mezcla, e incubación de la mezcla, en el que el primer
 45 aptámero o el segundo aptámero se seleccionan entre aptámeros representados por las secuencias de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 2 a 28; y

(b) análisis de la etiqueta para detectar el material diana.

50 Tal como se usa en la presente memoria, el término “fase sólida” se refiere a un soporte de estado sólido en el que se inmoviliza un aptámero. La forma o el material de la fase sólida no están limitados, siempre que se inmovilice en la misma un aptámero. Para realizar el análisis de una forma cómoda, en general puede usarse una microplaca con múltiples pocillos. Además, pueden usarse también otras formas, tales como chips de sensor, y columnas cargadas con perlas de plástico, polipropileno, sefarosa o agarosa.

55 El primer aptámero puede inmovilizarse en la fase sólida usando un procedimiento convencional. En un Ejemplo de la presente invención, el primer aptámero se inmovilizó mediante un procedimiento de sol-gel, y para un experto en la materia será evidente que el procedimiento de inmovilización del primer aptámero no se limita al procedimiento de sol-gel.

60

En la presente invención, la etapa (a) es una etapa de adición de la muestra y el segundo aptámero al primer aptámero inmovilizado en la fase sólida y de incubación de la mezcla, y el término "incubación" tal como se usa en la presente memoria significa la adición de la muestra y el segundo aptámero al primer aptámero y la incubación del primer aptámero de manera que el material diana presente en la muestra se une al primer aptámero inmovilizado y el segundo aptámero se une al material diana. La etapa (a) puede realizarse mezclando la muestra con el segundo aptámero, y a continuación añadiendo la mezcla al primer aptámero. Específicamente, la etapa (a) puede realizarse mezclando la muestra con el segundo aptámero para formar una unión específica entre el material diana y el segundo aptámero, y a continuación añadiendo la mezcla al primer aptámero para formar una unión entre el primer aptámero, el material diana y el segundo aptámero.

Además, la etapa (a) puede realizarse añadiendo la muestra al primer aptámero, y a continuación añadiendo el segundo aptámero a la misma. Específicamente, la etapa (a) puede realizarse añadiendo la muestra al primer aptámero inmovilizado en la fase sólida para formar una unión entre el material diana en la muestra y el primer aptámero, y a continuación añadiendo el segundo aptámero a la misma para formar una unión entre el primer aptámero, el material diana y el segundo aptámero.

La etiqueta que se une al segundo aptámero puede unirse usando un procedimiento directo o indirecto, y los ejemplos de la etiqueta incluyen, pero no se limitan a, materiales fluorescentes, radioisótopos y similares. En la presente memoria, los ejemplos de los materiales fluorescentes incluyen, pero no se limitan a, colorantes fluorescentes tales como Cy3 o Cy5, y proteínas fluorescentes tales como luciferasa o GFP.

En la presente invención, la etapa (b) es una etapa de análisis de la etiqueta para detectar el material diana. En esta etapa, se analiza un cambio en la etiqueta, que tiene lugar cuando el material diana y el segundo aptámero se unen al primer aptámero inmovilizado en la fase sólida, para detectar el material diana. En la presente memoria, el análisis de la etiqueta puede realizarse usando procedimientos conocidos generalmente para analizar los materiales diana de la etiqueta. Por ejemplo, si como etiqueta se usa un material fluorescente, se producirá luminiscencia o un cambio de color, y así el material diana puede detectarse midiendo la luminiscencia o el cambio de color generados. Por ejemplo, si se detectó el material diana puede determinarse mediante exploración un pocillo, en el que se produjo una reacción, mediante un escáner de imágenes capaz de detectar un colorante fluorescente. Además, la cantidad de material diana detectado puede determinarse midiendo la intensidad de la imagen usando software.

Además de detectar el material diana que usa la etiqueta unida al segundo aptámero, el material diana puede detectarse uniendo la muestra y el segundo aptámero al primer aptámero en la etapa (a), y a continuación uniendo la etiqueta al segundo aptámero.

En otro aspecto, la presente invención se dirige también a un procedimiento de detección de un material diana que usa aptámeros, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

(a) adición de una muestra que contiene un material diana, y un segundo aptámero que se une específicamente al material diana, a un primer aptámero inmovilizado en una fase sólida y que se une específicamente al material diana, para formar una mezcla, e incubación de la mezcla, en el que el primer aptámero o el segundo aptámero se seleccionan entre aptámeros representados por las secuencias de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 2 a 28;

(b) unión de una etiqueta al segundo aptámero; y

(c) análisis de la etiqueta para detectar el material diana.

En la presente invención, la unión de la etiqueta en la etapa (b) puede realizarse por unión complementaria de un fragmento de ácido nucleico al segundo aptámero.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "unión complementaria" significa que aproximadamente el 80-90 % o más, preferentemente aproximadamente el 90-95 % o más, y más preferentemente el 95-99 % o más de la secuencia del fragmento de ácido nucleico sintetizado es complementario para el segundo aptámero, o que la secuencia del fragmento de ácido nucleico puede ser totalmente complementaria para el segundo aptámero.

Preferentemente, el fragmento de ácido nucleico puede unirse de forma complementaria al extremo del segundo aptámero, en el que el segundo aptámero puede comprender una secuencia adicional en su extremo para realizar la unión complementaria.

En un Ejemplo de la presente invención, para examinar si el procedimiento de detección de la presente invención

5 puede detectar un material de bajo peso molecular en una solución, se llevó a cabo un experimento para determinar si el procedimiento de detección de la presente invención detecta bisfenol A, una hormona ambiental que según se sabe es muy difícil de detectar. Como resultado, se encontró que incluso el bisfenol A de bajo peso molecular fue detectado específicamente por el procedimiento de detección de la presente invención. Esto sugiere que el uso del procedimiento según la presente invención permite la detección de metabolitos, toxinas y similares en soluciones, a diferencia de los procedimientos de la técnica anterior en los que la detección de metabolitos, toxinas y similares en soluciones es muy difícil.

10 En la presente invención, el aptámero que se usa para detectar el material diana puede seleccionarse preferentemente entre aptámeros representados por las secuencias de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 2 a 28. El aptámero de ácidos nucleicos se proporciona como un ADN o ARN monocatenario. Así, para un experto en la materia será evidente que, si el ácido nucleico es ARN, T en la secuencia de ácidos nucleicos se expresa como U, y que esta secuencia se encuentra dentro del alcance de la presente invención.

15 En otro aspecto más, la presente invención se dirige también a un procedimiento de detección basado en sensores de transistor de efecto de campo (FET) de un material diana que usa aptámeros, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

20 (a) adición de una muestra que contiene un material diana, y un segundo aptámero que se une específicamente al material diana, a un sensor FET que comprende un sustrato, un electrodo metálico de fuente y un electrodo metálico de drenaje, que se forman en los dos lados del sustrato, respectivamente, y una puerta formada en el sustrato de manera que entre en contacto con los electrodos metálicos de fuente y de drenaje, en el que el primer aptámero que se une específicamente al material diana está inmovilizado en forma de una sonda en una cualquiera o más de las superficies del electrodo metálico de fuente, la puerta y el electrodo metálico de drenaje; y

25 (b) medida de un cambio en la corriente eléctrica entre el electrodo metálico de fuente y el electrodo metálico de drenaje del sensor FET, produciéndose el cambio cuando el material diana y el segundo aptámero se unen al primer aptámero inmovilizado en el sensor FET, detectando de este modo el material diana.

30 El procedimiento, tal como se describe, se basa en el principio del transistor de efecto de campo (FET) y se caracteriza usando el aptámero como una sonda inmovilizada en una cualquiera o más de entre la superficie del electrodo metálico de fuente, la superficie de la puerta y la superficie del electrodo metálico de drenaje. El sensor FET que se usa en la presente invención puede ser cualquier sensor FET conocido en la técnica. Además, el sensor FET comprende un sustrato, electrodos de fuente y de drenaje formados en los dos lados del sustrato de manera que tengan una polaridad opuesta a la del sustrato, y una puerta formada en el sustrato mientras entra en contacto con los electrodos de fuente y de drenaje, y mide eléctricamente un cambio en la corriente eléctrica, que tiene lugar cuando el material diana se une a la sonda inmovilizada en la puerta superficie o a los electrodos metálicos de fuente y de drenaje. Para un experto en la materia será evidente que cualquier sensor que emplea este principio puede usarse para realizar el procedimiento de la presente invención. Además, en la presente invención, los

35 40 electrodos metálicos pueden estar hechos de uno cualquiera o más seleccionados entre el grupo que consiste en oro, platino, cromo, cobre, aluminio, níquel, paladio y titanio.

Para un aumento de la actividad de la detección, el sensor FET es preferentemente un sensor FET en el que se depositan nanotubos de carbono en el sustrato de manera que entre en contacto con los electrodos metálicos de fuente y de drenaje, formando así un canal entre los electrodos metálicos de fuente y de drenaje. En la presente memoria, la deposición de nanotubos de carbono puede realizarse por procedimientos convencionales, lo que incluye procedimientos de deposición por vapor químico, ablación por láser, descarga eléctrica, deposición por vapor químico reforzada con plasma, deposición por vapor químico térmica, síntesis de fase de vapor, electrólisis y síntesis de llama. En este sensor FET de nanotubos de carbono, el primer aptámero se inmoviliza preferentemente en una

45 50 superficie de electrodo metálico.

La etapa (a) es una etapa de adición de la muestra y el segundo aptámero al sensor FET y puede realizarse mezclando la muestra con el segundo aptámero y a continuación añadiendo la mezcla al sensor FET. Específicamente, la etapa (a) puede realizarse mezclando la muestra con el segundo aptámero para formar una

55 unión específica entre el material diana en la muestra y el segundo aptámero, y a continuación añadiendo la mezcla al sensor FET para formar una unión entre el primer aptámero (que actúa como sonda), el material diana y el segundo aptámero.

Alternativamente, la etapa (a) puede realizarse añadiendo la muestra al sensor FET, y a continuación añadiendo el

60 segundo aptámero al sensor FET. Específicamente, la etapa (a) puede realizarse añadiendo la muestra al sensor

FET de manera que el material diana en la muestra se una al primer aptámero del sensor FET, y a continuación añadiendo el segundo aptámero al sensor FET para formar una unión entre el primer aptámero, el material diana y el segundo aptámero.

5 Tal como se usa en la presente memoria, el término “muestra” se refiere a una composición que podría contener un material diana de interés para su análisis. Puede detectarse en una muestra recogida de uno o más de entre líquidos, suelo, aire, comida, residuos, órganos animales y vegetales y tejidos animales y vegetales, pero no se limita a ellos. En la presente memoria, los líquidos pueden ser agua, sangre, orina, lágrimas, sudor, saliva, líquidos linfático y cefalorraquídeo, en los que el agua incluye agua de río, agua de mar, agua de lagos y agua de lluvia, los
10 residuos incluyen aguas fecales y aguas residuales, y los animales incluyen el cuerpo humano. Además, los tejidos animales y vegetales incluyen los tejidos de mucosas, pieles, caparazones, pelos, escamas, globos oculares, lenguas, mejillas, pezuñas, picos, bocas, pies, manos, labios, pezones, orejas, narices y similares.

En un Ejemplo de la presente invención, con el fin de examinar si el procedimiento de detección de la presente
15 invención puede detectar un material no polar de bajo peso molecular en una solución, se llevó a cabo un experimento para determinar si el procedimiento de detección de la presente invención detecta bisfenol A, una hormona ambiental de la que se sabe que es muy difícil de detectar. Como resultado, se encontró que, según el procedimiento de la presente invención, el bisfenol A en solución podría detectarse incluso en el nivel de pM, y sólo se detectó específicamente el bisfenol A sin causar una reacción con otros grupos de bisfenol, como BPB y 6F, que
20 tienen estructuras muy similares a la del bisfenol A. Esto sugiere que el uso del procedimiento según la presente invención permite la detección de metabolitos, toxinas y similares en soluciones, a diferencia de los procedimientos de la técnica anterior en los que la detección de metabolitos, toxinas y similares en soluciones es muy difícil.

El aptámero que se usa en el sensor FET para detectar bisfenol A puede seleccionarse preferentemente entre
25 aptámeros representados por las secuencias de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 2 a 28. El aptámero de ácidos nucleicos se proporciona como un ADN o ARN monocatenario. Así, para un experto en la materia será evidente que, si el ácido nucleico es ARN, T en la secuencia de ácidos nucleicos se expresa como U, y que esta secuencia se sitúa dentro del alcance de la presente invención.

30 Se describe además un procedimiento de detección basado en sensores de óxido de aluminio anódico (OAA) de un material diana que usa aptámeros, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

(a) adición de una muestra que contiene un material diana a un sensor OAA que comprende un sustrato, un óxido de aluminio anódico formado en el sustrato y que tiene poros nanodimensionados, y un metal recubierto en la superficie
35 del óxido de aluminio anódico, en el que un aptámero que se une específicamente al material diana está inmovilizado en forma de una sonda en la superficie del metal; y

(b) medida de un cambio en la capacitancia del sensor OAA, produciéndose el cambio cuando el material diana se une al aptámero, detectando de este modo el material diana.
40

Tal como se usa en la presente memoria, el término “óxido de aluminio anódico” (OAA) se refiere a un óxido de aluminio formado usando un procedimiento eléctrico. El aluminio tiene nanoporos finos que están alineados de forma regular en una dirección vertical, en la que el tamaño de los nanoporos puede controlarse a través de un proceso de oxidación eléctrica. Cuando la superficie de este óxido de aluminio anódico se recubre con partículas metálicas,
45 después de lo cual el aptámero se une a las partículas metálicas, puede obtenerse un nanobiosensor. Cuando un material diana tal como bisfenol A reacciona selectivamente con el aptámero en el biosensor, se producirán cambios en la tensión y la corriente, lo que produce un cambio en la capacitancia, lo cual sugiere que mediante el biosensor pueden detectarse incluso materiales traza. El sensor OAA que se usa en la presente invención puede ser cualquier sensor OAA conocido en la técnica.

50 En la presente memoria, el metal que está recubierto en la superficie del óxido de aluminio anódico es preferentemente oro, aunque no se limita al mismo.

Por otra parte, la inmovilización del aptámero en el sensor OAA puede realizarse usando un grupo funcional unido a
55 un extremo del aptámero. En un Ejemplo de la presente invención, el grupo tiol unido al extremo 3' del aptámero se unió de forma covalente al oro de la superficie del óxido de aluminio anódico, con lo que el aptámero se unió a la superficie del sensor OAA.

Preferentemente, el sensor OAA puede tener una estructura multicanal tal como se muestra en la FIG. 6, de manera
60 que puede detectar varios materiales al mismo tiempo. Específicamente, pueden inmovilizarse diferentes aptámeros

en diferentes canales de manera que pueden detectarse varios materiales al mismo tiempo. Alternativamente, se introducen diferentes muestras en diferentes canales de manera que pueden analizarse varias muestras al mismo tiempo.

- 5 En un Ejemplo de la presente invención, para examinar si el procedimiento de detección basado en sensor OAA de la presente invención puede detectar incluso un material no polar de bajo peso molecular en una solución, se llevó a cabo un experimento para determinar si el procedimiento de detección de la presente invención detecta el bisfenol A, una hormona ambiental de la que se sabe que es muy difícil de detectar. Como resultado, se encontró que el bisfenol A en una solución se detectó según el procedimiento de la presente invención. Esto sugiere que el uso del
 10 procedimiento según la presente invención permite la detección de metabolitos, toxinas y similares en soluciones, a diferencia de los procedimientos de la técnica anterior en los que la detección de metabolitos, toxinas y similares en soluciones es muy difícil.

El aptámero que se usa en el sensor OAA para detectar bisfenol A puede seleccionarse preferentemente entre
 15 aptámeros representados por las secuencias de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 2 a 28. El aptámero de ácidos nucleicos se proporciona como un ADN o ARN monocatenario. Así, para un experto en la materia será evidente que, si el ácido nucleico es ARN, T en la secuencia de ácidos nucleicos se expresa como U, y que esta secuencia se sitúa dentro del alcance de la presente invención.

20 Por otra parte, el procedimiento de la presente invención puede proporcionarse en forma de kit con el fin de aumentar la transportabilidad. Específicamente, en otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit para la detección de un material diana, comprendiendo el kit: una fase sólida que ha inmovilizado en la misma un primer aptámero que se une específicamente al material diana; y un reactivo de detección que contiene un segundo aptámero que se une específicamente al material diana, en el que el primer aptámero o el segundo aptámero se
 25 seleccionan entre los aptámeros representados por secuencias de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 2 a 28. En la presente memoria, el reactivo de detección que contiene el segundo aptámero puede proporcionarse en un recipiente separado o en una unidad de reacción para formar una unión entre el material diana y los aptámeros. Además, el kit de detección puede comprender además un tampón de detección. Preferentemente, el kit de detección puede comprender además un instrumento para mezclar el reactivo de detección con la muestra.

30 En un aspecto adicional, la presente invención también proporciona un kit para la detección de un material diana, comprendiendo el kit:

un sensor FET que comprende un sustrato, un electrodo metálico de fuente y un electrodo metálico de drenaje, que
 35 se forman en los dos lados del sustrato, respectivamente, y una puerta formada en el sustrato de manera que entre en contacto con los electrodos metálicos de fuente y de drenaje, en el que el primer aptámero que se une específicamente al material diana está inmovilizado en forma de una sonda en una cualquiera o más de las superficies del electrodo metálico de fuente, la puerta y el electrodo metálico de drenaje; y

40 un reactivo de detección que contiene un segundo aptámero que se une específicamente al material diana.

En la presente memoria, el reactivo de detección que contiene el segundo aptámero puede proporcionarse en un recipiente separado o en una unidad de reacción para formar una unión entre el material diana y los aptámeros. Además, el kit de detección puede comprender además un tampón de detección. Preferentemente, el kit de
 45 detección puede comprender además un instrumento para mezclar el reactivo de detección con la muestra.

Se describe, además, un kit para la detección de un material diana, comprendiendo el kit: un sensor de óxido de aluminio anódico (OAA) que comprende un sustrato, un óxido de aluminio anódico formado en el sustrato y que tiene poros nanodimensionados, y un metal recubierto en la superficie del óxido de aluminio anódico; y un aptámero que
 50 se une específicamente al material diana.

Preferentemente, el metal puede ser oro, pero no se limita al mismo. El aptámero puede inmovilizarse en un sensor OAA usando un grupo funcional unido al extremo del aptámero, en el que el grupo funcional puede ser un grupo tiol y puede unirse por adsorción o unirse mediante un grupo enlazador. Además, el kit puede comprender además un
 55 sistema de flujo. Tal como se usa en la presente memoria, el término "sistema de flujo" significa un sistema que permite que un tampón de unión que contiene la muestra o el aptámero circule en el sensor OAA.

El kit para la detección del material diana puede tomar la forma de frascos, viales, sobres, envolturas, tubos, ampollas y similares, que pueden estar hechos en parte o en su totalidad de plástico, vidrio, papel, papel de
 60 aluminio, cera y similares. Los recipientes pueden estar equipados con una tapa total o parcialmente desprendible

que inicialmente puede formar parte del recipiente o puede fijarse al recipiente por medios mecánicos, adhesivos u otros. El recipiente puede estar equipado también con un tapón, que permite acceder al contenido mediante la aguja de una jeringa. El kit puede comprender un envase exterior que puede incluir instrucciones relativas al uso de los componentes.

5

EJEMPLOS

A continuación, la presente invención se describirá en mayor detalle con referencia a ejemplos. Para los expertos en la materia será evidente que estos ejemplos son sólo con fines ilustrativos y no debe entenderse que limitan el alcance de la presente invención.

En particular, en los Ejemplos mostrados a continuación, la detección de bisfenol se realizó usando un aptámero que se une específicamente a bisfenol A. Sin embargo, para un experto en la materia será evidente que el procedimiento de la presente invención puede aplicarse también para detectar materiales diana distintos de bisfenol A usando aptámeros que se unen específicamente a los otros materiales diana.

Ejemplo 1: Aislamiento de un aptámero que se une específicamente a bisfenol A y preparación de un chip de sol-gel que tiene el aptámero inmovilizado en el mismo

20 1-1: Aislamiento de aptámero que se une específicamente a bisfenol A

En primer lugar, se sintetizó químicamente una biblioteca de ADNmc aleatorios que tenían las siguientes secuencias y se aisló mediante PAGE (Genotech Inc., Corea).

25 5'-GGGCCGTTTGAACACGAGCATG-N₆₀-GGACAGTACTCAGGTCATCCTAGG-3' (SEQ ID NO: 1)

Para la reserva de ADNmc, se llevó a cabo el procedimiento de selección y amplificación SELEX 12 veces usando una columna de afinidad de bisfenol A-agarosa, seleccionando así un total de 27 de los siguientes aptámeros específicos de bisfenol A.

30

#31 5'-CGGCCCTAGG ATGACCTGAG TACTGTCCCT CACCCCTACT TCCGCCACTG GCCAACAGC-3' (SEQ ID NO: 2)

#23 5'-TGCCTAGGAT GACCTGAGTA CTGTCCAGGC TCCGACCTTG TCCCTGCCGC CACTCTCCCA-3' (SEQ ID NO: 3)

35

#47 5'-GCGGACGGGC TCGGCTCACC TAGGATGACC TGAGTACTGT CCCCCTGGCG CTAATTCGGG-3' (SEQ ID NO: 4)

#50 5'-CGGCCCGCCC CTAGGATGAC CTGAGTACTG TCCGCGGGAC GGTATCGCTG AGACAGGTGC-3' (SEQ ID NO: 5)

40

#41 5'-CGGCAGCCCT AGGATGACCT GAGTACTGTC CGCGAAAGAC TCCATGGTAC CCGGTGCTTA-3' (SEQ ID NO: 6)

#27 5'-GGGGGCGTCG NCTAGGATG ACCTGAGTAC TGTCCGCACN CAGGGAGGAT GCATTGAC-3' (SEQ ID NO: 7)

#45 5'-GTGTCCCCAC GTCCTAGGAT GACCTGAGTA CTGTCCAATG CCGCTCCTCC CGATGCAGAC-3' (SEQ ID NO: 8)

45

#11 5'-CTCTTCNCTC CAATTCGTAA GATGACCTGA GGTCTGCCCA ACGGTGTTTA GAACCCCTTG-3' (SEQ ID NO: 9)

#12-3 5'-CGCAGCGCGC CCCTGAGTAC TGTCCGCCCA ACGGTGTGAC GGCCCTGCGA TCAACGATTG-3' (SEQ ID NO: 10)

#12-4 5'-GGGCCGTCTCT AGGATGACCT GAGTACTGTC CGCCCAACGG TGTGACGGCC CTGCGATCAA-3' (SEQ ID NO: 11)

50

#22 5'-CCCTCGCCCT GAGTACTGTC CCCCCTCCGT CCGGTGAGGG CCACTATCGC TAACTGATCA-3' (SEQ ID NO: 12)

#4 5'-AGGCCGTTGG TGTGGTGGGC CTAGGGCCGG CGGCGCACAG CTGTTATAGA CGTCTCCAGC-3' (SEQ ID NO: 13)

55

#12-5 5'-CCGCCGTTGG TGTGGTGGGC CTAGGGCCGG CGGCGCACAG CTGTTATAGA CGTCTCCAGC-3' (SEQ ID NO: 14)

#6 5'-CCGCCGTTGG TGTGGTGGGC CTAGGGCCGG CGGCGCACAG CTGTTATAGA CGCTCCAGC-3' (SEQ ID NO: 15)

#12-7 5'-CCGCCGTTGG TGTGGTGGGC CCAGGGCCGG CGGCGCACAG CTGTTATAGA CGCTCCAGC-3' (SEQ ID NO: 16)

60

#12-2 5'-TGACGGTGGC GTGGAGGGCG CGTATCAATC GTTGATCGCA GGGCCGTCAT ACCGTTGGAG-3' (SEQ ID NO: 17)
 #12-9 5'-TGACGGTGGC GTGGAGGGCG CGTATCAATC GTTGATCGCA GGGCCGTCAT ACCGTTGGGGG-3' (SEQ ID NO: 18)
 5 #12-6 5'-TGACGGTGGC GTGGAGGGCG CGTATCAATC GTTGATCGCA GGGCCGTCAT ACCGGTCGGG-3' (SEQ ID NO: 19)
 #2 5'-GCCGACAGGG CATGGGACGC TATCAGCGGT GTCAATCGAA TTCCCGCGGC CGCCATGCGG-3' (SEQ ID NO: 20)
 #14 5'-GGTCCCCGCA GCTCATACGG CGCTCCAGCG TAATCGAATT CCCGCGGCCG CCATGCGGCC-3' (SEQ ID NO: 21)
 10 #46 5'-GCGAGTGGCC CATCAGCAGA GCGTAATCCC CACGCACATC GAGTGCCCCC GGCCGGTGCT-3' (SEQ ID NO: 22)
 #12 5'-GTATTGTCAT TCATATCCTC GTGCTTGCTG TCCTCACCCC ACCCACCAGA ATGGAAA-3' (SEQ ID NO: 23)
 15 #13 5'-CCTGGTATTG TCTTGCCAAT CCTCGCCCTG GCTGTCTTAC CCCTCCCCAC CCGCCTGAAG-3' (SEQ ID NO: 24)
 #48 5'-GTCGACTCGC GGGTACCGTG CTCAATGTCC CAATCCGGGG AAGCGTTTAG ACCCGCAGCC CAC-3' (SEQ ID NO: 25)
 #40 5'-GTCGCCACTG CGGGTACCGT GCTTGGGCNA CCGATGNACC NTGNNACCGT GTTTNGCC-3' (SEQ ID NO: 26)
 20 #3 5'-CCGGTGGGTG GTCAGGTGGG ATAGCGTTCC GCGTATGGCC CAGCGCATCA CGGGTTCGCA CCA-3' (SEQ ID NO: 27)
 #32 5'-GGGCGGTGGG TGGCGAGTTG TGAGACGCTG GAGGAGGTTG CTGCCCCCGG CACATTGGGA-3' (SEQ ID NO: 28)
 25

1-2: Preparación de chip de sol-gel

Se preparó un chip de sensor que tenía el primer aptámero inmovilizado en el mismo de la siguiente forma. Tal como se muestra en la FIG. 3, se inmovilizaron puntos de sol-gel junto con un control negativo, aptámeros (#3 y #12-5) y un control positivo en placas de 96 pocillos recubiertas con PMMA en el orden de control positivo (P), aptámero #12-5, aptámero #3 y control negativo (N) usando OmniGrid Accent Microarrayer (DIGI LAB, EE. UU.), preparando así chips de sol-gel.

Se preparó una composición para formar los puntos de sol-gel en de la siguiente forma. En primer lugar, se mezclaron entre sí ortosilicato de tetrametilo (TMOS) y metiltrimetoxisilicato (MTMS) para preparar una composición de sol. Además, se preparó HCl 100 mM como solución I.

Por otra parte, se mezclaron entre sí tampón SP 100 mM (pH 5,8) y 20 µl de agua destilada doble (ADD), después de lo cual se añadieron 10 µl de cada uno de anticuerpo Cy3 (Santa Cruz, EE. UU.) para el control positivo, tampón PBS para el control negativo y los aptámeros seleccionados (#3 y #12-5) a la mezcla y se introdujeron en vórtex durante 5 segundos y se centrifugaron, preparando así la solución II.

A continuación, se dispensaron en secuencia la composición de sol, la solución I y la solución II, y se gelificaron los puntos de sol-gel resultantes durante 13-15 horas, preparando así chips de sol-gel.

Ejemplo 2: Detección de bisfenol A usando chip de sol-gel

En primer lugar, se marcaron los aptámeros #3 y #12-5 con desoxinucleotidiltransferasa terminal (Fermentas, Canadá) y Cy3-dUTP (GeneChem, Corea) y se usaron en este Ejemplo. No obstante, el marcado puede realizarse también uniendo un fragmento tal como 5'-GGGCCGTTTGAACACGAGCATG-3' (SEQ ID NO: 29) al extremo de cada uno de los de aptámeros #3 y #12-5 (que actúan como los segundos aptámeros), uniendo Cy3 a un fragmento de ácido nucleico tal como 5'-CATGCTCGTGTTCGAACGGCCC-3' (SEQ ID NO: 30) capaz de unirse de forma complementaria al fragmento unido al segundo aptámero y realizando la unión complementaria del fragmento de ácido nucleico marcado con Cy3 al fragmento unido al extremo del segundo aptámero.

A continuación, se añadieron 50 µM de bisfenol A y 2 µM del aptámero marcado con Cy3 (segundo aptámero) a cada pocillo de los chips de sol-gel preparados en el Ejemplo 1-2. Específicamente, tal como se muestra en la FIG. 3, el pocillo superior derecho se trató con bisfenol A (BPA) y aptámero #12-5, el pocillo inferior izquierdo con tampón y aptámero #3 y el pocillo inferior derecho con BPA y aptámero #3, y se incubaron los pocillos. A continuación, se lavaron los pocillos y después se analizaron con un analizador Multi-Image (FUJIFILM, Japón).

Como resultado, tal como se muestra en la FIG. 3, aparecieron señales (indicadas por círculos rojos) en las posiciones de aptámeros inmovilizados #12-5 y #3 sólo cuando el bisfenol A estaba presente, lo que sugiere que el uso del chip de sol-gel según la presente invención puede detectar específicamente bisfenol A. En concreto, incluso el bisfenol A no polar de bajo peso molecular que era difícil de detectar por procedimientos de la técnica anterior se detectó específicamente mediante el procedimiento de la presente invención.

Ejemplo 3: Fabricación de sensor FET-NTC para la detección de bisfenol A (referencia)

10 Usando el aptámero aislado en el Ejemplo 1, se preparó un chip de sensor FET-nanotubo de carbono de pared simple (NTC-ps) según un procedimiento (Lee, M. y col., *Nat. Nanotechnol.*, 1:66, 2006) conocido en la técnica anterior. Se preparó una monocapa autoensamblada de octadeciltriclorosilano (OTS) terminado en metilo sobre un sustrato de SiO₂ por fotolitografía convencional para crear patrones moleculares de pasivación no polares. Para este fin, se sumergió el sustrato en una solución de 0,05 mg/ml de nanotubos de carbono de pared simple (NTCps) en o-
15 diclorobenceno, y los NTCps se ensamblaron directamente en sitios de SiO₂ y se alinearon. Los electrodos se prepararon sobre el sustrato por fotolitografía, y se depositó térmicamente Pd y Au (Au de 30 nm sobre Pd de 10 nm) sobre el sustrato según un procedimiento de separación vertical.

Con el fin de proporcionar un sensor basado en NTCps para detección de bisfenol A, se inmovilizó el aptámero #3 (SEQ ID NO: 3) entre los 27 aptámeros obtenidos anteriormente que se unen específicamente a bisfenol A sobre el electrodo de Au del chip de sensores FET-NTCps. Para inmovilización, se trató el chip previamente con MCH sumergiéndolo en solución 10 nM de MCH (mercaptohexanol) (en agua neutralizada) durante toda la noche. A continuación, se sumergió el chip en aptámero 1 µM en tampón (Tris-HCl 10 nM) durante 10 horas, con lo que el electrodo de oro se recubrió con el aptámero de ADNmc que tenía un grupo tiol en el extremo 5' y que se unió
25 específicamente a bisfenol A, fabricando de este modo un sensor FET para la detección de bisfenol A.

Ejemplo 4: Detección de bisfenol A usando sensor FET-NTC

La detección eléctrica de bisfenol A (BPA) se realizó vigilando los cambios en corriente eléctrica (desviación fuente-drenaje: 0,1 V), inducidos por la introducción de BPA u otras moléculas, usando el analizador de semiconductores Keithley 4200 (EE. UU.).

En primer lugar, para un grupo de control, mientras se vigilaba el cambio en la corriente fuente-drenaje, se añadieron varias concentraciones (de 1 pM a 100 nM) de una solución de BPA en un tampón de unión (Tris-HCl 100 mM, NaCl
35 200 mM, KCl 25 mM, MgCl₂ 10 mM, DMSO 2,5 ppm) al sensor fabricado en el Ejemplo 3. Para un grupo de ensayo, se añadió BPA que tenía unido al mismo el aptámero #3 (SEQ ID NO: 5; segundo aptámero) que se unió específicamente a bisfenol A, a diversas concentraciones (de 1 pM a 100 nM) en el sensor fabricado en el Ejemplo 3 (véase la FIG. 4). En la presente memoria, el BPA que tenía el aptámero #3 (segundo aptámero) unido al mismo se preparó de la siguiente forma. En primer lugar, el BPA y la solución del aptámero se mezclaron entre sí a la misma
40 concentración, después de lo cual la solución mixta se calentó a 95°C durante 5 minutos y se enfrió a temperatura ambiente durante 1-2 horas. Además, para un grupo de control, se añadió una solución de aptámero que contenía aptámero #3 en solitario sin BPA al sensor, fabricado en el Ejemplo 3, en las mismas condiciones descritas anteriormente.

45 Por otra parte, para examinar si el sensor FET fabricado para detección de BPA detecta específicamente sólo BPA, se introdujeron bisfenol B (BPB), 4,4'-bisfenol (BP) y bisfenol A 6F (6F), que tienen estructuras similares a la de BPA, a una concentración de 1 nM.

Como resultado, tal como se muestra en la FIG. 5a, en el caso en que se añadió solución de bisfenol A en solitario, el chip del sensor FET no detectó el bisfenol A de molécula no polar incluso cuando el bisfenol A se añadió a una
50 concentración de 100 nM. Esto se debe a que el BPA en sí no tiene ninguna carga ni dipolo. Por otra parte, cuando la muestra que contenía bisfenol A se añadió junto con el segundo aptámero por el procedimiento de la presente invención, la señal era claramente diferente de la señal de fondo tal como se muestra en la FIG. 5b, lo que sugiere que el bisfenol A de molécula no polar puede detectarse a partir de una concentración de 1 pM según el
55 procedimiento de la presente invención. Además, tal como se muestra en la FIG. 5c, cuando el segundo aptámero en solitario se añadió al sensor sin bisfenol A, no se produjo ningún cambio significativo, como en la FIG. 5a.

Además, tal como se muestra en la FIG. 5d, se introdujeron bisfenol B (BPB), 4,4'-bisfenol (BP) y bisfenol A 6F (6F), que tienen estructuras similares a la del bisfenol A (BPA), sin que se produjeran cambios significativos en la corriente
60 eléctrica.

Los resultados experimentales anteriores sugieren que el procedimiento de detección según la presente invención puede detectar específicamente incluso un mol de bajo peso molecular no polar en una solución, que no podría detectarse con sensores FET convencionales debido a la transferencia de cargas excesivamente bajas.

5

Ejemplo 5: Detección basada en sensores OAA (óxido de aluminio anódico) multicanal de material diana que usa aptámero

5-1: Fabricación de sensor OAA

10

El sensor OAA (óxido de aluminio anódico) usado en este Ejemplo se fabricó de la siguiente forma.

(1) Se formó un patrón metálico formado por aluminio de 1,3 μm de grosor, oro de 5 nm de grosor y titanio de 10 nm de grosor, depositado usando un evaporador de haz de electrones, en un sustrato de silicio que tenía una capa dióxido de silicio de 200 nm de grosor, por fotolitografía usando un procedimiento de separación vertical.

15

(2) Los poros nanodimensionados de óxido de aluminio anódico tenían un diámetro de aproximadamente 75 nm y se formaron mediante un procedimiento de oxidación anódica en dos etapas (Masuda, H., Fukuda, K., 1995. Science 268 (5216), 1466-1468). La película de aluminio depositada en la primera etapa de oxidación anódica se anodizó en ácido oxálico 0,3 M a temperatura ambiente a una tensión constante de 40 V durante 5 minutos. A continuación, se disolvió la película de óxido de aluminio anódico en una solución de ácido crómico del 1,8 % en peso a 70°C, y a continuación se anodizó durante 5 minutos. La capa límite del óxido de aluminio anódico se eliminó sumergiéndolo en una solución de ácido fosfórico del 6 % en peso a temperatura ambiente, y se depositó dióxido de silicio de 450 nm de grosor en el lado exterior de la región del óxido de aluminio anódico.

20

(3) Un nanocable de oro actuó como electrodo inferior a una tensión constante de 1,1 V en una solución electrolítica de tetracloroaurato de hidrógeno (HAuCl_4 ; ajustada a un pH de 4 por adición de ácido sulfúrico). Se prepararon electrodos de oro superiores (0,3 x 5.5 mm) en la región del óxido de aluminio anódico por fotolitografía usando un procedimiento de separación vertical.

25

(4) A continuación, se montaron canales microfluidicos de PDMA en la configuración de sensores.

5-2: Detección de material diana que usa sensor OAA

El sensor OAA fabricado en el Ejemplo 5-1 se conectó a un sistema de flujo, 10 nM de un aptámero (aptámero #3 de SEQ ID NO: 27) que tenía un grupo tiol unido al extremo 3' del mismo se disolvieron en un tampón de unión (Tris-HCl 25 mM, NaCl 100 mM, KCl 25 mM, MgCl_2 10 mM, pH 8,0) y a continuación se incubó durante toda la noche mientras se introducía en el sensor OAA a una velocidad de 0,1 ml/h. Dado que la superficie del sensor OAA estaba recubierta con partículas de oro, el grupo tiol en el extremo 3' del aptámero se unió de forma covalente con las partículas de oro, con lo que el aptámero se unió a la superficie del sensor OAA. Para un grupo de control, se usó un sensor en el que se introdujo un tampón de unión en solitario sin el aptámero y se incubó. Se introdujo un tampón de unión de bisfenol A a una velocidad de 0,5 ml/h durante 1 hora y se preparó como nivel de tampón de referencia. El bisfenol A se introdujo a concentraciones de 1 nM, 10 nM y 100 nM en el sensor, que a continuación se lavó con un tampón de unión, después de lo cual se midió la capacitancia (nF) del sensor. Con el fin de determinar una frecuencia a la cual medir la capacitancia, se llevó a cabo un experimento de barrido de frecuencias.

35

Mientras la frecuencia se modificaba de 0 Hz a 1.000 Hz, la capacitancia se midió cuando el aptámero se unió al sensor y cuando se introdujo el bisfenol A en el sensor. Como resultado, tal como se muestra en la FIG. 7, los resultados más ideales se mostraron a 100 Hz. Así, en experimentos posteriores, la capacitancia se midió a 100 Hz.

40

Por otra parte, para un grupo de control, se usó un sensor OAA al que no se unió aptámero, y para un grupo experimental, se usó un sensor OAA al que se unió el aptámero para llevar a cabo un experimento sobre la detección de bisfenol A.

Como resultado, tal como se muestra en la FIG. 8a, en el sensor OAA al que no se unió aptámero, no se produjo ningún cambio en la capacitancia cuando se introdujo el bisfenol A en el sensor OAA. Sin embargo, tal como se muestra en la FIG. 8b, en el sensor OAA al que se unió el aptámero, la capacitancia disminuyó en el 25 % cuando se introdujo 10 nM de bisfenol A, y disminuyó en el 36,1 % cuando se introdujo 100 nM de bisfenol A.

Además, los cambios en la capacitancia cuando el bisfenol A se introdujo a concentraciones de 1 nM, 10 nM y 100

55

nM se muestran gráficamente en la FIG. 9. Como puede verse, se trazó una gráfica generalmente lineal, aun cuando existió un ligero error a una concentración de 1 nM o menos.

5 Los resultados experimentales anteriores sugieren que el procedimiento de detección basado en sensor OAA de la presente invención puede detectar específicamente incluso una molécula no polar de bajo peso molecular en una solución, que no podría detectarse usando procedimientos de la técnica anterior debido a la transferencia de cargas excesivamente bajas.

Aplicabilidad industrial

10

Tal como se describe anteriormente, el procedimiento y el kit de la invención para un material diana que usa un aptámero pueden detectar incluso materiales de bajo peso molecular que eran difíciles de detectar en la técnica anterior, permitiendo así la detección de metabolitos relacionados con enfermedades, contaminantes ambientales y toxinas de los alimentos en soluciones. Además, el procedimiento de detección de la presente invención es un

15 procedimiento directo y sencillo y es muy rentable, ya que usa el aptámero que puede reproducirse de forma consistente y puede producirse a bajo coste. Así, la presente invención es muy útil.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de detección de un material diana que usa aptámeros, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- 5 (a) adición de una muestra que contiene un material diana, y un segundo aptámero que se une específicamente al material diana y que tiene una etiqueta unida al mismo, a un primer aptámero inmovilizado en una fase sólida y que se une específicamente al material diana, para formar una mezcla, e incubación de la mezcla, en el que el primer aptámero o el segundo aptámero se seleccionan entre aptámeros representados por las secuencias de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 2 a 28; y
- 10 (b) análisis de la etiqueta para detectar el material diana.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el material diana es bisfenol A.
- 15 3. Un procedimiento de detección de un material diana que usa aptámeros, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- (a) adición de una muestra que contiene un material diana, y un segundo aptámero que se une específicamente al material diana, a un primer aptámero inmovilizado en una fase sólida y que se une específicamente al material diana, para formar una mezcla, e incubación de la mezcla, en el que el primer aptámero o el segundo aptámero se seleccionan entre aptámeros representados por las secuencias de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 2 a 28;
- 20 (b) unión de una etiqueta al segundo aptámero; y
- 25 (c) análisis de la etiqueta para detectar el material diana.
4. El procedimiento según la reivindicación 3, en el que se realiza la unión de la etiqueta en la etapa (b) mediante la unión complementaria de un fragmento de ácido nucleico al segundo aptámero, en el que el fragmento de ácido nucleico tiene una etiqueta unida al mismo y es capaz de unión complementaria con el segundo aptámero.
- 30 5. El procedimiento según la reivindicación 4, en el que el fragmento de ácido nucleico se une de forma complementaria a un extremo del segundo aptámero.
- 35 6. Un kit para la detección de un material diana, comprendiendo el kit: una fase sólida que ha inmovilizado en la misma un primer aptámero que se une específicamente a un material diana; y un reactivo de detección que contiene un segundo aptámero marcado opcionalmente que se une específicamente al material diana, en el que el primer aptámero o el segundo aptámero se seleccionan entre aptámeros representados por las secuencias de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 2 a 28.
- 40 7. El kit según la reivindicación 6, en el que el kit comprende además un fragmento de ácido nucleico que tiene una etiqueta unida al mismo y que es capaz de unión complementaria con el segundo aptámero.

FIG. 1

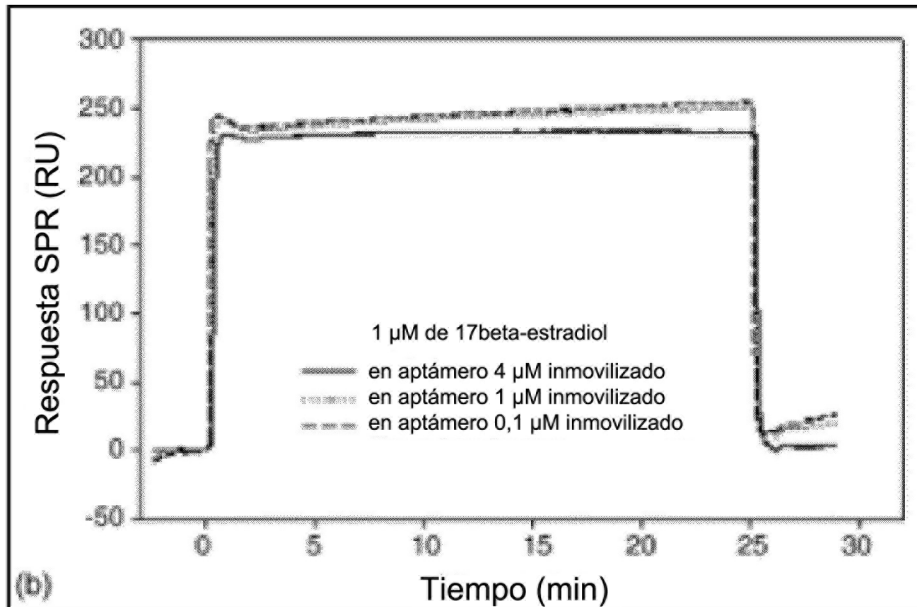


FIG. 2

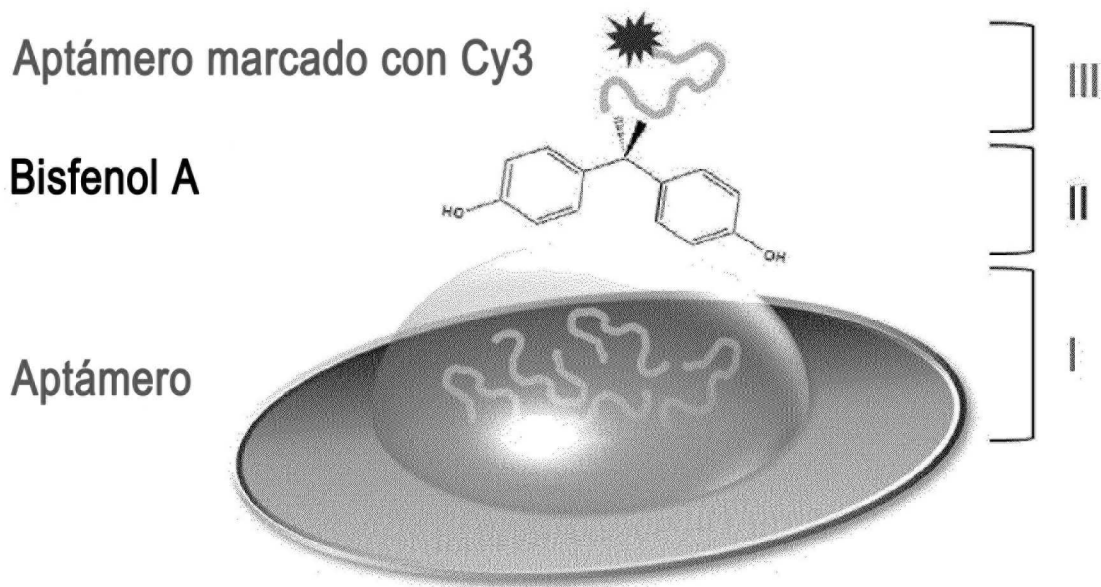


FIG. 3

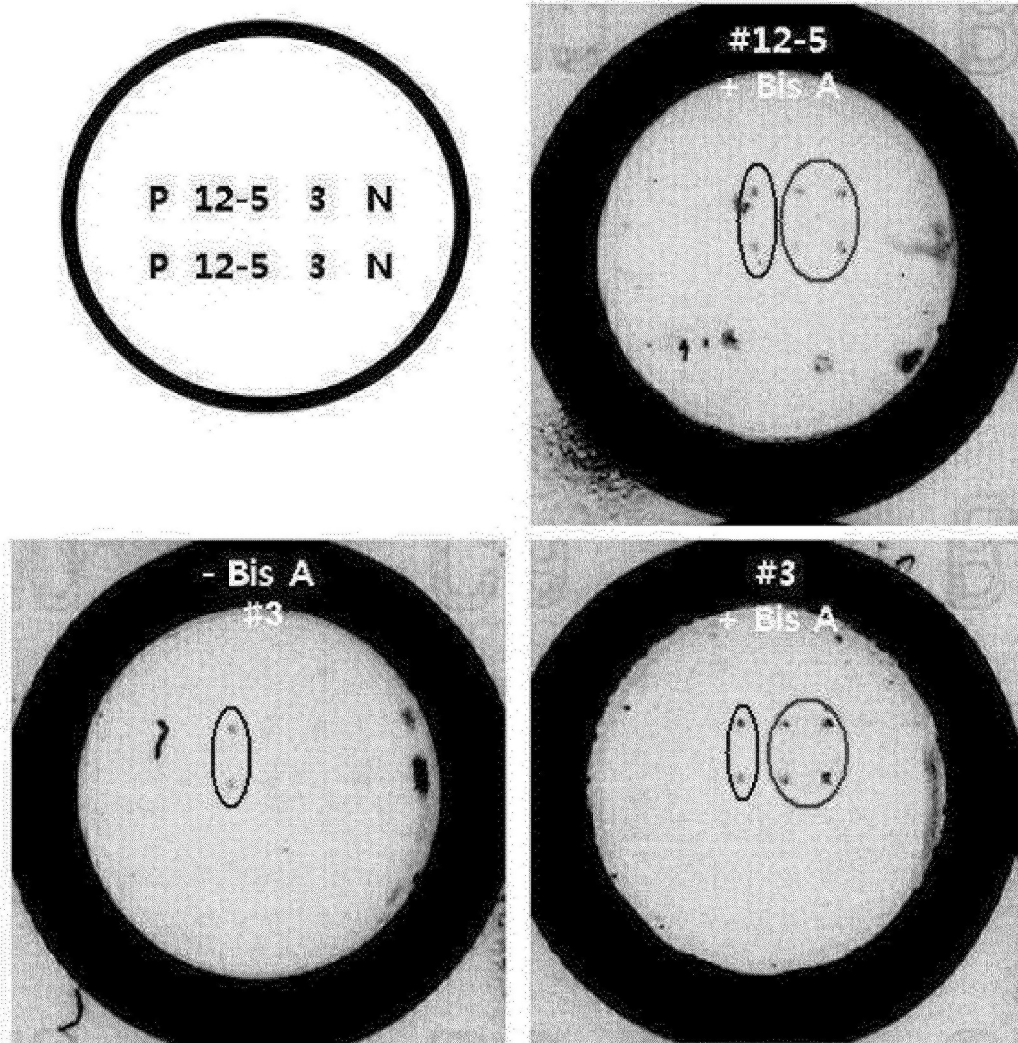


FIG. 4

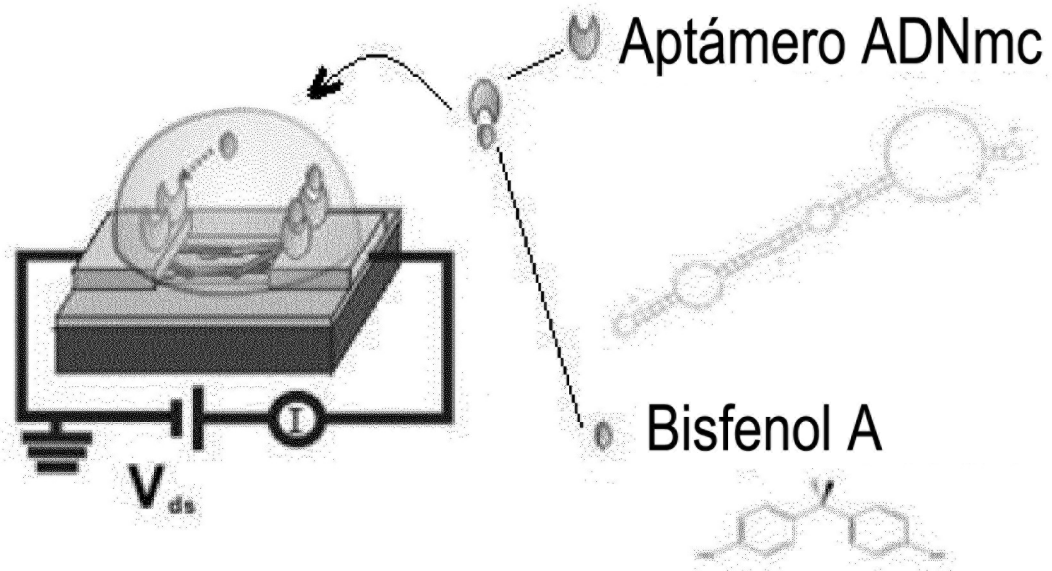


FIG. 5

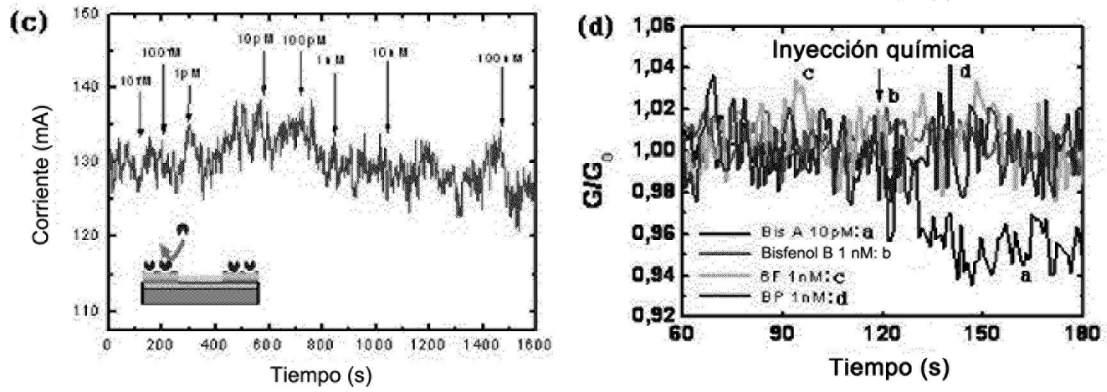
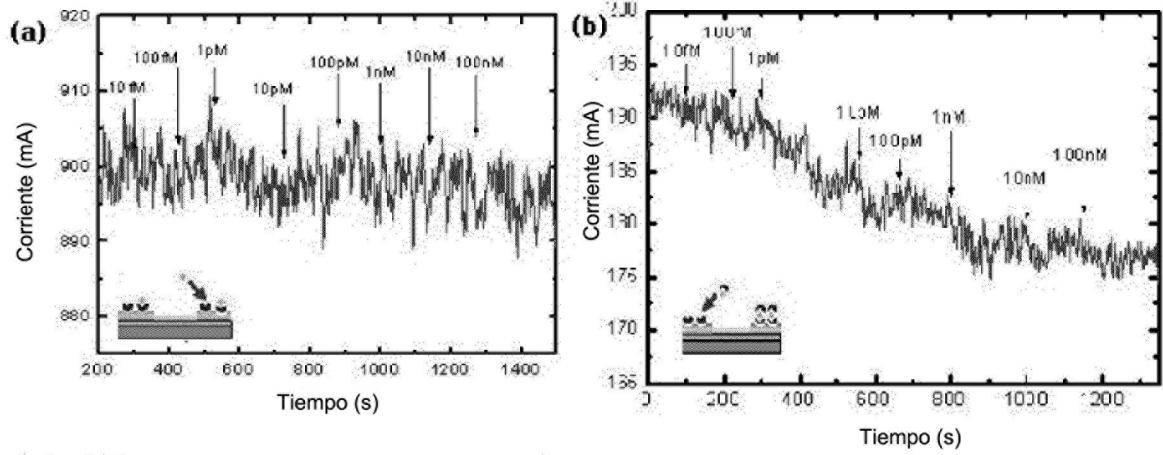


FIG. 6

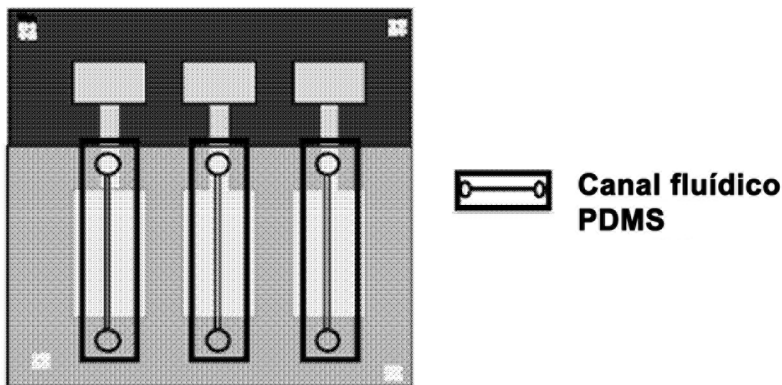


FIG. 7

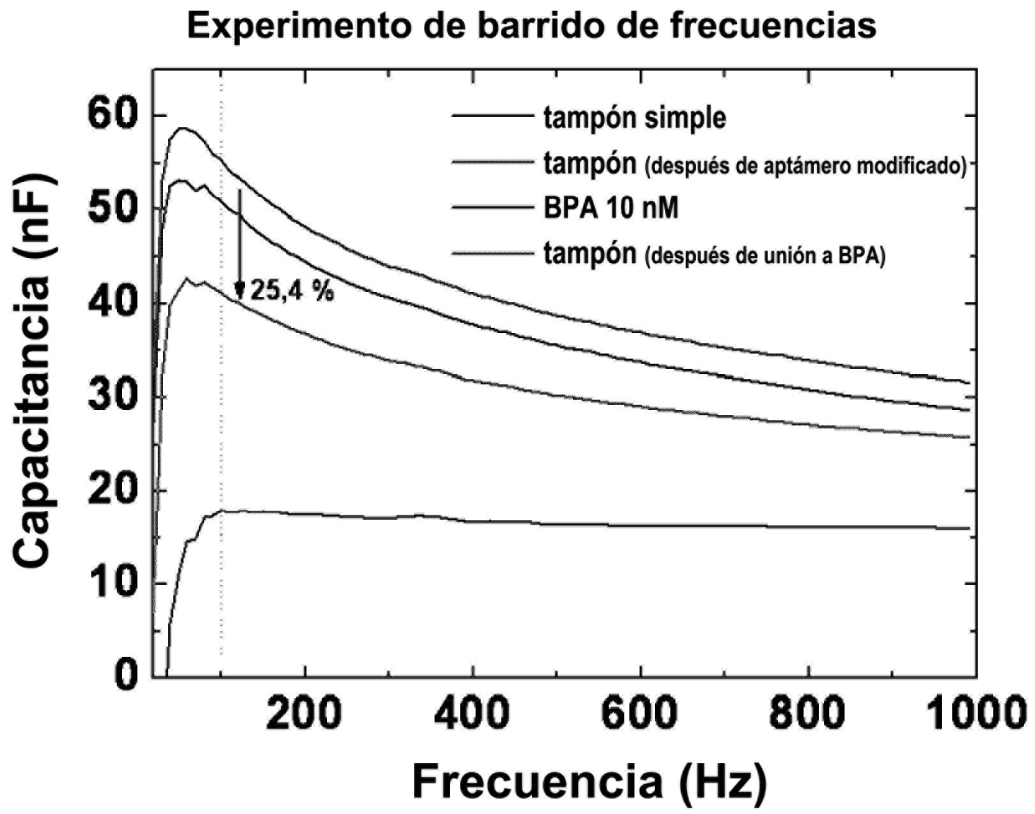


FIG. 8

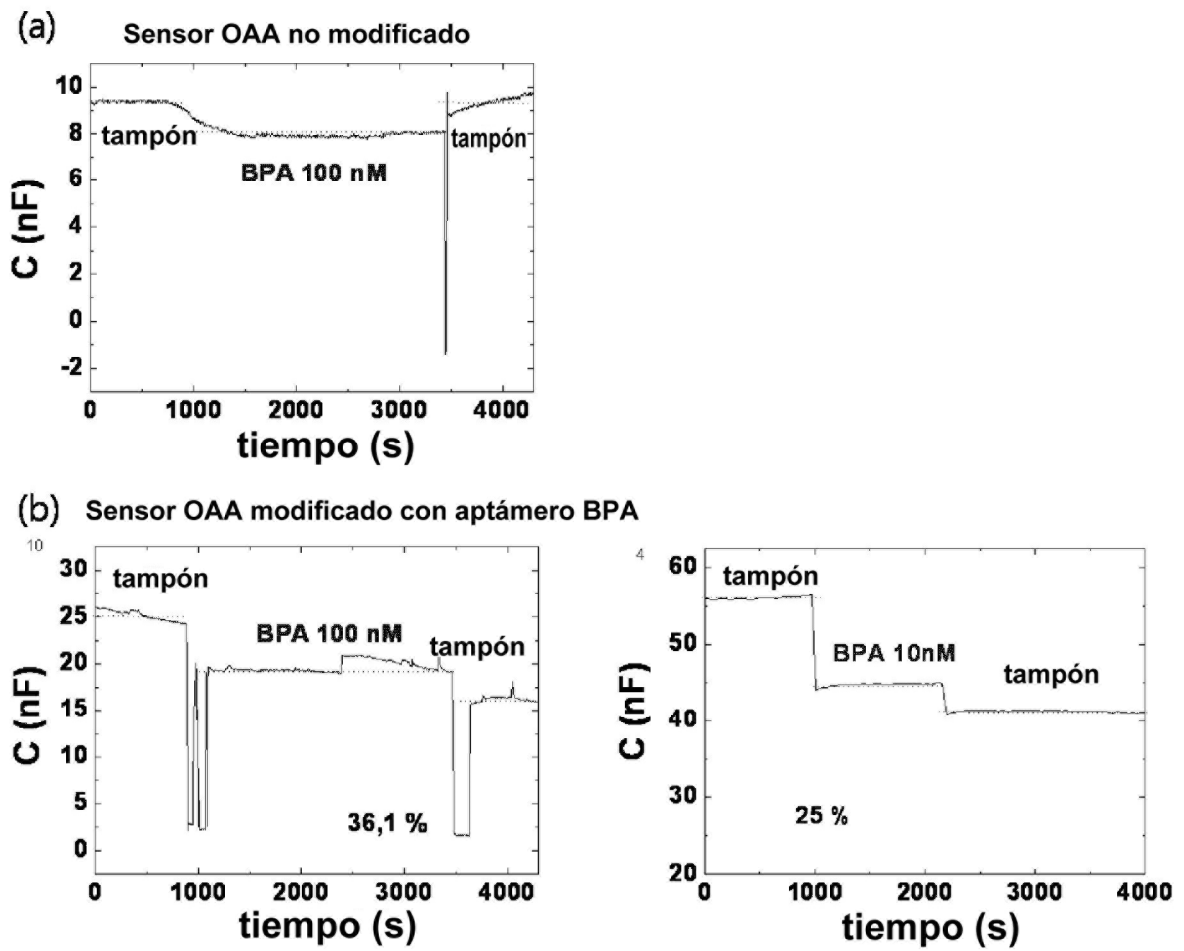


FIG. 9

