

# Análisis cuantitativo de interacciones moleculares proteína-proteína mediante la combinación de microarreglos y un lector óptico basado en el fenómeno de resonancia de plasmones superficiales

V. Altuzar<sup>a</sup>, C. Mendoza-Barrera<sup>a</sup>, M.L. Muñoz<sup>b</sup>, J.G. Mendoza-Alvarez<sup>c</sup> y F. Sánchez-Sinencio<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Centro de Investigación en Micro y Nanotecnología, Universidad Veracruzana,  
Edif. F, Av. Ruiz Cortines 455, Fracc. Costa Verde, 94294, Boca del Río, Veracruz, México.

<sup>b</sup>Departamento de Genética y Biología Molecular,  
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional,  
Av. I.P.N. 2508, Col. Zacatenco, 07000, México D.F., México.

<sup>c</sup>Departamento de Física, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional,  
Av. I.P.N. 2508, Col. Zacatenco, 07000, México D.F., México,  
e-mail: valtuzar@uv.mx; omendoza@uv.mx; lmunoz@cinvestav.mx;  
jmendoza@fis.cinvestav.mx; fsanchez@fis.cinvestav.mx

Recibido el 17 de septiembre de 2009; aceptado el 3 de marzo de 2010

The surface plasmon resonance (SPR) finds a directly application like an optical sensor during biomolecular interaction reading. In this work we applied a surface plasmon resonance microscope (SPRM) to simultaneously and in real time detect the protein-protein interactions combined with microarrays. The detection of those biomolecular binding events was carried out label free. The fabricated microarrays contain 144 binding active microsites of protein from (1) human serum albumin HSA (0.1, 0.5, 1.0 mg/ml), (2) lyzosome Lyz (0.1, 0.5, 1.0 mg/ml), (3) anti bovine serum albumin anti BSA (1.0 mg/ml), and (4) bovine serum albumin BSA (0.1, 0.5, 1.0 mg/ml). We determined simultaneously the surface density concentration when anti BSA (1.0 mg/ml) was injected onto the microsites of protein by using the SPR kinetic interaction curves. We found that the surface density concentration of anti BSA (1.0 g/ml) during the interaction with active microsites was 660 ng/cm<sup>2</sup> for BSA, 366 ng/cm<sup>2</sup> in the case of HSA, 22.3 ng/cm<sup>2</sup> with Lyz, and 8.3 ng/cm<sup>2</sup> for anti BSA.

**Keywords:** Biosensors; proteomics; surface plasmon; protein-protein interaction.

La resonancia de plasmones superficiales (SPR) encuentra una aplicación directa como sensor óptico en la lectura de interacciones biomoleculares. En este trabajo empleamos un microscopio de resonancia de plasmones superficiales para la lectura simultánea y en tiempo real de interacciones proteína-proteína mediante su combinación con microarreglos. La detección de dichos eventos moleculares se hacen sin necesidad de marcado fluorescente de la molécula bajo estudio. Los microarreglos fabricados contienen 144 elementos microscópicos activos de proteínas de (1) albumina de suero de humano HSA (0.1, 0.5, 1.0 mg/ml), (2) lisozima Lyz (0.1, 0.5, 1.0 mg/ml), (3) anti albúmina de suero de bovino anti BSA (1.0 mg/ml) y (4) albúmina de suero de bovino BSA (0.1, 0.5, 1.0 mg/ml). Determinamos simultáneamente las densidades de concentración superficial de interacción de anti albumina de suero de bovino a 1.0 mg/ml inyectada sobre los micrositos de proteínas previamente descritos, a través de las curvas de cinética de interacción SPR. Encontramos que para concentraciones altas (1.0 mg/ml) de los micrositos impresos interactuando con solución conteniendo anti BSA (1.0 mg/ml), la densidad de concentración superficial de anti BSA anclada fue de 660 ng/cm<sup>2</sup> para BSA, 366 ng/cm<sup>2</sup> en el caso de HSA, 22.3 ng/cm<sup>2</sup> en Lyz y de 8.3 ng/cm<sup>2</sup> para anti BSA.

**Descriptores:** Biosensores; proteómica; plasmones superficiales; interacción proteína-proteína.

PACS: 87.85.fk; 87.85.mk; 73.20.Mf; 87.15.km

## 1. Introducción

En los últimos años la tecnología de microarreglos de DNA ha sido utilizada como una herramienta altamente útil para el análisis cuantitativo, simultáneo y en paralelo de cientos de patrones de expresiones de genes a nivel transcripcional. Es decir, los microarreglos proveen de una gran cantidad de información cuantitativa de expresión de genes, en muchas muestras que contienen diferentes genes y en un relativo corto tiempo de análisis experimental [1]. Un *microarreglo* es una configuración de  $n \times m$  elementos microscópicos activos (o spots) impresos sobre una superficie plana químicamente reactiva. La alta densidad de spots permite el monitoreo en paralelo de hasta 50 mil eventos simultáneos en un solo ensayo [2], mientras que las biomoléculas que los forman

(*moléculas sonda o ligando*) confieren una alta especificidad bioquímica con las moléculas bajo estudio (*moléculas blanco o analito*) [1,3].

El empleo de microarreglos es de gran importancia en la investigación médica y en el diagnóstico clínico [4-9], así como en el descubrimiento de nuevos fármacos [10,11], en el estudio de las funciones de las proteínas [12,13], y en el desarrollo de sensores analíticos [14,15]. Sus aplicaciones van desde la determinación de perfiles de respuesta genómica de los cambios de razón de transcripción asociados con tratamiento de fármacos, estadios de una enfermedad, diferenciación en sus fenotipos, hasta el reconocimiento de mutaciones [16]. Una de las aplicaciones de enormes repercusiones es el uso de microarreglos de *cDNA* en la determinación de patrones de expresión de genes del humano durante la identi-

ficación de genes asociados con enfermedades como cáncer, diabetes y/o enfermedades endémicas, entre otras [17]. Sin embargo, es la era post-genómica (proteómica) la que afronta grandes retos para la completa descripción de las funciones de cada proteína en la materia viva, como parte de una red extendida de interacciones de moléculas interactuando [18].

Existen básicamente dos grandes grupos de mecanismos de lectura de interacciones biomoleculares de microarreglos. El primero se basa en tecnología de marcaje, pudiendo ser fluorescente [19,20] o radiativo [21-23], mientras que el segundo son métodos libres de marcaje como la tecnología de guía de onda [24], técnicas piezoeléctricas basadas en cambios de masa [25] y resonancia de plasmones superficiales [26-28]. Típicamente los límites de detección analíticos de estas tecnologías ocurren en el rango de nanogramos por mililitro para SPR y piezoeléctricos, mientras que para fluorescencia y radiomarcaje es en el rango de picogramos por mililitro. Es decir, aunque los lectores de microarreglos basados en marcaje ofrecen alta sensibilidad presentan una enorme debilidad, debido a que el protocolo de preparación del blanco es largo y en algunas ocasiones puede presentarse sensibilidad cruzada con otros analitos que no son los de interés durante la lectura [29].

En particular, la espectroscopia de resonancia de plasmones superficiales (SPR) es una técnica de análisis superficial que explota el fenómeno de reflexión total interna (TIR) en la interficie de dos medios con propiedades ópticas diferentes descritos por sus funciones dieléctricas  $\epsilon_1$  y  $\epsilon_2$ . Consideremos una intersuperficie en el plano  $xy$  entre dos medios semi-infinitos, 1 y 2, descritos por sus funciones dieléctricas complejas  $\tilde{\epsilon}_1 = \tilde{\epsilon}_1(\omega)$  y  $\tilde{\epsilon}_2 = \tilde{\epsilon}_2(\omega)$  respectivamente, donde  $(\omega)$  es la frecuencia angular. Los plasmones superficiales (SP) solamente pueden ser excitados en dicha intersuperficie si el vector desplazamiento dieléctrico  $\vec{D}$  del modo electromagnético tiene componente paralela al plano de incidencia (ver Fig. 1); por lo que solo los modos con luz polarizada tipo  $\vec{p}$  pueden acoplarse a tal modo [30]. Considérese también que la forma general de las ondas electromagnéticas,  $\vec{E}$  y  $\vec{H}$ , son  $\vec{A}_1 = \vec{A}_{10} e^{i(\vec{k}_{x1}\vec{x} + \vec{k}_{z1}\vec{z} - \omega t)}$  con  $z < 0$  (medio 1) y  $\vec{A}_2 = \vec{A}_{20} e^{i(\vec{k}_{x2}\vec{x} + \vec{k}_{z2}\vec{z} - \omega t)}$  con  $z > 0$  (medio 2), donde  $\vec{k}_{x1}$  y  $\vec{k}_{x2}$  son los vectores de onda en la dirección  $x$ ;  $\vec{k}_{z1}$  y  $\vec{k}_{z2}$  son los correspondientes en la dirección  $z$ . Ambos campos  $\vec{E}$  y  $\vec{H}$  satisfacen las Ecs. de Maxwell. Las componentes tangenciales de  $\vec{E}$  y  $\vec{H}$  deben ser iguales en la interficie, dadas por las Ecs. (1) y (2)

$$E_{x1} = E_{x2} \tag{1}$$

y

$$H_{y1} = H_{y2} \tag{2}$$

de donde de la Ec. (1) se implica que  $k_{x1} = k_{x2} = k_x$

Sustituyendo  $\vec{E}$  y  $\vec{H}$  en la ley de Ampere, obtenemos que

$$k_{z1}H_{y1} = \frac{\omega}{c}\epsilon_1 E_{x1}, \tag{3}$$

y

$$k_{z2}H_{y2} = \frac{\omega}{c}\epsilon_2 E_{x2} \tag{4}$$

Las Ecs. (3) y (4) sólo tienen solución no trivial si

$$\frac{k_{z1}}{k_{z2}} = -\frac{\epsilon_1}{\epsilon_2} \tag{5}$$

lo cual físicamente significa que los modos electromagnéticos sólo pueden ser excitados en la interficie entre dos medios si las constantes dieléctricas de ambos medios tienen signos opuestos.

Si particularmente los medios 1 y 2 son un metal y un dieléctrico con funciones dieléctricas complejas  $\tilde{\epsilon}_m = \epsilon'_m + i\epsilon''_m$  y  $\tilde{\epsilon}_d = \epsilon'_d + i\epsilon''_d$ , respectivamente, entonces se presenta el acoplamiento entre las oscilaciones de plasma colectivo del gas de electrones libres del metal con el campo electromagnético incidente. De las leyes de Faraday y de Ampere, y las Ecs. (3) y (4), obtenemos que

$$k_{zd} = \sqrt{\epsilon_d \left(\frac{\omega}{c}\right)^2 - k_x^2}. \tag{6}$$

Combinando las Ecs. (5) y (6), encontramos que la *relación de dispersión* (relación energía-momento) para los plasmones superficiales en la interface metal/dieléctrico está dada por

$$k_x = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_m \cdot \epsilon_d}{(\epsilon_m + \epsilon_d)}}. \tag{7}$$

Esta ecuación describe la onda superficial del plasma (SPW) si la parte real de  $\epsilon_m$  es negativa y su valor absoluto es menor que  $\epsilon_d$ . Esta condición es satisfecha por varios metales, de los cuales el oro es el más común utilizado en biosensores de SPR [30]. La parte real de la relación de dispersión  $k_x$  se relaciona con el índice de refracción  $n$  mediante la Ec. (8).

$$n = \frac{\omega}{c} Re\{k_x\} = Re\left\{ \sqrt{\frac{\epsilon_m \cdot \epsilon_d}{(\epsilon_m + \epsilon_d)}} \right\}, \tag{8}$$

mientras que la parte imaginaria se relaciona con el modo de atenuación  $b$ :

$$b = Im\{k_x\} \frac{0.2}{ln10} = Re\left\{ \sqrt{\frac{\epsilon_m \cdot \epsilon_d}{(\epsilon_m + \epsilon_d)}} \right\} \frac{0.2\omega}{c ln10} \tag{9}$$

La profundidad de penetración de plasmón superficial en el dieléctrico es particularmente importante si es que la técnica de resonancia de plasmones superficiales (SPR) se emplea para el diseño de sensores ópticos basados en este fenómeno. En ellos, los plasmones superficiales son excitados mediante luz en la región visible cuando la proyección del vector de onda incidente,  $k_{ph}$ , sobre la interface metal-dieléctrico coincide con el vector de onda [Ec. (7)]. Un mecanismo óptico es empleando la configuración Krestschmann-Rather [30], la cual consiste en hacer incidir luz polarizada a través de

un prisma con alto índice de refracción, colocado en la base de una película metálica, el que a un ángulo crítico  $\theta_c$  de reflexión total interna atenuada (TIR), se reflejará totalmente en la base del prisma generando una onda evanescente que se propagará a lo largo de la interficie metal-dieléctrico (Fig. 1) [31,32]. Asumiendo que la influencia del prisma es despreciable en la constante de propagación de la superficie del plasmón en la interficie  $k_x$ , la condición de acoplamiento puede simplificarse como

$$\sqrt{\varepsilon_p} \sin \theta = \operatorname{Re} \left\{ \sqrt{\frac{\varepsilon_m \cdot \varepsilon_d}{\varepsilon_m + \varepsilon_d}} \right\}, \quad (10)$$

donde  $\theta$  es el ángulo de incidencia;  $\varepsilon_m$ ,  $\varepsilon_p$  y  $\varepsilon_d$ , son las funciones dieléctricas del metal, del prisma y del dieléctrico (solución con proteína), respectivamente; y además  $\varepsilon_p > \varepsilon_d$ . La excitación de una superficie de plasmones es acompañada por la transferencia de energía de la luz incidente a la energía de los plasmones superficiales, y su subsecuente disipación en la película metálica. Esto conlleva a una atenuación en la intensidad de la luz reflejada (Fig. 1) [29].

Particularmente, cuando hablamos de la aplicación de SPR para sensado de biosensores, el metal más empleado es una película de oro de espesor nanométrico y el dieléctrico es

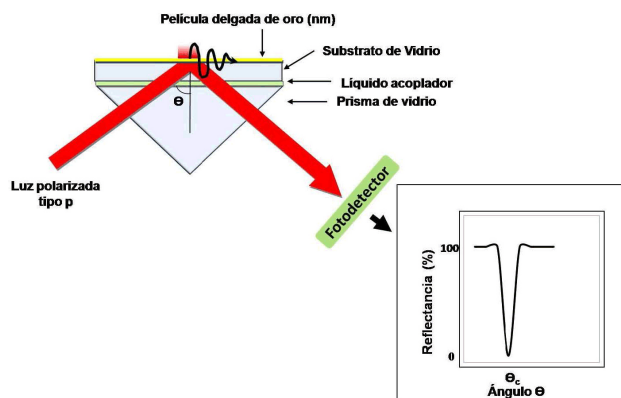


FIGURA 1. Configuración experimental de un sistema óptico SPR para la medición de interacciones biomoleculares.

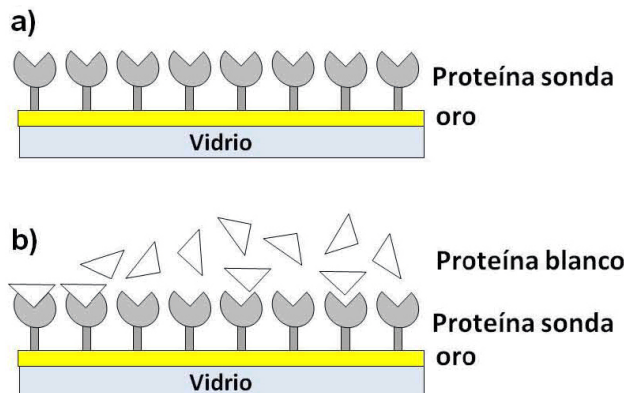


FIGURA 2. Esquema del proceso de interacción entre proteína blanca y proteína sonda. La Fig. 2a muestra al blanco antes de la interacción y la Fig. 2b la interacción específica entre proteína-proteína.

una solución conteniendo las biomoléculas a sensar (*analito o blanco*). El campo eléctrico de una SPW es extremadamente sensible a cambios en el índice de refracción del dieléctrico. Esta propiedad de la SPW es el principio físico fundamental de reconocimiento de un biosensor SPR, el cual contiene sobre su superficie metálica elementos con afinidad biomolecular que capturan específicamente el analito presente en una muestra líquida, produciendo así un incremento local del índice de refracción en la superficie del metal. Dicho incremento del índice de refracción da lugar a un incremento en la constante de propagación SPW a lo largo de la superficie metálica, la cual puede ser medida de manera precisa por medios ópticos (Fig. 1). En interfaces oro-líquido el fenómeno de plasmones superficiales muestra una profundidad de penetración típica de 20-30 nm y 100-500 nm en el metal y dieléctrico, respectivamente, en las regiones visible e infrarroja cercano del espectro [31,32].

Específicamente, ésta técnica detecta cambios del índice de refracción (RI) con alta sensibilidad ( $< 10^{-6}$ ) y en un tiempo de resolución ( $\sim 1$  s) de cualquier película transparente o molécula colocada sobre la superficie metálica activa SPR. Usualmente se emplean dos configuraciones SPR:

- reflectividad contra longitud de onda  $\lambda$ , a un ángulo fijo  $\theta$  o
- reflectividad contra ángulo  $\theta$ , a una longitud de onda fija  $\lambda$ .

La funcionalización de la superficie metálica con micrositios específicos con bioafinidad crea un biosensor, el cual puede detectar la cinética de interacciones biomoleculares en tiempo real y libre de marcaje fluorescente. Por esta razón, la espectroscopia SPR se ha convertido en una herramienta muy útil en bioquímica y química bioanalítica, especialmente para determinar coeficientes de razón de asociación y disociación, y constantes de interacción en equilibrio, las cuales describen las interacciones entre proteínas, DNAs o RNAs y una amplia variedad de otras biomoléculas [33].

Una aplicación de la resonancia de plasmones superficiales es mediante el empleo de un microscopio SPR para medir la cuantificación simultánea de interacciones biomoleculares en un área de lectura de 20 mm<sup>2</sup>, donde se imprime un microarreglo con 400 spots y tiene una resolución lateral de 5  $\mu$ m (Fig. 2) [30,34-36].

En este trabajo reportamos la lectura en tiempo real, *in situ*, de interacciones proteína-proteína mediante la aplicación de un microscopio basado en el fenómeno de resonancia de plasmones superficiales. La detección de las interacciones entre las proteínas sonda afines seleccionadas (albúmina de suero de bovino BSA, albúmina de suero de humano HSA, lisozima Lyz y anti-albúmina de suero de bovino anti BSA) permitió determinar, sin necesidad de marcaje fluorescente, la densidad de concentración superficial de la proteína blanco (anti BSA, 1.0 mg/ml) enlazada covalentemente sobre los sitios activos que contienen anticuerpos a diversas concentraciones (1.0, 0.5 y 0.1 mg/ml).

## 2. Detalles experimentales

### 2.1. Funcionalización de los sustratos

Los sustratos empleados en este trabajo, películas de oro sobre vidrio, fueron adquiridos a GenTel Biosurface, Inc. La película de oro de aproximadamente 50 nm de espesor fue limpiada empleando solución piraña 1:3 por 30 seg. para remover compuestos orgánicos y óxidos. Inmediatamente después los sustratos fueron lavados alternadamente un par de veces con agua desionizada (18 M $\Omega$ ·cm) y etanol absoluto (Sigma). La activación de la superficie de oro se realizó mediante la inmersión de los sustratos limpios en una solución 1 mM del correspondiente tiol en etanol absoluto por un periodo de 24 hrs. Transcurrido el tiempo mencionado, los sustratos fueron removidos de la solución y lavados con etanol absoluto para la inmediata impresión de proteínas.

### 2.2. Impresión de microarreglos de proteínas

Las proteínas sonda empleadas en la fabricación de los lugares activos (*spots*) en los microarreglos fueron anti-albúmina de suero de bovino *anti BSA* (PM= 150 kDa), albúmina de suero de bovino *BSA* (PM= 67 kDa), lisozima *Lyz* (PM= 14.4 kDa) y albúmina de suero de humano *HSA* (PM= 66 kDa). En este trabajo usamos como control positivo a *BSA* y como control negativo a *anti BSA*. Todas las soluciones proteicas fueron preparadas en solución base de fosfato (*PBS*) a pH 7.2, 1X y con 10 % de sulfóxido de dimetilo (*DMSO*) (Sigma-Aldrich); y todas las concentraciones de proteína sonda, fueron de 0.1, 0.5 y 1.0 mg/ml. Por su lado, el control negativo fue impreso a una concentración de 1.0 mg/ml.

La impresión de *spots* o micrositios se realizó mediante un sistema cartesiano de impresión nanoprint LM60 (Telechem International, Inc.), diseñado para tomar muestras biológicas de una base con cajas de 384 micro-pozos, los cuales contuvieron las 10 soluciones de interés. Cada punta tomó un promedio de 0.2 nl de solución que transfirió por adhesión al hacer contacto con la superficie de oro previamente aminofuncionalizada (impresión). La inmovilización de las proteínas depositadas se lleva a cabo por acoplamiento covalente entre la superficie aminorreactiva ( $-\text{NH}_3^+$ ) y los grupos reactivos carboxilos de las proteínas ( $-\text{COOH}^-$ ). Se diseñó el microarreglo de tal forma que en un área de 3 mm  $\times$  4 mm se tuvieran 144 *spots* activos. El diámetro de cada *spot* es de 120  $\mu\text{m}$ , mientras que la distancia centro a centro entre dos *spots* es de 300  $\mu\text{m}$  para evitar el traslape. La repetibilidad de impresión tiene una precisión  $\pm 10 \mu\text{m}$ .

### 2.3. Microscopio SPR

En este trabajo, la interacción proteína-proteína fue medida empleando un microscopio SPR de configuración tipo Kretschmann-Rather [30]. Brevemente, se utilizó un láser estabilizado de HeNe ( $\lambda = 632.8 \text{ nm}$ ) como fuente de excitación

para este sistema. El haz láser fue polarizado tipo p, expandido y colimado antes de llegar a un prisma esférico trunco al cual fue acoplado el *biochip* que contiene los *spots* con proteínas en su parte posterior. Los índices de refracción, tanto de la base del microarreglo del prisma, como del líquido acoplador, fueron de 1.76. El área incidente del láser sobre la parte posterior del microarreglo fue de aproximadamente 20 mm<sup>2</sup>, mientras que la interacción biomolecular proteína-proteína de cada uno de los *spots* fue adquirida con una cámara CCD (Charge-Coupled Device) cuando un sistema de inyección de fluido de bajo volumen (5  $\mu\text{l}/\text{seg}$ ) irriga al microarreglo. Los centros de rotación de la cámara CCD y del prisma fueron alineados usando dos rotores de alta precisión (0.0002 $^\circ$ ), tal que los ángulos de los haces de incidencia y reflexión son acoplados de manera simultánea. La intensidad de la luz reflejada y la variación en el ángulo de incidencia del haz se adquirieron mediante una tarjeta de adquisición de datos conectada a una computadora. El mecanismo de interacción biomolecular empleando el microscopio SPR de la Fig. 1 se muestra esquemáticamente en la Fig. 2.

## 3. Cuantificación absoluta de la concentración superficial mediante espectroscopia SPR

En este artículo se explota la capacidad de SPR para medir el índice de refracción efectivo,  $\eta_{ef}$ , de un sistema modelo bicapa formado por una capa sonda o adsorbato (monocapa autoensamblada de proteínas HSA, BSA, Lyz o anti BSA) depositada sobre una película metálica (oro), y un analito de interés (soluto con anti BSA) en contacto con la superficie del adsorbato. Sea  $\eta_s$  el índice de refracción del soluto y  $\eta_a$  el índice de refracción del adsorbato de espesor  $d$ . Entonces,  $\eta_{ef}$  es calculado tomando el promedio ponderado de los índices de refracción  $\eta_s$  y  $\eta_a$  dado por [36,37]

$$\eta_{ef} = \eta_s + (\eta_a - \eta_s) \frac{d}{\lambda}, \quad (11)$$

tal que el cambio en  $\eta_{ef}$  sobre la capa adsorbente de espesor  $d$  está dada por

$$\Delta\eta_{ef} = (\eta_a - \eta_s) \frac{d}{\lambda}, \quad (12)$$

y la respuesta de adsorción  $R$  del sensor SPR está dado por la diferencia del índice de refracción efectivo,  $\eta_{ef}$ , menos el índice de refracción del soluto,  $\eta_s$ , multiplicado por la magnitud de la pendiente local de calibración  $m$ , 4200 RIU (Refractive Index Unit) en nuestro caso,

$$R = m(\eta_{ef} - \eta_s). \quad (13)$$

Dado que el campo electromagnético decae exponencialmente dentro del soluto con una longitud de decaimiento característica  $I_d$  ( $\sim 25$  al 50 % de la longitud de la luz de incidencia  $\lambda$ ), y que la respuesta máxima del sensor es  $R_{max} = m(\eta_a - \eta_s)$ , es posible determinar el espesor efectivo

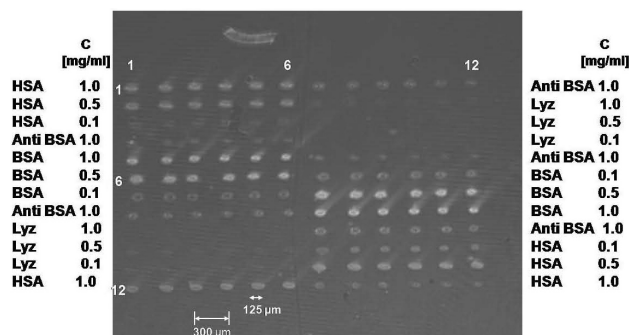


FIGURA 3. Interacción de anti BSA (1.0 mg/ml) con los micrositios activos de BSA, Lyz y HSA (0.1, 0.5 y 1.0 mg/ml), leídas mediante un SPRM.

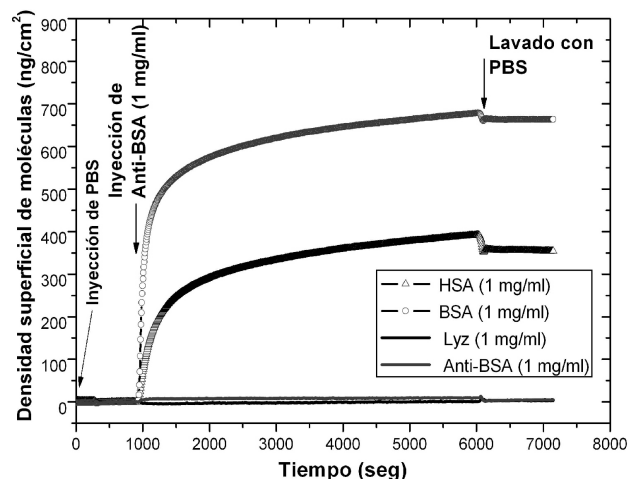


FIGURA 4. Ejemplo de curvas de interacción proteína-proteína medidas mediante un microscopio de resonancia de plasmones superficiales experimental. Se muestran las interacciones entre los sitios activos de HSA, BSA, Lyz y anti BSA (1.0 mg/ml) con solución saturada de anti BSA (1.0 mg/ml).

$d_{ef}$  tal que

$$d_{ef} = -\frac{I_d}{2} \ln\left(1 - \frac{R}{R_{max}}\right). \quad (14)$$

Para los casos donde  $d \ll I_d$ , podemos expandir el logaritmo natural en serie de Taylor tal que la Ec. (14) se reduce a

$$d_{ef} = -\frac{I_d}{2} \frac{R}{R_{max}} = \frac{I_d}{d} \frac{R}{m(\eta_a - \eta_s)}, \quad (15)$$

es decir, es posible determinar el espesor efectivo  $d_{ef}$  de una monocapa y/o una submonocapa del soluto (en nuestro caso, anti BSA) que se adsorbe en la capa del adsorbato en función de la respuesta del sensor  $R$ . Finalmente, la concentración superficial,  $\theta$  (moléculas por  $cm^2$ ), es calculada multiplicando el  $d_{ef}$  [Ec. (15)] por la densidad de bulto del adsorbato  $N$  (moléculas por  $cm^3$ ),

$$\theta\left(\frac{\text{moléculas}}{\text{cm}^2}\right) = d_{ef}(\text{cm}) \cdot N\left(\frac{\text{moléculas}}{\text{cm}^3}\right) \quad (16)$$

y  $N = \rho_a/PM \cdot N_A$ , donde  $\rho_a$  es la densidad de adsorbato (gr/ $cm^3$ ),  $PM$  es el peso molecular y  $N_A$  es el número de

Avogadro. En nuestro caso, las soluciones proteicas fueron diluidas en PBS tal que  $\rho_{proteína}=1.3 \text{ g/ml}$ ,  $\eta_{proteína}=1.57 \text{ RIU}$  y  $\eta_{PBS} = 1.336 \text{ RIU}$  [36].

#### 4. Resultados y discusión

La Fig. 3 muestra la interacción proteína-proteína de un microarreglo  $12 \times 12$ , fabricado mediante impresión por contacto, mediante la medición del cambio de intensidad de reflexión en cada uno de los spots con proteínas sonda. Se presenta la interacción de la proteína blanco (anti BSA, 1.0 mg/ml) con diferentes concentraciones de proteínas sonda: albúmina de suero de humano (HSA), Lisozima (Lyz), anti albúmina de suero de bovino (anti BSA) y albúmina de suero de bovino (BSA), medidas con un sistema experimental SPRM. Los elementos de las filas 1 a 3 (y columnas 1 a 6) corresponden a spots con concentraciones 1.0, 0.5 y 0.1 mg/ml de HSA, respectivamente; al igual que aquellos correspondientes a las filas 10 a 12 (y columnas 7 a 12) pero en concentraciones de 0.1, 0.5 y 1.0 mg/ml. Por su parte, la fila 12 (columnas 1 a 6) se fabricó imprimiendo HSA a 1.0 mg/ml. Los elementos del microarreglo que contienen spots de BSA, concentraciones 1.0, 0.5 y 0.1 mg/ml, se encuentran ubicados en las filas 5 a 7 (columnas 1 a 6) y filas 6 a 8 (columnas 7 a 12). Por su parte Lyz (1.0, 0.5 y 0.1 mg/ml) fue impresa en las filas 9 a 11 (columnas 1 a 6) y filas 2 a 4 (columnas 7 a 12). El control negativo de las interacciones estudiadas fue anti BSA (1.0 mg/ml), el cual se intercaló en las filas 4 y 8 (columnas 1 a 6), y filas 1, 5 y 9 (columnas 7 a 12). Se observa que los lugares activos con mayor concentración de proteínas sonda BSA y HSA (1.0 mg/ml) presentaron una mayor intensidad de reflexión IR (u.a.) que aquellos con concentraciones diluidas de estas mismas proteínas (0.5 y 0.1 mg/ml) cuando interactuaron las moléculas blanco anti BSA (1.0 mg/ml). Este comportamiento es el mismo para BSA y HSA en concentraciones de 0.5 mg/ml, dado que muestran mayor intensidad de reflexión que los spots a 0.1 mg/ml de ellas mismas. Comparativamente, los spots de BSA (1.0, 0.5 y 0.1 mg/ml) muestran mayor luminosidad que los correspondientes a HSA con las mismas concentraciones. Es decir, BSA es altamente reactiva con anti BSA (1.0 mg/ml) dado que presentan una interacción antígeno-anticuerpo con una constante de asociación  $K_a$  de  $3.5 \pm 0.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  [38], mientras que HSA presenta una constaste de asociación con anticuerpos monoclonales (i.e. anti BSA) del orden de  $5.5 \pm 1.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  [39]. Por su parte, Lyz (1.0, 0.5 y 0.1 mg/ml) no mostró afinidad específica con anti BSA (1.0 mg/ml), por lo que los correspondientes lugares activos muestran luminosidad casi nula. Finalmente, los controles negativos de anti BSA (1.0 mg/ml) presentaron mínima intensidad, atribuible a la débil interacción iónica entre moléculas de anti BSA.

La Fig. 4 muestra las curvas de tiempo de interacción  $t(\text{seg})$  contra densidad superficial de moléculas  $\theta$  ( $\text{ng}/\text{cm}^2$ ) de BSA, HSA, Lyz y anti BSA (1.0 mg/ml) con anti BSA

(1.0 mg/ml), que son las curvas típicas de cinética de interacción de las cuatro proteínas sonda ancladas con la concentración saturada (1.0 mg/ml) de la molécula blanco bajo estudio, medidas con el sistema SPRM. En el periodo 0-960 seg se inyectó PBS (1X, pH 7.2) para obtener la línea base. En el instante de 966 seg se inyectó anti BSA (60  $\mu$ l a 1.0 mg/ml) sobre el microarreglo, y se adquirió la evolución de la interacción hasta 6000 seg. Se observó que las curvas de interacción de los *spots* de BSA y HSA con anti BSA mostraron una razón de interacción inicial rápida debido a su alta afinidad en los primeros dos minutos a partir de la inyección del anticuerpo (966-1050 seg). De hecho, la pendiente asociada con la interacción anti BSA-BSA es más pronunciada que la correspondiente a anti BSA-HSA. Nuevamente, dicho comportamiento obedece a la mayor afinidad entre antígeno-anticuerpo de anti BSA y BSA, que a la correspondiente entre anti BSA y HSA [38,39]. De 1056 seg y hasta 6000 seg, se observa que la razón de interacción del blanco con las sondas gradualmente decrece hasta alcanzar el estado de equilibrio, es decir, la densidad superficial de proteínas sonda que forman una monocapa (de BSA y HSA) están interactuando covalentemente con las biomoléculas blanco de anti BSA. Para asegurar que no se toma en cuenta dentro de la lectura las interacciones de tipo iónico entre moléculas blanco anti BSA-anti BSA, es decir, para que no existan dobles o triples monocapas sobre los *spots* estudiados, es que se realiza un lavado con PBS (1X, pH 7.2) por 20 minutos a partir del tiempo de 6506 seg. Así, la respuesta *R* del sensor fue determinada calculando la diferencia de la intensidad de reflexión promediada en la región de lavado con PBS (alrededor de 7000 seg) menos la intensidad de reflexión antes de la inyección de la molécula blanco (línea base, 500 seg) (gráfica no mostrada). Los valores de *R* para BSA (1.0, 0.5 y 0.1 mg/ml) son de 45.58, 41.67 y 13.18 (u.a.), respectivamente; mientras que para HSA (1.0, 0.5 y 0.1 mg/ml) se encontraron valores de *R* de 24.32, 22.51 y 7.21 (u.a.). En el caso de la interacción de las proteínas Lyz y anti BSA (1.0 mg/ml) con anti BSA se observa que no se presentan curvas SPR de densidad de concentración superficial de moléculas, es decir, no se presenta afinidad entre Lyz o anti BSA con la molécula blanco anti BSA. Dichos resultados están de acuerdo con la observación de intensidades de reflexión presentadas en la Fig. 4. Para Lyz (1.0, 0.5 y 0.1 mg/ml), los valores de *R* determinados fueron 1.43, 1.18 y 0.9 (u.a.), respectivamente. En el caso de interacciones anti BSA-anti BSA la respuesta *R* del sensor fue de 0.53 (u.a.).

Por su parte, la Fig. 5 muestra las curvas típicas de cinética de interacción de las dos proteínas sonda que presentaron mayor afinidad con la molécula blanco en estudio, medidas con el sistema SPRM y en las tres diferentes concentraciones que fueron impresas (1.0, 0.5 y 0.1 mg/ml). En la Fig. 5a se presentan las curvas de tiempo de interacción (seg) contra densidad de concentración superficial de moléculas ( $\text{ng}/\text{cm}^2$ ) de BSA con anti BSA (1.0 mg/ml), mientras que la Fig. 5b muestra las correspondientes a la interacción entre HSA y anti BSA (1.0 mg/ml). Para ambos casos, en el

TABLE I.

Concentración proteína blanco (1.0 mg/ml)	Concentración proteína sonda (mg/ml)	Densidad de concentración superficial proteína-proteína ( $\text{ng}/\text{cm}^2$ )	
Anti BSA	BSA	1.0	663.42
		0.5	633.34
		0.1	200.57
	HSA	1.0	355.52
		0.5	333.39
		0.1	77.38
	Lyz	1.0	21.0
		0.5	17.3
		0.1	14.1
Anti BSA	1.0	11.2	

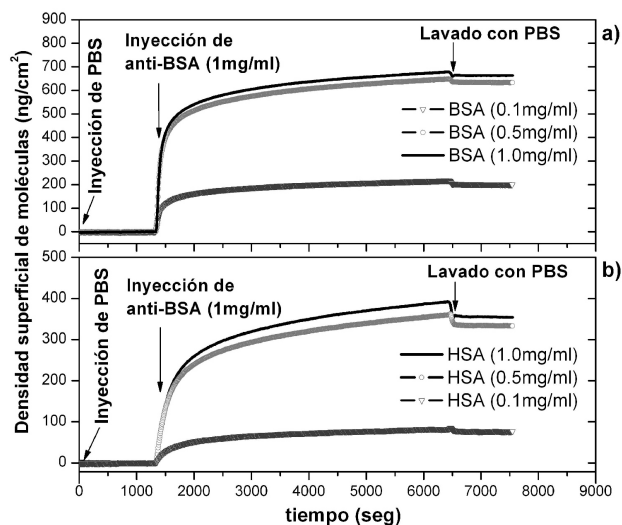


FIGURA 5. Curvas SPR de la interacción de soluciones de anti BSA (1.0 mg/ml) con los elementos de HSA y BSA (1.0, 0.5, 0.1 mg/ml).

periodo 0-960 seg, se inyectó PBS (1X, pH 7.2) para obtener la línea base, y a 6506 seg se realizó el lavado con PBS para, nuevamente, asegurar la ruptura de interacciones iónicas entre monocapas contiguas de la solución de anti BSA inyectada durante el experimento de lectura. Se observa que la razón entre las respuestas *R* del sensor para la interacción anti BSA-BSA y anti BSA-HSA (1.0, 0.5 y 0.1 mg/ml) son de 53.3, 54 y 54.7 %. Es decir, la interacción biomolecular entre anti BSA y HSA presentan alrededor de la mitad de la concentración superficial que las interacciones entre anti BSA y BSA, en concordancia con los resultados de Chiem *et al.*, y Sakai *et al.* [38,39]. Finalmente, sustituyendo las respuestas del sensor *R* en Ec. (16) se determinaron las densidades de concentración superficial promedio de enlace de anti BSA (1.0 mg/ml) sobre los *spots* de BSA (1.0, 0.5 y 0.1 mg/ml) dando valores de 663.4, 633.3 y 200.6  $\text{ng}/\text{cm}^2$ , respectivamente, mientras que para HSA (1.0, 0.5 y 0.1 mg/ml) fueron de 355.5, 333.4 y 77.4.

La Tabla I muestra la cuantificación de la interacción proteína-proteína obtenida mediante SPRM para soluciones de anti BSA a 1.0 mg/ml con *spots* de BSA, HSA, Lyz y anti BSA a 1.0, 0.5 y 0.1 mg/ml. Se observa una relación 1.88 a 1 entre la concentración superficial ( $\text{ng}/\text{cm}^2$ ) entre anti BSA-BSA (1.0 mg/ml) y anti BSA-HSA (1.0 mg/ml). Por su parte, las relaciones de concentraciones para los *spots* de BSA y HSA con concentraciones de 0.5 mg/ml presentaron la misma relación 1.89 a 1 cuando la solución de anti BSA (1.0 mg/ml) irrigó dichos spots. Es decir, para el caso de soluciones saturadas de proteínas (1.0 mg/ml) o casi saturadas (0.5 mg/ml) se observa prácticamente la misma razón entre sus concentraciones superficiales, en concordancia con los reportes de constantes de afinidad entre anti BSA con las proteínas BSA y HSA obtenidos por otras técnicas y otros autores [38,39]. Por su parte, para el caso de spots fabricados con soluciones diluidas de estas mismas proteínas (0.1 mg/ml), se observó una relación 2.59 a 1 durante la interacción con anti BSA (1.0 mg/ml). Este proceso se explica dado que las proteínas BSA y HSA son 76 % homólogas a nivel de aminoácidos, por lo que se espera que algunos anticuerpos reconozcan ambas proteínas [40].

## 5. Conclusiones

Se imprimieron microarreglos  $12 \times 12$  de proteínas sonda HSA, BSA, Lyz (1.0, 0.5 y 0.1 mg/ml) y anti BSA (1.0 mg/ml) sobre sustratos de oro planos aminofuncionalizados mediante un sistema de impresión por contacto. Se aplicó un sistema lector óptico basado en resonancia de plasmones superficiales, en modalidad de microscopio, para cuantificar las interacciones biomoleculares entre el microarreglo de proteínas sonda y la proteína blanco anti BSA (1.0 mg/ml). Las mediciones de las interacciones proteína-proteína fueron libres de marcaje fluorescente, *in situ* y en tiempo real. Los límites de detección alcanzados con el sistema SPRM fueron del orden de  $\text{ng}/\text{cm}^2$ .

## Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por CONACyT y COVECyT en partes iguales mediante los proyectos 68123 (VA), 60548 (VA) y 50603 (MLM).

1. M. Schena, *Microarray Analysis* (John Wiley & Sons Inc, New Jersey, 2003).
2. <http://www.affymetrix.com/index.affx>
3. J.S. Daniels and N. Pourmand, *Electroanalysis* **19** (2007) 1239.
4. E.F. Petricoin III *et al.*, *The Lancet* **359** (2002) 572.
5. E. Segal, N. Friedman, N. Kaminski, A. Regev and D. Koller, *Nature Gen.* **27** (2005) s38.
6. G.J. Gordon *et al.*, *Cancer Res.* **62** (2002) 4963.
7. S. Varambally *et al.*, *Cancer Cell* **8** (2005) 393.
8. X. Li *et al.*, *Curr. Genomics* **9**(2008) 466.
9. E.A. Slodkowska and J.S. Ross, *Expert Rev. Mol. Diagn.* **9** (2009) 417.
10. S.P. Lal, R.I. Christopherson and C.G. dos Remedios, *Drug Discovery Today* **7** (2002), S143.
11. R. Chen, S. Pan, T.A. Brentnall and R. Aebersold, *Mol. Cell. Proteomics* **4** (2005) 523.
12. N. Ramachandran *et al.*, *Science* **305** (2004) 86.
13. J.G. Albeck *et al.*, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7** (2006) 803.
14. L. Hood, J.R. Heath, M.E. Phelps and B. Lin, *Science* **306** (2004) 640.
15. N. Christodoulides *et al.*, *Clin. Chem.* **51** (2005) 2391.
16. R.B. Stoughton, *Annu. Rev. Biochem.* **74** (2005) 53.
17. C.M. Perou *et al.*, *Nature* **406** (2000) 747.
18. D. Eisenberg, E.M. Marcotte, I. Xenarios and T.O. Yeates, *Nature* **405** (2000) 823.
19. P. Angenendt, J. Glokler, D. Murphy, H. Lehrach and J. Cahill Dolores, *Anal. Biochem.* **309** (2002) 253.
20. H. Zhu and M. Snyder, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7** (2003) 55.
21. D. Kambhampati, in: *Protein Microarray Technology*, Ed. D.Kambhampati, (Wiley VCH, Weinheim, 2003).
22. P. Gong, G.M. Harbersand and D.W. Grainger, *Anal. Chem.* **78** (2006) 2342.
23. A.B. Steel, R.L. Levicky, T.M. Herneand and M.J.Tarlov, *Biophys. J.* **79** (2000) 975.
24. M. Pawlak *et al.*, *Proteomics* **2** (2002) 383.
25. G. Wu *et al.*, *Nature Biotechnol.* **19** (2001) 856.
26. H.J. Lee, D. Nedelkov and R.M. Corn, *Anal. Chem.* **78** (2006) 6504.
27. T.T. Goodrich, A.W. Wark, R.M. Corn and H.J. Lee, *Methods Mol. Biol.* **328** (2006) 113.
28. P. Stenlund, G.J. Babcock, J. Sodroski and D.G. Myszka, *Anal. Biochem.* **316** (2003) 243.
29. J. Homola, *Anal. Bioanal. Chem.* **377** (2003) 528.
30. W. Knoll, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **49** (1998) 569.
31. J. Homola, S.S. Yee, and D. Myszka, *Surface plasmon biosensors*, in *Optical Biosensors: Present and Future*, (Elsevier Science, San Diego, CA, 2002).
32. J. Homola, *Surface Plasmon Resonance Biosensors for Food Safety*, in *Optical Sensors: Industrial, Environmental and Diagnostic Applications*, (Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 2004).
33. J.S. Shumaker-Parry, R. Aebersold, and C.T. Campbell, *Anal. Chem.* **76** (2004) 2071.
34. C.Y. Lee *et al.*, *Anal. Chem.* **78** (2006) 3316.

35. N. Xia, J.S. Shumaker-Parry, M.H. Zareie, C.T. Campbell, and D.G. Castner, *Langmuir* **20** (2004) 3710.
36. L.S. Jung, C.T. Campbell, T.M. Chinowsky, M.N. Mar, and S.S. Yee, *Langmuir* **14** (1998) 5636.
37. C.T. Campbell and G. Kim, *Biomaterials* **28** (2007) 2380.
38. N.H. Chiem and D.J. Harrison, *Electrophoresis* **19** (1998) 3040.
39. G. Sakai, T. Saiki, T. Uda, N. Miura, and N. Yamazoe, *Sens.Actuators, B* **42** (1997) 89.
40. R.M.T. de Wildt, C.R. Mundy, B.D. Gorick, and I.M. Tomlinson, *Nat. Biotech.* **18** (2000) 989.