




Desenvolupament d'una plataforma universal per a la multidetecció mitjançant la codificació espacial de cadenes d'ADN

Núria Tort Escribà

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



**Desenvolupament d'una plataforma universal
per a la multidetecció mitjançant la codificació
espacial de cadenes d'ADN**

Núria Tort Escribà

Barcelona 2013

Desenvolupament d'una plataforma universal per a la multidetecció mitjançant la codificació espacial de cadenaes d'ADN

Memòria per optar al grau de **Doctor** per la **Universitat de Barcelona** presentada per:

Núria Tort Escribà

Barcelona, Setembre 2013

Universitat de Barcelona
Facultat de Química - Departament de Química Analítica
Programa de Doctorat de Química Analítica del Medi Ambient i la Pol·lució

Desenvolupament d'una plataforma universal per a la multidetecció mitjançant la codificació espacial de cadenes d'ADN

Memòria per optar al grau de Doctor per la Universitat de Barcelona presentada per:

Núria Tort Escribà

Directors:

Prof. M^a Pilar Marco Colás
Dept. Nanotecnologia Química i
Biomolecular, IQAC-CSIC

Dr. J.-Pablo Salvador Vico
Àrea de Nanomedicina, CIBER-BBN

Tutor:

Prof. Mercè Granados
Dept. Química Analítica, Facultat de Química, UB

La present tesi doctoral, que porta per títol: **Desenvolupament d'una plataforma universal per a la multidetecció mitjançant la codificació espacial de cadenes d'ADN**, ha estat realitzada en el grup de Receptors Moleculars Aplicats (AMRg) de l'Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC) del Consell Superior d'Investigacions Científiques (CSIC) i del *Centro de Investigación Biomédica en Red de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina* (CIBER-BBN), sota la direcció de la Professora M.-Pilar Marco Colás i del Doctor J.-Pablo Salvador Vico.



Aquesta tesi doctoral s'ha realitzat gràcies a les següents ajudes institucionals:

Ministerio de Educación y Ciencia (MEC), Madrid.

Projectes: “Desenvolupament de plataformes nanobio-analítiques basades en el reconeixement molecular mitjançant detecció òptica i/o electrònica (*NanoBioMol*)” (NAN2004-09415-C05-02), i “Desenvolupament d'un dispositiu immunosensor basat en la ressonància del plasmó localitzat de nanopartícules de metalls nobles per a la detecció de substàncies prohibides a l'esport (*d-Watch Array*)” (DEP200773224C0301).

Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR), Barcelona.

Concessió de la beca pre-doctoral per a la formació de personal investigador (FI-DGR 2010, Modalitat B).

Agraïments

En primer lloc, m'agradaria agrair a l'Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC-CSIC), per poder disposar en tot moment de les seves infraestructures, al 'Centro de Investigación Biomédica en Red de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina' (CIBER-BBN) per atorgar-me la beca per realitzar l'estada pre-doctoral a Alemanya i a la Universitat de Barcelona (UB) pel seu recolzament acadèmic.

A continuació, vull donar les gràcies de forma general al grup d'investigació Receptors Moleculars Aplicats (AMRg), que ara ha passat a dir-se Nb4D, i a la majoria de les persones que n'han format part durant els meus anys de tesi. Però vull donar especialment les gràcies a la Pilar i al Francisco, per la confiança dipositada en mi ara farà 8 anys que em va permetre entrar dins del món de la investigació. Pilar, moltes gràcies per tots els coneixements que m'has transmès i totes les hores invertides en mi, espero que et sentis orgullosa. Francisco, no t'imagines el greu que em sap saber que no hi seràs més, tu em vas animar a començar i no em puc creure que no em veuràs acabar. Roger, a tu et dedico un paràgraf més endavant, perquè t'ho mereixes. Pablo, moltes gràcies per ensenyar-me i aguantar-me sense perdre la paciència, tema xungo, ho sé! Però per ser la nostra primera vegada crec que no ho vam fer gens malament :-). Pasquí, gràcies per transmetre'm el teu esperit treballador amb tanta alegria e il·lusió. Raquel, gràcies per ser-hi sempre des del principi, em vas ajudar moltíssim a entrar en el grup. Javi, Xavi i Dani, gràcies per ser l'ànima del laboratori i uns bons professors no oficials; he après molt de vosaltres nois! Fátima, gràcies per venir al laboratori, em vas donar aire fresc, tranquil·litat i molt bona companyia i amistat. I Glòria i Carme, gràcies a les dues perquè amb vosaltres vaig tornar a treballar a gust i a riure, cosa no poc important al final d'una tesi! Amb tots vosaltres he après moltíssim, mentre m'ho passava bé, i això no té preu. Gràcies!

Finalment, aquesta tesi la dedico a tota la meva família. Amb especial èmfasi al meu pare, que sempre li ha fet mola il·lusió això de poder fardar que tenia una filla fent el doctorat, a la meva mare que sempre ha cregut que la tesi era la culpa de tots els meus mals (jejeje, ara ho veurem!), però que segur que estarà contenta per mi, i a la Pepi, que segurament pel fet d'haver-ho viscut prèviament, i de més a prop, és la que més sabia de què anava la història. I molt, molt, moooooolt especialment al Gerard i al Roger. Gerard, perquè estar amb tu és tan bonic que fa que tota la resta no tingui importància, i això m'ha ajudat a desconnectar moltíssim quan ho he necessitat. I Roger, perquè com tu dius aquesta tesi també és en part teva... encara que més aviat per lo que l'has patit que per lo bo... però et prometo que no n'hi haurà cap altra! No va, ara de veritat; aquesta tesi no l'hauria fet segurament si no t'hagués conegut, però seguríssimament no l'hauria acabat sense el teu suport, paciència i comprensió. Sempre hi has estat per mi i jo sempre hi seré per tu. Comencem una nova etapa! Us estimo.

Índex

Agraïments	i
Índex.....	i
Abreviatures, Acrònims i Símbols	v
Resum.....	ix
1. OBJECTIUS I ESTRUCTURA DE LA TESI	1
1.1 Objectius	1
1.2 Projectes d'investigació relacionats	2
1.3 Estructura de la tesi	3
2. INTRODUCCIÓ.....	7
2.1 Tècniques immunoquímiques	7
2.1.1 Immunoassaigs	9
2.1.1.1 Assaig d'immunoabsorció lligat a enzim (ELISA)	10
2.1.1.2 Assaig de tira.....	11
2.2 Biosensors	12
2.2.1 Immunosensors òptics basats en la ressonància del plasmó superficial.....	14
2.2.1.1 Immunosensors de ressonància del plasmó superficial per imatge	17
2.2.1.2 Immunosensors de ressonància del plasmó superficial localitzat	18
2.3 Micromatrius (<i>Microarrays</i>)	22
2.3.1 Chips d'ADN (<i>DNA Microarrays</i>)	24
2.3.2 Chips de proteïnes (<i>Protein Microarrays</i>).....	25
2.3.3 Estratègia DDI (<i>DNA-directed Immobilization</i>)	27
3. DESENVOLUPAMENT D'UN ELISA MULTIANALIT PER A LA DETECCIÓ D'HORMONES ANABOLITZANTS.....	29
3.1 Precedents i Objectius del capítol	29
3.1.1 Les hormones anabolitzants.....	29
3.1.1.1 Aplicacions de les hormones anabolitzants.....	30
3.1.1.2 Efectes adversos en la salut.....	32
3.1.1.3 El metabolisme dels AAS	32
3.1.1.4 Regulació	33
3.1.1.5 Sistemes de detecció d'AAS: Tècniques cromatogràfiques	34
3.1.1.6 Sistemes de detecció d'AAS: Tècniques immunoquímiques	35
3.2 Resultats i Discussió	38
3.2.1 Estudis de viabilitat dels immunoreactius seleccionats	40
3.2.2 Desenvolupament de l'ELISA multianalit per AAS.....	43
3.2.3 Especificitat de l'assaig multianalit	45
3.2.3.1 Anàlisi quimiomètric: estudi preliminar.....	46
3.2.4 Anàlisi de mostres biològiques	47
3.2.5 Publicacions relacionades	53

3.2.5.1	Article 1: <i>Multiplexed Immunoassay to Detect Anabolic Androgenic Steroids in Human Serum</i> . N. Tort, J.P. Salvador and M.P. Marco. <i>Analytical and Bioanalytical Chemistry</i> , 2012.	53
3.2.5.2	Article 2: <i>Preliminary study for simultaneous detection and quantification of androgenic anabolic steroids using ELISA and pattern recognition techniques</i> . D. Calvo, N. Tort, J.P. Salvador, M.P. Marco, F. Centi and S. Marco. <i>Analyst</i> , 2011.	55
3.3	Resum de les aportacions principals del capítol	57
4.	MARCATGE D'IMMUNOREACTIUS I CARACTERITZACIÓ	59
4.1	Precedents i Objectius del capítol	59
4.1.1	Els fluoròfors.....	60
4.1.2	Fluoroimmunoassaigs (FIAs).....	64
4.1.3	L'ADN 65	
4.2	Resultats i Discussió	68
4.2.1	Preparació i avaluació d'immunoreactius fluorescents per la determinació d'AAS	68
4.2.1.1	Conjugació d'anticossos a fluoresceïna	68
4.2.1.2	Desenvolupament de FLISAs per a la detecció d'AAS	71
4.2.2	Preparació de sondes haptè-oligonucleòtid	80
4.2.3	Publicació relacionada.....	85
4.2.3.1	Article 3: <i>Synthesis of steroid-oligonucleotide conjugates for a DNA site-encoded SPR immunosensor</i> . N. Tort, J.P. Salvador, A. Avinyó, R. Eritja, J. Comelles, E. Martínez, J. Samitier and M.P. Marco. <i>Bioconjugate Chemistry</i> , 2012	85
4.3	Resum de les aportacions principals del capítol	87
5.	DESENVOLUPAMENT D'UN MICROARRAY D'HAPTENS.....	89
5.1	Precedents i objectius del capítol.....	89
5.1.1	Mètodes de preparació de microarrays d'ADN	90
5.1.1.1	Síntesi en la superfície	90
5.1.1.2	Deposició de cadenes d'oligonucleòtids modificades	91
5.1.1.3	Captura en funció del comportament electrònic	92
5.1.2	Mètodes d'immobilització d'oligonucleòtids sobre superfícies sòlides	92
5.1.2.1	Unió per adsorció.....	93
5.1.2.2	Unió per afinitat.....	93
5.1.2.3	Unió per enllaç covalent	94
5.2	Resultats i Discussió	95
5.2.1	Resultats preliminars	96
5.2.2	Detecció individual d'AAS en format <i>microarray</i> fluorescent	97
5.2.3	Detecció multiplexada d'AAS en format <i>microarray</i> fluorescent.....	100
5.2.3.1	Estudi semi-quantitatiu	101
5.2.3.2	Càlcul del límit de decisió (CC α) i la capacitat de detecció (CC β)	102
5.2.4	Publicació relacionada.....	103

5.2.4.1	Article 4: <i>Fluorescence site-encoded DNA addressable hapten microarray for anabolic androgenic steroids</i> . N. Tort, J.P. Salvador, R. Eritja, M. Poch, E. Martínez, J. Samitier and M.P. Marco. <i>Trends in Analytical Chemistry</i> , 2009	103
5.3	Resum de les aportacions principals del capítol.....	105
6.	PREPARACIÓ DE SUPERFÍCIES NANOESTRUCTURADES MITJANÇANT L'ESTRATÈGIA DDI	107
6.1	Precedents i objectius del capítol	107
6.1.1	Fabricació de superfícies nanoestructurades de metalls nobles	108
6.2	Resultats i Discussió	109
6.2.1	Publicació relacionada	117
6.2.1.1	Article 5: <i>Preparation of multiplexed plasmonic nanostructured surfaces by assembling DNA-Gold biohybrid nanoparticles</i> . N. Tort, J.P. Salvador and M.P. Marco.....	117
6.3	Resum de les aportacions principals del capítol.....	143
7.	DESENVOLUPAMENT D'UN MICROARRAY PER A LA DIFERENCIACIÓ CEL·LULAR.....	145
7.1	Precedents i Objectius del capítol	145
7.1.1	Diferenciació cel·lular en <i>microarrays</i>	145
7.2	Resultats i Discussió	147
7.2.1	Síntesi de bioconjugats estreptavidina-ADN.....	147
7.2.2	<i>Microarray</i> cel·lular	148
7.2.2.1	Adhesió i cultiu cel·lular	150
7.2.3	Sistema microfluidic.....	153
7.2.3.1	Adhesió cel·lular amb el dispositiu microfluídic	155
7.2.4	Publicació relacionada.....	159
7.2.4.1	Article 6: <i>Capture and Culturing of Living Cells on Microstructured DNA Substrates</i> .S. Reisewitz, H. Schröder, N. Tort, K.A. Edwards, A.J. Baeumer and C.M. Niemeyer. <i>Small</i> , 2010 ...	159
7.3	Resum de les aportacions principals del capítol.....	161
8.	CONCLUSIONS	163
9.	BIBLIOGRAFIA.....	165
ANNEX 1:	Capítols de llibre	181
	Capítol 1: <i>Applications of immunochemical techniques to the analysis of aquatic environments</i> . J. Adrián, F. Fernández, A. Muriano, R. Obregón, J. Ramón-Azcon, N. Tort and M.P. Marco. <i>Analytical Measurements in Aquatic Environments</i> , Taylor & Francis group, 2010	181
	Capítol 2: <i>Recent Advances on Biosensors for Pharmaceuticals and Emerging Contaminants Based on Novel Micro and Nanotechnology Approaches</i> . J. Adrián, F. Fernández, A. Muriano, R. Obregón, J. Ramón-Azcon, N. Tort and M.P. Marco. <i>The Handbook of Environmental Chemistry, Biosensors for environmental Monitoring</i> , Springer, 2009.....	183
ANNEX 2:	Materials i Mètodes (Capítol 4)	185

Abreviatures, Acrònims i Símbols

λ	Longitud d'ona
AAS	Esteroides anabolitzants androgènics (<i>Anabolic-Androgenic Steroids</i>)
Abs	Absorbància
Ac	Anticòs
ADN	Àcid desoxiribonucleic
Ag	Antigen
Amàx	Absorbància màxima
Amín	Absorbància mínima
Anti-IgG	Immunoglobulines de tipus G d'una espècie animal contra immunoglobulines de tipus G d'una altra espècie animal
As	Antisèrum
AT	Antigen de tapissat
B	Boldenona
BSA	Albúmina de sèrum boví (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
COI	Comitè Olímpic Internacional
CE	Comunitat Europea
CCα	Límit de decisió
CCβ	Capacitat de detecció
DDI	Immobilització a través de la hibridació de cadenes d'ADN complementàries (DNA-directed Immobilization)
DMF	N,N-Dimetilformamida
ELISA	Assaig d'immunoabsorció lligat a un enzim (<i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i>)
EtOH	Etanol
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FIA	Fluoroimmunoassaig
FITC	Isotiocianat de fluoresceïna, isòmer I (<i>Fluorescein isothiocyanate, isomer I</i>)
FLISA	Assaig d'immunoabsorció lligat a un fluoròfor (<i>Fluorescent Linked ImmunoSorbent Assay</i>)
GC	Cromatografia de gasos (<i>Gas Chromatography</i>)
GC-MS	Cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses
HCH	Hemocianina de cranc Cassola (<i>Horseshoe crab hemocyanin</i>)
HPLC	Cromatografia líquida d'alta resolució (<i>High Performance Liquid</i>

	<i>Chromatography</i>)
HPLC-MS	HPLC acoblat a espectrometria de masses
HPLC-UV	HPLC amb detector de llum ultravioleta
HRP	Peroxidasa de rave picant (<i>HorseRadish Peroxidase</i>)
IA	Immunoassaig
IAC	Cromatografia d'immunoafinitat (<i>Immunoaffinity chromatography</i>)
IC_{20, 50, 80 o 90}	Concentració d'analit necessària per inhibir un assaig immunoenzimàtic competitiu i obtenir el 20, 50, 80, o 90%, respectivament, de l'absorbància màxima
IgG	Immunoglobulines de tipus G
IS	Immunosorbent
K_a	constant d'afinitat
LOD	Límit de detecció
LOQ	Límit de quantificació
LSPR	Ressonància del plasmó superficial localitzat
MAc	Anticòs monoclonal
MALDI-TOF-MS	Espectrometria de masses d'ionització per desorció per làser assistida per matriu i detecció de temps en vol. (<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-Of-Flight Mass Spectrometer</i>)
MB	Metilboldenona
MMT	Monometoxitritil
MRPL	Límit mínim de funcionament requerit (<i>Minimum required performance limit</i>)
MS	Espectrometria de masses
NHS	N-hidroxisuccinimida
PAc	Anticòs policlonal
PEG	Polietilenglicol
rpm	Revolucions per minut
S/N	Relació senyal/soroll
SPE	Extracció en fase sòlida (<i>Solid Phase Extraction</i>)
SPR	Ressonància del plasmó superficial
SPRi	Ressonància del plasmó superficial per imatge
ST	Estanozolol
STV	Estreptavidina
THG	Tetrahidrogestrinona
T_m	Temperatura de fusió

TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
TRITC	Isotiocianat de tetrametilrodamina
UV	Ultravioleta
UV-vis	Ultravioleta-visible
WADA	Agència Mundial de Control Antidopatge (<i>World Antidoping Agency</i>)

Resum

Aquesta tesi ha estat focalitzada en demostrar la possibilitat de crear plataformes de diagnòstic, **multiplexades i universals**, a través de la hibridació de cadenes d'oligonucleòtids complementàries (*DNA-directed immobilization*, DDI). La **multiplexació** és possible degut al gran nombre de cadenes d'oligonucleòtids diferents que es poden crear al combinar les 4 bases nitrogenades de l'ADN (A, T, C i G), permetent detectar simultàniament tants analits diferents com cadenes d'oligonucleòtids es disposi. La **universalitat**, be donada per la possibilitat de regenerar una superfície amb una simple etapa de deshibridació, i reutilitzar-la per a la detecció d'analits de diferent naturalesa. Concretament, s'ha demostrat la possibilitat de crear *microarrays* d'haptens, emprant *microarrays* d'ADN i aprofitant l'especificitat de la reacció d'hibridació entre les cadenes d'oligonucleòtids immobilitzades en la superfície i les cadenes d'oligonucleòtids unides covalentment als diferents haptens. Com a prova de concepte, s'ha desenvolupat un *microarray* d'haptens esteroïdals per a l'anàlisi quantitatiu i multiplexat d'hormones anabolitzants amb detecció fluorescent. També s'ha demostrat la possibilitat d'utilitzar aquesta estratègia d'immobilització pel desenvolupament d'immunosensors òptics multiplexats basats en la ressonància del plasmó superficial per imatge (SPR*i*), evitant així la necessitat d'emprar marcadors per tal d'obtenir el senyal. Per altra banda, s'ha demostrat la universalitat de l'estratègia DDI, al emprar un *microarray* d'ADN per a la creació de superfícies nanoestructurades, posteriorment emprades com a transductors en immunosensors basats en la ressonància del plasmó superficial localitzat (LSPR). Concretament, cadenes d'oligonucleòtids han estat unides a nanopartícules d'or de diferents mides, que després han estat immobilitzades de forma controlada i selectiva sobre la plataforma, a través de la hibridació entre les cadenes d'oligonucleòtids complementàries. I finalment, també s'ha demostrat l'aplicabilitat de l'estratègia DDI per a la immobilització de proteïnes, al crear *microarrays* d'anticossos, en format estàtic i en flux, que han estat emprats per a la diferenciació de cèl·lules segons les proteïnes expressades en la membrana cel·lular.

1. OBJECTIUS I ESTRUCTURA DE LA TESI

1.1 Objectius

L'objectiu principal d'aquesta tesi doctoral ha estat demostrar la possibilitat de desenvolupar plataformes de diagnòstic multiplexades i de caràcter universal amb detecció òptica. Com a prova de concepte, s'escolliren les hormones anabolitzants com analits diana, ja que en el grup es disposava dels immunoreactius necessaris per a la seva detecció.

Per assolir aquest objectiu es varen marcar inicialment una sèrie d'objectius específics:

- Establir un protocol immunoquímic multiplexat per a la detecció d'hormones anabolitzants en matrius reals.
- Demostrar la possibilitat d'emprar l'estratègia DDI (*DNA-directed immobilization*), que consisteix en la immobilització de reactius en superfícies sòlides a través de la hibridació de cadenes d'oligonucleòtids complementàries, per desenvolupar una plataforma de diagnòstic que permetés la detecció immunoquímica de molècules de baix pes molecular, com són les hormones anabolitzants. Això requeria, preparar bioconjugats oligonucleòtid-haptè i anticòs-fluoròfor, així com, avaluar la seva biofuncionalitat i el seu potencial ús en la plataforma sensora.
- Demostrar que l'aproximació DDI també pot ser emprada per la preparació de superfícies nanoestructurades biofuncionals amb propietats plasmòniques; així com l'ús d'aquestes superfícies com a transductors en sensors òptics basats en el principi físic de la ressonància del plasmó localitzat (LSPR). Això requeria, desenvolupar una metodologia per la

preparació de conjugats biohíbrids formats per nanopartícules d'or i cadenes d'oligonucleòtids.

1.2 Projectes d'investigació relacionats

El treball que es presenta a continuació s'ha desenvolupat principalment en el context de dos projectes d'investigació consorciats, amb la participació d'altres grups d'investigació nacionals, ambdós projectes finançats per l'aleshores Ministerio de Educación y Ciencia (MEC).

•**Títol del projecte:** Desenvolupament de plataformes nanobio-analítiques basades en el reconeixement molecular mitjançant detecció òptica i/o electrònica (*NanoBioMol*).

Entitat finançadora: MEC. Acció Estratègica de Nanotecnologia, NAN2004-09415-C05-02.

Duració: Febrer 2006 - Febrer 2009

Investigador Principal: Prof. M.-Pilar Marco (IQAC-CSIC)

Altres grups d'investigació participants: Prof. Ramón Eritja (IQAC-CSIC); Prof. Josep Samitier (IBEC); Dr. Iraidia Loinaz (CIDETEC-IK4); Prof. Teresa Martínez (ICB-CSIC)

Coordinador: Prof. Josep Samitier (IBEC)

•**Títol del projecte:** Desenvolupament d'un dispositiu immunosensor basat en la ressonància del plasmó localitzat de nanopartícules de metalls nobles per a la detecció de substàncies prohibides a l'esport (*d-Watch Array*).

Entitat finançadora: MEC. Acció Estratègica sobre l'Esport i l'Activitat Física, DEP200773224C0301

Duració: Novembre 2007 - Novembre 2010

Investigador Principal: Prof. M^a Pilar Marco (IQAC-CSIC)

Altres grups d'investigació participants: Dr. Rosa Ventura (IMIM), Dr. Gonçal Badenes (ICFO)

Coordinador: Prof. M.-Pilar Marco (IQAC-CSIC)

Els dos projectes d'investigació estaven relacionats entre sí ja que en ambdós casos es pretenia el desenvolupament de nous dispositius d'anàlisi basats en la multidetecció fent ús d'anticossos com elements de bioreconeixement. El primer projecte, NanoBioMol, tenia com a objectiu principal el desenvolupament d'una plataforma immunoquímica multiplexada universal, és a dir, que permetés la detecció de varis analits simultàniament, però que a més, la mateixa plataforma pogués ser emprada per a la detecció d'analits de diferent naturalesa, per exemple, antibiòtics, hormones, pesticides, proteïnes, bacteries o cèl·lules. L'estratègia plantejada es basava en combinar els *microarrays* d'ADN amb els bioreceptors o immunoreactius units a cadenes d'oligonucleòtids amb seqüències complementaries a les de l'ADN immobilitzat a la superfície del *microarray*, de tal manera que mitjançant una reacció d'hibridació s'immobilitzarien selectivament els bioreactius

necessaris a la plataforma de detecció. Aquesta plataforma, degut a la naturalesa de l'ADN, podria ser fàcilment regenerable, i es podria tornar a fer servir per immobilitzar el mateixos bioreactius o qualsevol altre combinació de bioreactius que desitgèssim, en funció de l'aplicació requerida. Aquesta aproximació, coneguda com DDI (*DNA-directed immobilization*), s'explicarà amb més detall en el capítol 3. En aquest projecte el nostre grup d'investigació ha treballat en col·laboració amb 2 dels 5 grups integrants del projecte; el grup de nanobioenginyeria de l'Institut de Bioenginyeria de Catalunya (IBEC) dirigit pel Prof. Josep Samitier i el grup de química d'àcids nucleics de l'Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC) dirigit pel Prof. Ramón Eritja.

Per altra banda, el segon projecte (*d-Watch Array*) més enfocat en l'àmbit esportiu, tenia com a principal finalitat la de presentar una alternativa eficaç e innovadora pel control antidopatge. L'objectiu principal era desenvolupar un immunosensor òptic per a la detecció de substàncies amb activitat anabolitzant, prohibides en l'esport, basat en la ressonància del plasmó localitzat que presenten les nanopartícules de metalls nobles. En aquest projecte el nostre grup d'investigació ha col·laborat amb el Dr. Gonçal Badenes del grup de dispositius nanofotònics de l'Institut de Ciències Fotòniques (ICFO) i amb la Dr. Rosa Ventura del laboratori de control anti-dopatge de Barcelona de l'Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM).

1.3 Estructura de la tesi

Per tal d'assolir l'objectiu principal d'aquesta tesi doctoral s'ha volgut aprofitar els avantatges de treballar conjuntament amb dues de les biomolècules més emprades en el camp de la nanobiotecnologia pel desenvolupament de nous dispositius d'anàlisi, l'anticòs i l'àcid desoxiribonucleic (ADN). L'anticòs ha estat en tot moment el bioreceptor específic, escollit degut a la possibilitat de produir anticossos per una gran varietat d'analits amb constants d'afinitat molt elevades, de l'ordre de 10^{10} , mentre que l'ADN ha estat escollit com a excel·lent direccionador d'altres molècules, per la seva elevada constant d'afinitat de l'ordre de 10^{12} i elevada resistència a canvis de pH i temperatura. I com ja s'ha comentat anteriorment, s'han escollit com analits diana les hormones anabolitzants, ja que es tracta d'una família de compostos considerada un perill per a la salut pública, degut al seu ús fraudulent per augmentar el rendiment físic dels esportistes, així com en suplementos alimentaris usats en granges per augmentar la producció de carn destinada al consum humà.

La present tesi doctoral ha implicat un alt grau de col·laboració amb altres grups d'investigació. Els immunoreactius per a la detecció d'hormones anabolitzants emprats en aquesta tesi es trobaven disponibles al nostre grup d'investigació. Les cadenes d'oligonucleòtids utilitzades han estat proporcionades pel grup d'investigació Química d'Àcids Nucleics del Prof. Ramón Eritja, amb qui també s'ha col·laborat per la preparació dels bioconjugats oligo-haptè. I finalment, també ha estat

necessària la col·laboració amb grups amb experiència en tecnologies físiques, com els grups de Nanobioenginyeria, liderat pel Prof. Josep Samitier, i Processat de Senyals i Informació per Sistemes Sensors del Dr. Santiago Marco, de l'IBEC, el grup de dispositius nanofòtics de l'ICFO, dirigit pel Dr. Gonçal Badenes, i el grup Nanobiosensors i Aplicacions Bioanalítiques del Centre d'Investigació en Nanociència i Nanotecnologia (ICN2-CSIC) dirigit per la Prof. Laura Lechuga.

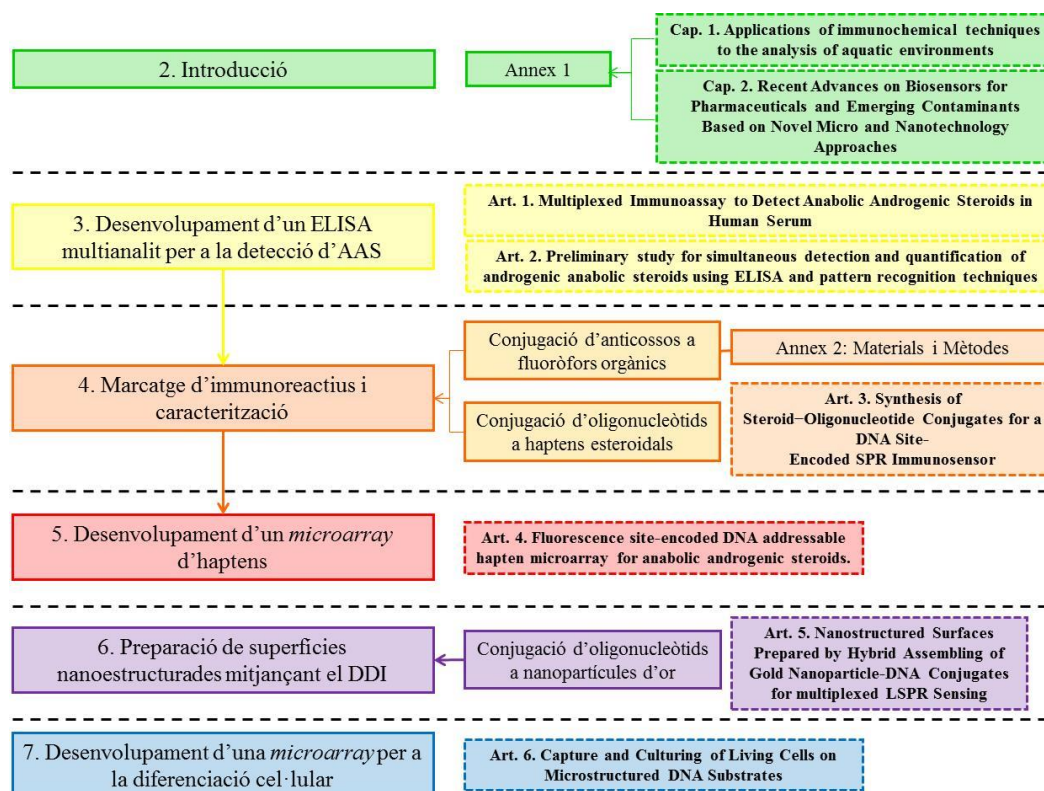


Figura 1.1: Diagrama en el que es mostra la relació existent entre els diferents capítols que formen aquesta tesi i les publicacions relacionades.

Els capítols que constitueixen l'estructura principal d'aquesta tesi són els que es mostren en la Figura 1.1, juntament amb les publicacions sorgides fruit dels resultats obtinguts en cada apartat. En primer lloc, trobem a mode d'introducció una revisió de les tècniques immunoquímiques més emprades, dels immunosensors òptics basats en la ressonància del plasmó superficial i dels *microarrays*, tan d'ADN com proteics. A continuació, la part de resultats i discussió, ha estat dividida en diferents capítols, la majoria d'ells corresponent als diferents objectius específics marcats per assolir l'objectiu general d'aquesta tesi. Per altra banda, també s'ha inclòs en un capítol el treball que es dugué a terme durant una estada pre-doctoral en el grup d'investigació del Prof. Christof M. Niemeyer (Universitat de Dortmund, Alemanya), perquè tot i que en aquest treball no s'empraren els mateixos bioreactius que en els capítols anteriors, l'objectiu final també consistia en assolir una plataforma universal fent ús del direccionament de cadenes d'oligonucleòtids, en aquest cas però, per a la diferenciació cel·lular. Finalment, trobem un annex al capítol 2 (Annex 1), que

conté dos capítols de llibres que han estat publicats en el transcurs d'aquesta tesi i que són una revisió de l'estat de la matèria en el camp dels biosensors, i un annex al capítol 4 (Annex 2), en el que es recullen els materials i mètodes emprats per a la preparació de bioconjugats anticòs-fluoròfor i pel desenvolupament de fluoroimmunoassaigs en format de microplaca per a la detecció d'hormones anabolitzants emprant aquests bioconjugats.

2. INTRODUCCIÓ

La miniaturització de dispositius analítics i bioanalítics ha esdevingut una de les principals àrees d'investigació des de finals del segle XX¹⁻². Un gran nombre d'avantatges s'obtenen amb la miniaturització dels aparells d'anàlisi, com poden ser la reducció del cost de producció, la facilitat a l'hora del transport o el menor espai que ocupen en els laboratoris. Això ha portat, a la creixent necessitat de desenvolupar nous dispositius que permetin fer mesures *in situ* (*point-of-care*, PoC), per tant, dispositius petits, lleugers i portàtils amb baixos requeriments de potència per al seu funcionament. Amb aquesta finalitat van aparèixer els assaigs de tira (*test strip*) i els biosensors. Però una altra de les característiques que més es valora en un dispositiu analític, és que permeti el processat d'un gran nombre de mostres simultàniament (*high throughput screening*, HTS), com en el cas dels ELISAs (*enzyme-linked immunosorbent assays*), i que a més, ofereixi la opció de detectar e identificar simultàniament un gran nombre d'analits. Això ha fet necessària la preparació de matrius d'elevada densitat (*high-density arrays*), per poder amb volums petits de mostra, obtenir la màxima informació en una sola mesura i amb la major detectabilitat possible. En aquest aspecte, els *microarrays*, essent assaigs en fase sòlida miniaturitzats i paral·lelitzats, són eines de diagnòstic perfectament capaces d'aportar la màxima informació amb la mínima quantitat de mostra i la menor despesa de reactius. I a més a més, els *microarrays* permeten la multidetecció d'un elevat nombre d'analits, ja sigui mitjançant una codificació espacial en la superfície de detecció, com també, fent ús de diferents marcadors específics per a cada analit o família d'analits.

2.1 Tècniques immunoquímiques

Les tècniques immunoquímiques es basen en la reacció de reconeixement entre l'anticòs (Ac) i l'antigen (Ag) corresponent. Els anticossos són glicoproteïnes globulars, del grup de les

immunoglobulines (Ig), generades per les cèl·lules del sistema immune (cèl·lules B) d'un organisme hoste en resposta a la presència de substàncies o molècules exògenes antigèniques (antígens). En els mamífers existeixen cinc famílies diferents d'immunoglobulines (IgA, IgD, IgE, IgG i IgM) que es diferencien per la seva càrrega, dimensions, morfologia, així com, pel nombre i tipus de carbohidrats units a la seva estructura. En el sèrum dels mamífers un 80% del total d'immunoglobulines són de tipus G, per aquest motiu, les IgGs són les més emprades en les tècniques immunoquímiques. El pes molecular de les IgGs està al voltant dels 150 KDa; la molècula està formada per dues parelles de cadenes polipeptídiques, dues de pesades (cadenes H, *heavy chains*) de 55 KDa cada una amb oligosacàrids covalentment units, i dues de lleugeres no glicosilades (cadenes L, *light chains*) de 25 KDa. Les cadenes H estan unides entre sí a través de dos ponts disulfur, i la cadena H i la cadena L estan unides per un pont disulfur (vegeu Figura 2.1). Les cadenes pesades i lleugeres presenten regions variables (V), a l'extrem amino de la proteïna (extrem N-terminal), i regions constants (C), a l'extrem carboxílic (extrem C-terminal), pel que fa respecte a la seqüència d'aminoàcids. El fragment Fc (fracció cristal·litzable) està involucrat en la regulació immunològica, mentre que els dos fragments Fab (*antigen binding fraction*), que contenen les fraccions variables (Fv), és a on s'estableix el reconeixement específic, permetent la unió de dos antígens a un sol anticòs³.

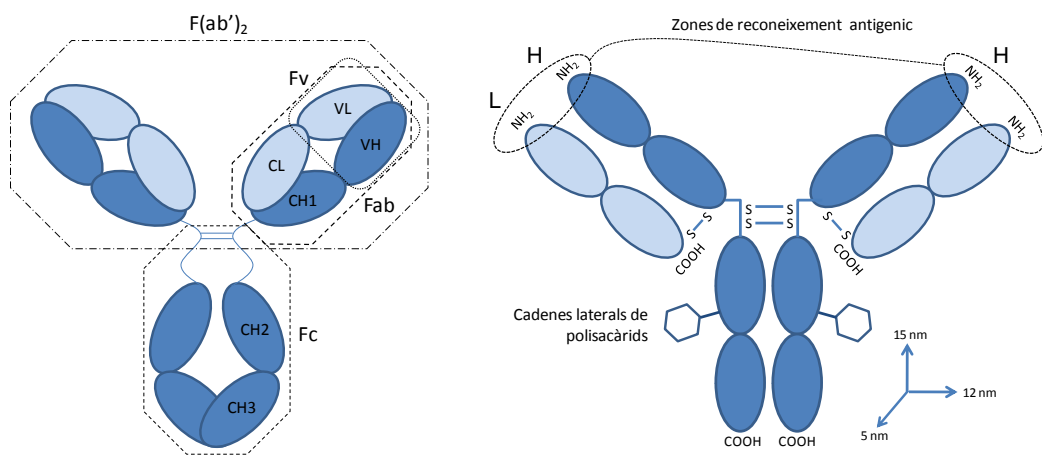
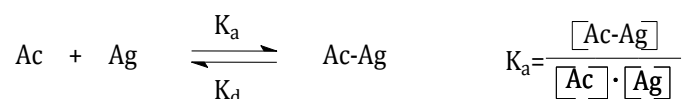


Figura 2.1: Representació esquemàtica de l'estructura (H_2L_2) i dimensions de les IgGs⁴.

A priori, es possible obtenir anticossos contra qualsevol tipus de molècula, però existeix la limitació que compostos amb un pes molecular inferior a 1000-2000Da, com per exemple, pesticides, antibiòtics o hormones, tot i ser antigènics, ja que poden unir-se específicament a anticossos, no són immunogènics, i per tant, no són capaços d'activar el sistema immune de l'animal immunitzat per sí sols. Això fa que sigui necessària la seva unió a proteïnes d'elevat pes molecular, com la KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*) o la HCH (*Horseshoe Crab Hemocyanin*), capaces d'iniciar la resposta immune. Per aquest motiu, és necessari el disseny i la síntesi d'un derivat de l'antigen que mimetitzi les seves propietats físico-químiques anomenat haptè d'immunització, que contingui grups funcionals per a la seva unió amb la proteïna immunogènica a

través de la formació d'enllaços covalents; aquest nou conjugat és l'immunogen que s'utilitza per a l'obtenció d'anticossos específics envers analits de baix pes molecular⁵.

L'elevada afinitat entre l'antigen (Ag) i l'anticòs (Ac) és deguda a múltiples forces no covalents com a) interaccions electrostàtiques, b) ponts d'hidrogen, c) interaccions hidrofòbiques i d) interaccions de Van der Waals⁵⁻⁶. La reacció Ac-Ag, es tracta d'una reacció reversible, ja que ve determinada per la llei d'acció de masses⁷. Un cop la reacció de formació del complex Ac-Ag ha arribat a l'equilibri, es pot definir una constant d'afinitat (K_a):



Normalment l'equilibri està altament desplaçat a la dreta; arribant a assolir valors de K_a de l'ordre de 10¹⁰ M⁻¹. Aquest elevat grau d'afinitat s'ha emprat per al desenvolupament de tècniques immunoquímiques com a eines d'anàlisi per a la detecció i quantificació de compostos a nivells de traces, però també donada l'elevada especificitat, la interacció Ac-Ag s'ha emprat en el desenvolupament de fases d'extracció selectives molt útils en processos de purificació de mostres complexes i preconcentració de l'analit d'interès, previs a l'anàlisi.

2.1.1 Immunoassaigs

L'immunoassaig és probablement la tècnica immunoquímica més emprada. La quantitat present del complex Ac-Ag es quantifica mitjançant l'ús de marcadors, i habitualment, en el cas d'analits de baix pes molecular (<1000 Da), es treballa sota condicions de competència. El procediment general consta d'una etapa de competència entre una concentració fixa del derivat anàleg a l'analit marcat adientment i l'analit lliure, per una quantitat limitada d'anticòs. La quantitat d'antigen marcat pot aleshores ser mesurada i quantificada, i en conseqüència, també la concentració d'analit lliure. Es poden emprar diferents tipus de marcadors segons la resposta que proporcionen. El primer immunoassaig va ser desenvolupat per Yalow i Berson per a la determinació d'insulina en sèrum fent ús de radioisòtops com a marcadors⁸, donant lloc als radioimmunoassaigs (RIAs), treball pel qual Rosalyn Yalow fou premiada amb el Premi Nobel el 1977 (*The Nobel Prize in Physiology or Medicine, 1977*)⁹. Però va ser al 1980, quan es va posar de manifest el gran potencial de l'ús dels immunoassaigs per a l'anàlisi de pesticides en el medi ambient¹⁰ fet que va incrementar l'interès en l'ús de les tècniques immunoquímiques per part d'institucions acadèmiques, governamentals e industrials. Malgrat l'elevada sensibilitat demostrada dels radiomarcadors, aquests han estat gradualment substituïts per altres de menys agressius amb el medi ambient. Així doncs, l'ús de marcadors fluorescents (com la fluoresceïna o la rodamina), quimioluminiscent (com el luminol) o bioluminiscent, han donat lloc als fluoroimmunoassaigs (FIAs) i als immunoassaigs

quimioluminiscent (CLIA). Però ha estat l'ús d'enzims com a marcadors, el que ha esdevingut el format més emprat, donant lloc als assaigs immunoenzimàtics. Els enzims més emprats són la peroxidasa de rave picant (*horseradish peroxidase*, HRP), la fosfatasa alcalina (*alkaline phosphatase*, APh), la glucosa oxidasa (*glucose oxidase*, GO) i la β -galactosidasa (*β -galactosidase*, β G). Aquests marcadors ofereixen la possibilitat d'incrementar la detectabilitat d'un immunoassaig degut a l'amplificació assolida depenent de l'activitat de l'enzim, així com, la possibilitat de triar diferents substrats que donin productes fluorescents, quimioluminiscent o acolorits.

Els immunoassaigs es poden realitzar en solució (en format homogeni) o mitjançant la immobilització d'un dels immunoreactius sobre un suport sòlid (format heterogeni). El suport pot ser tubs de plàstic, paper de nitrocel·lulosa, partícules magnètiques, microesferes, plaques de poliestirè, etc. Les microplaques (de 96 o 384 pous) són el format més habitual de manera que permet el processat d'un gran nombre de mostres simultàniament (*high throughput screening*, HTS) i a més requereixen de poc volum de mostra. En els assaigs heterogenis és necessària una etapa de separació entre la fracció unida i la lliure, mentre que en els homogenis, la detecció es duu a terme mantenint les dues fraccions en solució en la mescla de reacció. Els assaigs homogenis són més ràpids i simples i poden adaptar-se més fàcilment a analitzadors automàtics. Tot i així, solen ser menys sensibles i es troben més exposats a interferències procedents de la matriu, mentre que en el format heterogeni, aquestes interferències s'eliminen amb les etapes de rentat. L'anàlisi farmacèutic, veterinari i forense, i més recentment, l'avaluació de l'exposició humana a diversos contaminants són altres àrees, a part del control mediambiental, on els immunoassaigs han trobat una aplicació directa.

2.1.1.1 Assaig d'immunoabsorció lligat a enzim (ELISA)

Dintre dels assaigs heterogenis, l'ELISA és l'assaig immunoenzimàtic més emprat. Les configuracions més comuns són les que es mostren a la Figura 2.2. Els formats directe e indirecte (A i B), operen sota condicions de competència, i estan dissenyats principalment per a la detecció de molècules de baix pes molecular, mentre que en la configuració C (format sandvitx) no s'estableix competència i és aplicable per a la detecció de substàncies grans com ara pèptids i proteïnes.

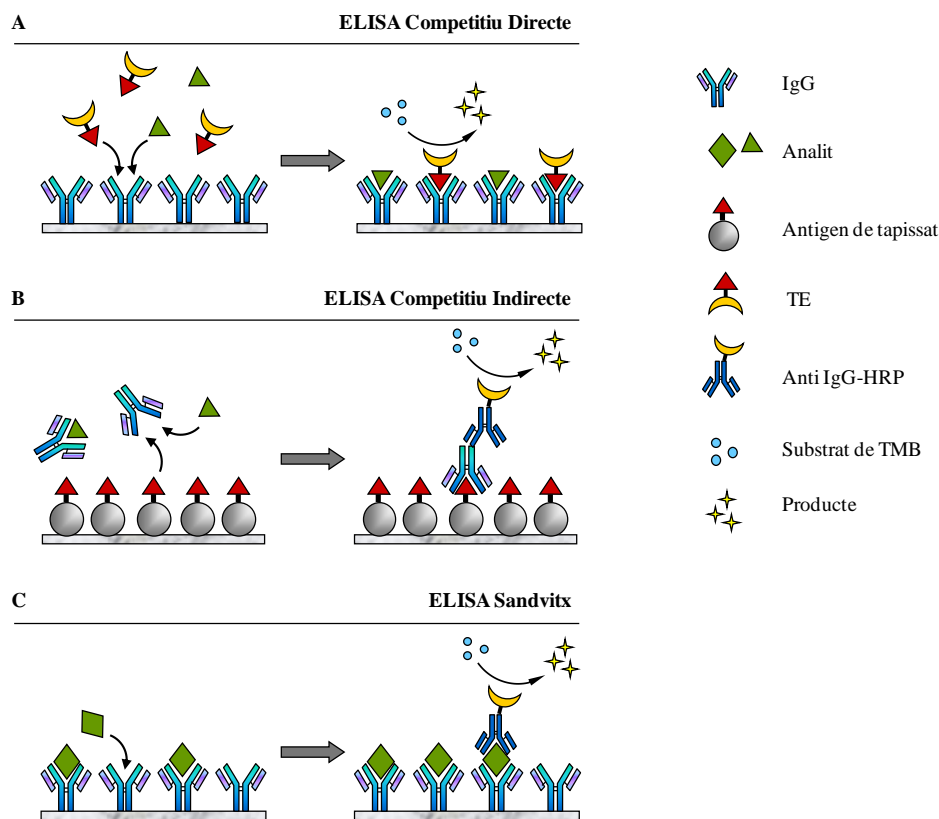


Figura 2.2: Esquemes dels diferents formats d'ELISA emprats.

2.1.1.2 Assaig de tira

Els formats d'assaig que s'empren en un assaig de tira o d'immunocromatografia de flux lateral són molt similars als d'ELISA; en aquest cas però, el suport es tracta d'una membrana de nitrocel·lulosa on s'immobilitzen les proteïnes de captura, generalment un anticòs o un antigen. En un assaig de tira, l'analit s'afegeix en un extrem i per capil·laritat és transportat a través de la membrana fins a la zona de detecció (vegeu Figura 2.3). El principal marcador que s'utilitza és l'or; concretament s'utilitzen anticòssos marcats amb nanopartícules d'or que un cop aglutinades en la zona de detecció (*test line*) permeten la seva visualització a simple vista. Però també s'han desenvolupat assaigs amb altres marcadors com partícules de làtex, immunoliposomes fluorescents, partícules fluorescents, nanopartícules de sílice dopades amb europi, negre de carbó i cristalls de fòsfor¹¹⁻¹³. La primera aplicació que va tenir aquesta tecnologia va ser en el test d'embaràs per la detecció de la hormona gonadotropina coriònica humana (hGC)¹⁴; essent encara ara el mètode més utilitzat per a la seva detecció. Els principals avantatges dels assaigs de tira són la rapidesa i facilitat per dur a terme l'assaig i veure els resultats, el baix cost, que són portàtils i que no requereixen d'aparells ni personal experimentat. Tot i així, el nombre d'aplicacions existents per a la multidetecció de residus és encara reduït¹⁵⁻¹⁷.

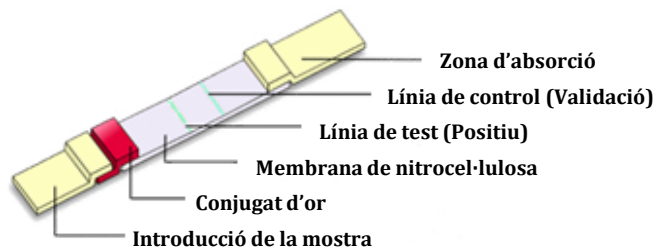


Figura 2.3: Esquema els diferents components que trobem en un assaig de tira.

2.2 Biosensors

Una via intensament investigada des de l'inici del segle XX ha estat la integració d'elements de reconeixement amb components de detecció electrònics amb la finalitat de dissenyar sistemes de dimensions reduïdes que permetessin dur a terme mesures contínues, directes i sensibles d'un o diversos analits presents en una mostra. En aquest aspecte, els biosensors compleixen tots aquests requisits. Els biosensors són sistemes compactes d'anàlisi que incorporen elements de reconeixement d'origen biològic (àcid nucleic, enzim, anticòs, receptor, teixit, cèl·lula) o biomimètic (polímers d'impremta molecular (*molecular imprinted polymers*, MIPs), aptàmers, àcids nucleics peptídics (*peptide nucleic acids*, PNAs)) que es troben en contacte directe amb un sistema de transducció que converteix el procés de bioreconeixement en un senyal mesurable. El senyal obtingut, ha de ser proporcional a la concentració de l'analit o analits a detectar. En la Figura 2.4 es mostra de forma esquemàtica el concepte de biosensor. Com a resultat de la interacció específica entre l'analit i l'element de reconeixement es produeix una variació de les propietats físico-químiques (propietats òptiques, transferència d'electrons, canvi de massa o de potencial, etc.) en la interfase element de bioreconeixement/transductor, canvis que són detectats pel transductor a través de diferents mecanismes (vegeu mes endavant). Finalment el senyal produït s'adquireix i enregistra mitjançant un sistema electrònic, si és necessari, s'amplifica el senyal, i en un procés posterior es representen i es processen les dades¹⁸.

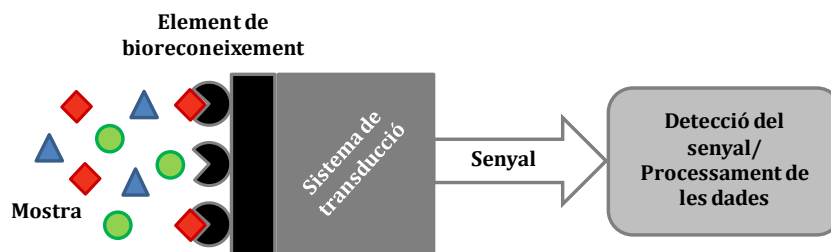


Figura 2.4: Esquema de la definició d'un biosensor.

Els biosensors es poden classificar en funció de l'element de reconeixement, el tipus d'interacció amb l'analit, el principi de transducció del senyal emprat i el tipus de detecció (veure Taula 2.1). L'elecció de l'element de reconeixement ve determinada, en gran mesura, pel compost que es pretén analitzar i l'elecció del transductor està condicionada pel tipus d'element de reconeixement

escollit, ja que aquest determina quina serà la variació en les propietats físico-químiques que tindrà lloc com a conseqüència de la interacció.

Taula 2.1: Classificacions dels biosensors.

Tipus d'interacció	Element de bioreconeixement	Detecció de la interacció	Sistema de transducció
Bioafinitat	Orgànul, teixit o cèl·lula	Directa	Electroquímic
Biocatalítica	Enzim	Indirecta	Òptic
	Àcid nucleic		Piezoelèctric
	Anticòs		Termomètric
	Receptor proteic		
	MIP ^a , aptàmer, PNA ^b		

^a Polímer d'impremta molecular (*molecular imprinted polymers*, PIM), ^b àcids nucleics peptídics (*peptide nucleic acids*, PNA)

En aquesta tesi únicament parlarem del cas concret dels immunosensors, essent aquells biosensors de bioafinitat on l'element de reconeixement, és l'anticòs. Depenent de la configuració d'assaig escollida, l'anticòs o l'antigen, es troba immobilitzat sobre la superfície del transductor de manera que els canvis físico-químics resultants de la formació de l'immunocomplex (constant dielèctrica, índex de refracció, massa, càrrega, pH, etc.) es converteixen en un senyal mesurable¹⁹⁻²⁰. La detecció del complex Ag-Ac es pot fer directament, tot i que per augmentar la sensibilitat es poden acoblar diferents tipus de marcadors (enzims, fluoròfors, nanopartícules, etc.) als anticòs o als antigens. En el cas de molècules petites sol ser també habitual l'ús de configuracions competitives.

Els immunosensors pretenen poder oferir una millor alternativa als sistemes de detecció existents. Per tant, l'immunosensor "ideal" hauria de complir els següents requisits:

- Elevada detectabilitat
- Elevada selectivitat
- Reutilitzable
- Baix cost de producció
- Temps d'anàlisi ràpid
- Pretractament de la mostra inexistent o molt senzill
- Fàcil funcionament
- Portàtil
- Automatitzable
- Miniaturitzable
- Multidetecció

Així doncs, els immunosensors haurien de poder ser aplicats a l'anàlisi *in situ*, donar resultats en el mínim temps possible, permetre que les mostres es poguessin analitzar directament sense pràcticament cap pretractament, i ser capaços d'analitzar un elevat nombre de mostres. La investigació en aquest camp encara és molt activa, amb l'objectiu de desenvolupar dispositius electrònics que combinin els avantatges dels immunoassaigs amb els de l'automatització i la integració dins d'instruments més complexes, i amb la possibilitat de processar dades de forma automàtica o inclús d'actuar automàticament com a resposta a la presència de l'objectiu analític. Tal

i com s'ha comentat anteriorment (vegeu Taula 2.1), els immunosensors es poden diferenciar en funció del tipus de transductor que utilitzen, així doncs trobem els immunosensors:

1. Òptics (sensor de fibra òptica, ressonància del plasmó superficial (SPR) o superficial localitzat (LSPR), ona evanescent, etc.).
2. Electroquímics (potenciomètrics, amperomètrics, impedimètrics, conductimètrics, etc.).
3. Piezoelèctrics (microbalances de quars, *acoustic surface waves* (SAW)).
4. Termomètrics.

Cal destacar que la intensa activitat científica en aquest camp, així com el notable progrés en el coneixement de les noves propietats físiques dels materials a nivell nanomètric, ha donat lloc a que durant els últims anys hagin aparegut noves aproximacions i estratègies de transducció, que podran permetre en un futur proper millorar significativament les prestacions dels actuals dispositius de diagnòstic²¹⁻²⁵. La naturalesa o fonament dels diferents tipus de transductors han estat àmpliament descrits en la literatura, i concretament, en el context d'aquesta tesi doctoral s'ha col·laborat en la preparació de dos treballs de revisió que descriuen l'estat de l'art pel que fa als biosensors aplicats a l'anàlisi de molècules de baix pes molecular (vegeu annex 1). A continuació, s'explicarà el fonament dels immunosensors òptics basats en la ressonància del plasmó superficial, objecte d'estudi en aquesta tesi.

2.2.1 Immunosensors òptics basats en la ressonància del plasmó superficial

La espectroscòpia de plasmó superficial, és una tècnica basada en mesurar la ressonància del plasmó superficial (*surface plasmon resonance*, SPR) que té lloc degut a la interacció de radiació electromagnètica amb la interfase entre un metall i un dielèctric. La superfície del transductor sol ser vidre recobert d'una capa nanomètrica d'un metall noble (generalment Au) (vegeu esquema en la Figura 2.5). En un sensor de SPR, la llum que incideix en la interfase entre el metall i un dielèctric provoca l'excitació d'un plasmó superficial a un determinat angle d'incidència d'aquesta llum (anomenat angle de ressonància o angle crític). L'excitació del plasmó superficial provoca un descens molt gran de la reflectivitat del metall ja que els fotons incidents són absorbits pel gas d'electrons del metall. Si es mesura la intensitat del feix de llum reflexat en funció de l'angle d'incidència de la llum, s'observa un mínim molt pronunciat per a l'angle de ressonància. Aquest angle de ressonància depèn fortament de l'índex de refracció del medi adjacent a la superfície metàl·lica (~200 nm), per això, variacions en l'índex de refracció degudes a la immobilització de biomolècules sobre la superfície d'or són detectades com a canvis en l'angle de ressonància, i aquest canvi és proporcional a l'augment de massa i concentració de la biomolècula immobilitzada. D'aquesta manera, la construcció de monocapes o interaccions moleculars que tenen lloc en la

interfase es poden seguir mitjançant els canvis en l'angle de ressonància. Els immunosensors de SPR es poden classificar entre els que mesuren reflectivitat *versus* angle a una longitud d'ona fixa i els que mesuren reflectivitat *versus* longitud d'ona, a un angle fix; els primers són els més emprats. La resposta es sol donar en unitats de ressonància (RUs)²⁶.

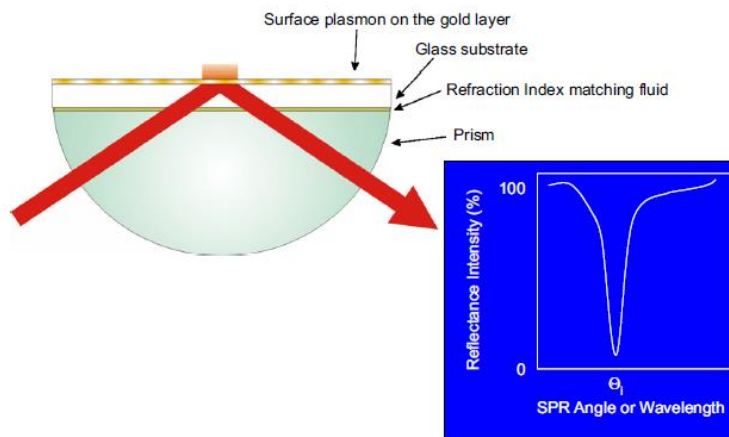


Figura 2.5: Esquema general del fonament dels sensors de SPR²⁶. Un feix polaritzat de llum passa a través d'un prisma, unit a una superfície de vidre recoberta d'una capa de ~ 50 nm d'or. La intensitat de llum reflectida per la superfície d'or és detectada.

Actualment existeixen biosensors comercials com per exemple, BIA liteTM i BIA coreTM (Biacore AB (Suècia)), Pharmacia (Amersham Pharmacia Biotech), IAsysTM (Fisons (Regne Unit) i Spreeta (Sensata Technologies). La majoria dels sensors de SPR comercials exploten l'anomenada configuració de Kretschmann, que consisteix en una nanocapa metàl·lica dipositada sobre un medi dielèctric (generalment un prisma de vidre), on els fotons al interaccionar es converteixen en polaritons que es propaguen per tota la superfície del metall. En la Figura 2.6, es mostren diverses configuracions que han estat emprades per al desenvolupament de sensors SPR.

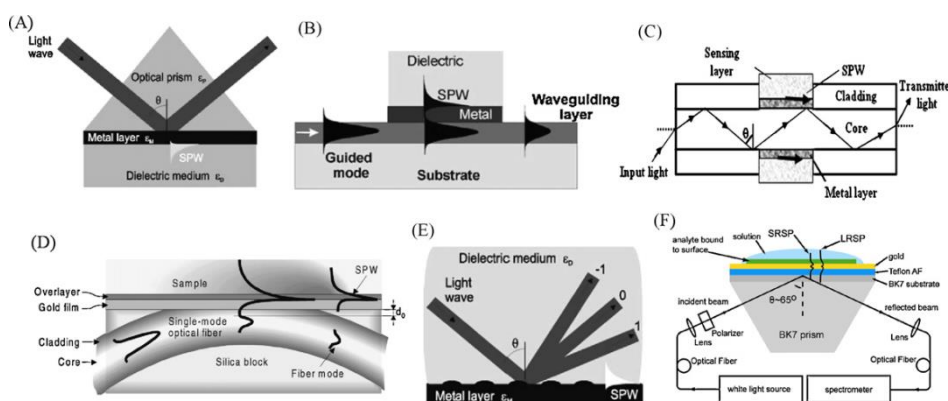


Figura 2.6: Diferents configuracions de sensors SPR. (A) Prism coupling (configuració de Kretschmann), (B) waveguide coupling, (C) optical fiber coupling, (D) side-polished fiber coupling, (E) grating coupling and (F) long-range and short-range surface plasmon (LRSP and SRSP)²⁷.

Els immunosensors de SPR presenten certs avantatges en comparació amb altres tècniques convencionals com per exemple, l'ELISA. En primer lloc, com que les mesures es basen en canvis d'índex de refracció, es tracta d'una mesura directa, pel que no és necessari l'ús de marcadors. En

segon lloc, les mesures poden fer-se a temps real, permetent obtenir tan dades cinètiques, com termodinàmiques. I finalment, es tracta d'una tècnica molt versàtil, capaç de detectar analits de pesos moleculars molt diferents i amb afinitats molt diverses. Les principals aplicacions dels sensors SPR són per a la determinació de l'afinitat i la cinètica d'interaccions entre biomolècules, interaccions receptor-ligand i la hibridació entre cadenes senzilles d'ADN²⁸. Tot i que també són emprats per a la detecció d'analits de baix pes molecular²⁹⁻³⁰ i en assaigs multiplexats³¹⁻³².

Però com totes les tècniques, els immunosensors de SPR també tenen les seves limitacions a l'hora de detectar molècules de baix pes molecular o que es troben a una concentració molt baixa²⁸. Això sol anar relacionat al fet que en general es requereixen elevades concentracions d'immunoreactius per tal d'observar canvis detectables. En aquests casos, cal recórrer a estratègies per tal d'augmentar el canvi d'índex de refracció generat per l'adsorció de l'analit en qüestió, modificant la configuració de l'assaig (vegeu Figura 2.7). Alguns dels mètodes més emprats són, marcar l'analit directament, l'ús d'un anticòs secundari, sol^{30, 33} o marcat amb nanopartícules d'or³³⁻³⁶, l'amplificació enzimàtica³⁷ o el creixement d'un polímer sobre la superfície metàl·lica³⁸. Una altra forma de millorar el senyal obtingut, és desenvolupant nous materials plasmònics amb una major sensibilitat als canvis d'índex de refracció, com per exemple, nanoestructurant la superfície metàl·lica de la interfase, ja que superfícies nanoestructurades permeten l'acoblament de la llum amb els polaritons, el que indueix un augment del camp elèctric i per tant una millora en el senyal³⁹.

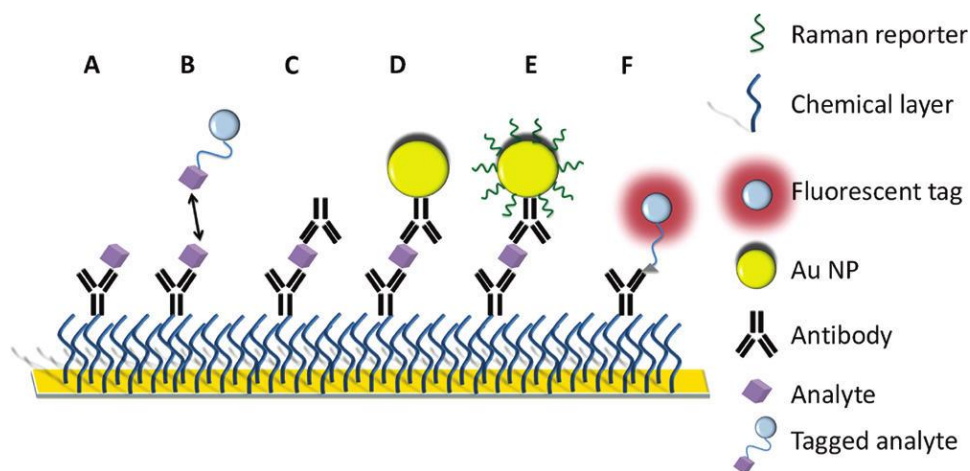


Figura 2.7: Representació esquemàtica d'un immunosensor de SPR (A) directa, (B) competitiu, (C) tipus sandvitx, (D) sandvitx amplificat amb nanopartícules d'or (AuNPs), (E) sandvitx amplificat amb surface enhanced Raman scattering (SERS), i (F) sandvitx amplificat amb surface plasmon coupled fluorescence spectroscopy (SPFS)⁴⁰.

Per altra banda, també són un desavantatge la complexa instrumentació òptica que requereixen, així com la necessitat de controlar la temperatura i mantenir-la constant en el temps. I també, que la majoria de sensors SPR comercials ofereixen un baix nombre de canals independents (<20), sent aparells molt útils per a l'anàlisi d'un nombre reduït d'analits, però no per aplicacions *high-throughput*.

Com a alternatives a la ressonància del plasmó superficial clàssica (mesura del canvi d'angle o del canvi de longitud d'ona), trobem la ressonància del plasmó superficial per imatge (*surface plasmon resonance imaging*, SPRi) o microscòpia (SPR *microscopy*), on la mesura de la llum reflectida es fa de forma simultània per tota l'àrea il·luminada, o la ressonància del plasmó localitzat (*localized surface plasmon resonance*, LSPR), on el transductor en aquest cas són nanopartícules de metalls nobles.

2.2.1.1 Immunosensors de ressonància del plasmó superficial per imatge

Els immunosensors SPRi es basen en mesurar la intensitat de llum reflectida a una longitud d'ona determinada amb un angle d'incidència fix. Canvis en la ressonància del plasmó són mesurats com canvis en la intensitat de llum capturada per una càmera CCD (*charge-coupled device*), essent aquest canvi d'intensitat proporcional als canvis d'índex de refracció causats per les interaccions moleculars que tenen lloc a la superfície del sensor. Com a resultat, diferents intensitats de gris és correlacionen amb la quantitat d'analit unida a la superfície sensora (vegeu Figura 2.8). El principal avantatge dels SPRi és la seva gran capacitat per a la detecció d'un elevat nombre d'analits (>1000) simultàniament. Però també, l'avantatge de necessitar menys quantitat de bioreactius, generalment costosos, ja que les biomolècules es poden immobilitzar en zones de fins a 100µm, i a part, una mateixa solució es pot fer servir per a fer fins a 1000 mesures simultànies, per tant guanyant també en temps²⁶. Quan es combina la tecnologia de SPRi amb els *arrays* de proteïnes, s'obté una tècnica molt valuosa per un ampli ventall d'aplicacions com l'anàlisi proteòmic o el descobriment de nous fàrmacs³¹. Alguns dels sensors comercials existents són, l'aparell desenvolupat per Corn *et al.* i finalment comercialitzat per GWC Technologies, el SPRi que HTS Biosystems va dissenyar, i que va ser comprat posteriorment per BIAcore, i Genoptics amb el SPRi-Lab+™.

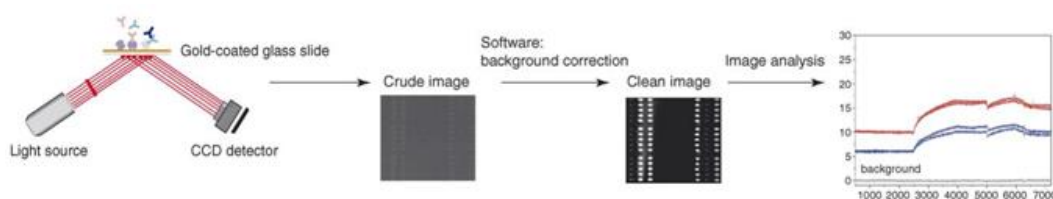


Figura 2.8: Esquema del funcionament d'un SPR *imaging*. Una font de llum projecta llum a una superfície d'or, on una interacció biomolecular està tenint lloc, i la llum reflectida és capturada per un detector CCD. Aquest procés es realitza durant un període de temps durant el qual s'obtenen una col·lecció d'imatges. Una correcció del soroll de fons es realitza amb el software, i a partir de les imatges obtingudes es generen les corbes d'unió³¹.

En la literatura trobem immunosensors de SPRi, per exemple per a l'estudi de les constants d'afinitat d'interaccions pèptid-anticòs⁴¹, un immunosensor per a la detecció simultània de dos biomarcadors proteics, β 2-microglobulin and cystatin C, amb un límit de detecció de 1 nM⁴², també trobem un immunosensor per a la detecció simultània de proteïnes i ADN, emprant bioconjugats anticòs-ADN amb seqüències complementaries a les cadenes d'oligonucleòtids prèviament immobilitzades en la superfície sensora per tal de convertir part de l'*array* d'ADN en un *array*

proteic⁴³. En la bibliografia també trobem el desenvolupament d'un immunosensor SPRi per a la detecció simultània i quantitativa de quatre famílies d'antibiòtics (aminoglicòsids, sulfonamides, fenicols i fluoroquinolones) en tampó i en llet diluïda 10 vegades a nivell de ppb⁴⁴.

2.2.1.2 Immunosensors de ressonància del plasmó superficial localitzat

Des d'un punt de vista electromagnètic, els metalls són plasmes formats per un centre fix d'ions positius i una capa externa mòbil d'electrons de conducció. Quan una radiació electromagnètica (llum) interacciona amb nanopartícules de metalls nobles de dimensions inferiors a la longitud d'ona de la llum incident, provoca l'oscil·lació col·lectiva dels electrons de conducció de la superfície metàl·lica que indueix a la formació d'un dipol en les nanopartícules. La redistribució d'aquestes càrregues va associada a una freqüència ressonant. Aquest fenomen es coneix com la ressonància del plasmó localitzat superficial (LSPR).

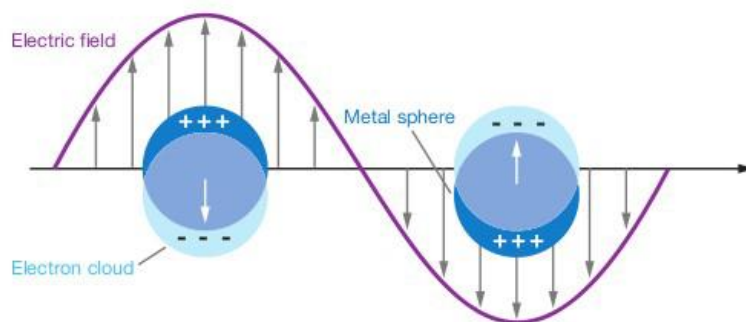


Figura 2.9: Diagrama il·lustratiu de com al fer incidir radiació electromagnètica sobre les nanopartícules s'indueix a la creació d'un dipol en la seva superfície que oscil·la en fase amb el camp elèctric de la llum incident⁴⁵.

Quan té lloc la ressonància del plasmó, s'absorbeix llum i s'emeten fotons amb la mateixa freqüència en totes les direccions. La llum absorbida pot ser mesurada mitjançant un espectrofotòmetre, mentre que la llum dispersada es mesura mitjançant un microscopi amb un condensador de camp fosc connectat a un espectrofotòmetre. El pic del plasmó localitzat superficial inclou les dues components, l'absorció i la dispersió (*scattering*); la combinació d'aquests fenòmens rep el nom d'extinció.

El plasmó localitzat superficial, té dos efectes importants. En primer lloc, camps elèctrics a prop de la superfície de les nanopartícules es veuen àmpliament augmentats, essent aquest augment molt gran a la superfície i disminuint ràpidament amb la distància. I en segon lloc, l'extinció de la partícula presenta el seu màxim a la freqüència del plasmó ressonant, que té lloc a longituds d'ona de la zona del visible per a nanopartícules de metalls nobles i en determina el seu color. La posició del pic d'extinció és característic de cada nanopartícula i depèn de la seva composició, mida i forma, però també de l'índex de refracció del medi que l'envolta, essent aquesta la base de l'aplicació d'aquest fenomen com a mètode de detecció⁴⁵⁻⁴⁷.

Efecte de la mida i forma de les nanopartícules

Per nanopartícules d'una mateixa forma i material, la posició del pic de LSPR depèn principalment de la seva mida. Segons la teoria de Mie, per nanopartícules esfèriques amb un radi R molt inferior a la longitud d'ona de la llum incident ($2\pi R \ll \lambda$), la magnitud de llum dispersada és proporcional a R^6 , mentre que l'absorció és proporcional a R^3 . És per aquest motiu que per les partícules més petites, l'extinció a la freqüència del LSPR és dominada per l'absorció, i a mesura que la mida de la partícula augmenta, la contribució de la dispersió és més important. Per nanopartícules d'or esfèriques, aquesta transició té lloc al voltant dels 80 nm de diàmetre⁴⁸. La longitud d'ona del plasmó localitzat superficial pot ser desplaçat uns 60 nm variant la mida de les partícules entre 10 i 100 nm⁴⁹. Aquest efecte fou observat per primer com el 1909 per Richard Zsigmondy, qui va realitzar estudis de microscòpia de camp fosc de col·loides d'or (Figura 2.10). L'amplada del pic del plasmó ressonant també varia amb la mida de la partícula, com més petites són les partícules menor és l'amplada, per contra, a mesura que augmenta la mida de la partícula augmenta l'amplada del pic⁴⁹.

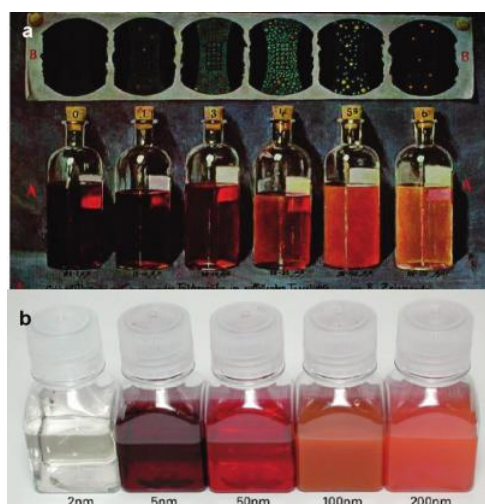


Figura 2.10: (a) Imatges de camp fosc de la llum dispersada obtingues el 1909 de col·loides d'or de diferents mides. (b) Fotografia actual de col·loides d'or de mides semblants (Ted Pella Co.)⁴⁶.

La sensibilitat als canvis d'índex de refracció per part de les nanopartícules ve determinada no només per la composició del material i la mida, sinó també per la relació entre la dimensió transversal i longitudinal (conegut com *aspect ratio*)⁵⁰. Per exemple, emprant bastons (coneguts com *nanorods*) d'or amb un radi de 10 nm, Lee et al. demostrà que la sensibilitat augmentava de 157 a 497 nm/RIU, augmentant l'*aspect ratio* de 1.0 (esferes) a 3.4 (*nanorods*). Per altra banda, per a nanorods d'igual *aspect ratio* però de diferents mides, s'observa una major sensibilitat als canvis d'índex de refracció per als mes grans⁵¹.

Ha estat demostrat experimentalment i mitjançant simulacions electrodinàmiques que la forma de la nanopartícula juga un paper molt important en determinar la sensibilitat⁵². En general, per a un

mateix metall, com més desplaçada té la ressonància del plasmó cap a la zona del vermell (menor energia) major és la seva sensibilitat als canvis d'índex de refracció. En els últims anys ha augmentat l'interès en la preparació de nanopartícules de diferents formes, a través de mètodes basats en les estratègies *bottom-up* (síntesi química) i *top-down* (nanolitografia). En la Figura 2.11 es poden veure els espectres de llum dispersada obtinguts per a nanopartícules de diferents formes. En la literatura podem trobar nanocubs d'or⁵³ i de plata⁵⁴, nanoestrelles d'or⁵⁵, nanotriangles de plata⁵⁶, bipiràmides d'or⁵⁷ o nanopartícules d'or amb forma de mitja lluna⁵⁸. Un efecte de les arestes o puntes és que produeixen un desplaçament cap a la zona del vermell en la ressonància del plasmó augmentant així la sensibilitat als canvis en l'índex de refracció⁵⁹⁻⁶⁰, però, a més a més, zones afilades presenten un avantatge addicional per a la detecció molecular a nivell microscòpic ja que en la punta es crea un elevat augment de la intensitat del camp elèctric.

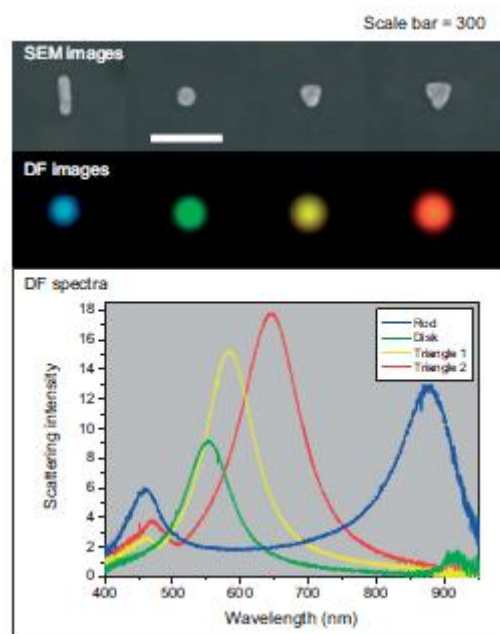


Figura 2.11: Imatges obtingudes amb un microscopi de rastreig electrònic (*scanning electron microscopy*, SEM) (dalt), imatges obtingudes amb un microscopi de camp fosc (*dark-field*) (mig) i a baix, espectres de la llum dispersada per diferents nanopartícules obtingudes mitjançant litografia *e-beam*. D'esquerra a dreta les formes són, un bastó, un disc i dos triangles (essent el de la dreta el més gran). El gruix de les nanopartícules era de 30 nm i els substrats foren vidre recobert amb 20 nm d'ITO⁴⁷.

Efecte de la composició de les nanopartícules

La major part dels experiments basats en el canvi de posició del pic de LSPR han estat realitzats amb nanopartícules d'or o de plata. L'or és generalment escollit per la seva estabilitat química i elevada resistència a l'oxidació, però la plata té una ressonància del plasmó més intensa i és més sensible als canvis en l'índex de refracció del medi que les envolta. Si comparem esferes de 50-60 nm de diàmetre d'or i de plata, la sensibilitat per a les nanopartícules d'or amb un plasmó ressonant a ~530 nm és de 60 nm/RIU, mentre que per nanopartícules de plata, amb un plasmó ressonant a ~435 nm, la sensibilitat és de 160 nm/RIU. En aquest exemple, l'efecte del material predomina per sobre de l'efecte que plasmons a longituds d'ona més altes solen ser més sensibles als canvis

d'índex de refracció. Per tant, tot i que el plasmó ressonant de les nanopartícules de plata es troba a longituds d'ona més baixes, aquestes són més sensibles que les d'or. A més, per nanopartícules d'or i de plata de sensibilitat similar, les nanopartícules de plata són millors perquè donen lloc a un pic més intens i més estret que permet determinar el màxim d'una forma més acurada. Per altra banda, també ha estat demostrat que l'efecte del material del que estan formades les nanopartícules és superior a l'efecte de la mida d'aquestes.

LSPR com a eina de diagnòstic

L'ús de la ressonància del plasmó localitzat com a principi de transducció per a nous mètodes de detecció es basa en una simple mesura de l'extinció òptica del LSPR que presenten les nanopartícules de metalls nobles al interaccionar amb la llum. El mètode de detecció més emprat consisteix en mesurar el desplaçament en la posició del pic de LSPR que experimenten les nanopartícules degut a canvis en l'entorn dielèctric local per l'adsorció d'analits sobre aquestes. També ha estat demostrat que la unió de dues nanopartícules, utilitzant alcanditiols⁶¹ o mitjançant la hibridació de cadenes d'ADN de diferents longituds prèviament conjugades a les nanopartícules⁶²⁻⁶³ dóna lloc a un desplaçament en el màxim del pic de LSPR.

En el cas concret dels immunosensors, reconeixements biomoleculars, com la interacció antigen-anticòs, que tenen lloc en zones pròximes a la superfície de les nanopartícules provoquen un augment en l'índex de refracció local i per tant un desplaçament en la longitud d'ona en la que té lloc la ressonància del plasmó (vegeu esquema en la Figura 2.12). La detecció del LSPR generalment es realitza amb un espectrofotòmetre d'UV-vis per nanopartícules en solució o en el cas de superfícies nanoestructurades immobilitzades sobre una superfície transparent, mentre que la microscòpia òptica amb un condensador de camp fosc pot també ser utilitzada per nanopartícules immobilitzades sobre un suport sòlid. En el primer cas, habitualment es mesura l'espectre d'absorbància, mentre que amb el microscopi de camp fosc es mesura la llum dispersada.

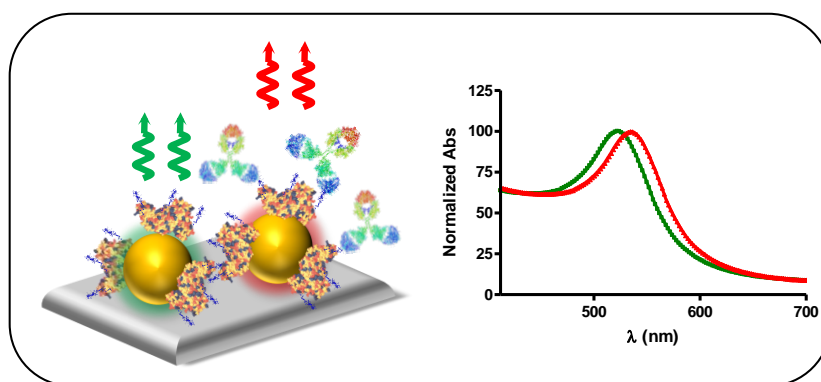


Figura 2.12: A) Representació esquemàtica del desplaçament en la posició del pic del plasmó ressonant de nanopartícules d'or degut a un reconeixement molecular.

Els principals avantatges que ofereix la detecció basada en LSPR respecte als immunosensors basats en SPR, són que no és sensible als canvis de temperatura i que no requereix d'equipament específic. Per altra banda, la miniaturització i utilització de nanopartícules amb diferents propietats òptiques permetria la multiplexació, així com modular la detectabilitat.

Tot i l'extensa recerca que hi ha entorn aquest camp, són pocs els grups d'investigació que han arribat a desenvolupar un immunosensor emprant aquest mètode de transducció. Alguns exemples que trobem en la literatura són, el desenvolupament d'un nanosensor basat en les propietats òptiques de nanotriangles de plata capaç de detectar la interacció entre els lligands β -amiloides difusibles (*amyloid β -derived diffusible ligands*, ADDL) i l'anticòs anti-ADDL, molècules implicades en la malaltia de l'Alzheimer⁶⁴, el desenvolupament d'un immunosensor amb nanopartícules d'or d'uns 40 nm capaç de detectar BSA i HSA emprant anticossos selectius⁶⁵, el desenvolupament d'un immunosensor quantitatiu per a la detecció d'estanozolol, hormona anabolitzant emprada de forma il·legal per esportistes com agent dopant, emprant nanopartícules d'or de 100 nm, amb un límit de detecció de 6 ng/mL⁶⁶⁻⁶⁷ (treball que va ser realitzat en el nostre grup d'investigació), així com un *multiarray* per a la detecció de proteïnes, com immunoglobulines (IgA, IgD, IgG, IgM), proteïna C-reactiva i fibrinogen, amb un límit de detecció de 100 pg/mL, emprant una superfície nanoestructurada formada per nanopartícules de sílice recobertes d'or⁶⁸. Recentment, grups com el del professor Van Duyne han estudiat com amplificar el desplaçament del LSPR produït degut a la interacció antígen-anticòs. Així doncs, emprant el model biotina/anti-biotina han demostrat que emprant anticossos marcats amb nanopartícules d'or, s'observa un augment de fins a un 400% en el canvi de posició del LSPR que té lloc quan l'anticòs reconeix l'analit, permetent augmentar el límit de detecció fins a gairebé 3 ordres de magnitud⁶⁹.

2.3 Micromatrius (*Microarrays*)

Una matriu (*array*) és una disposició ordenada de bioreactius, mostres, etc. sobre una superfície sòlida. Es possible diferenciar entre macromatrius (*macroarrays*) o micromatrius (*microarrays*) en funció de la mida de les zones bioreactives (*spots*) creades; així doncs, una macromatriu és aquella matriu en què les zones actives són generalment d'uns 300 micròmetres de diàmetre o superiors, mentre que en una micromatriu, les biomolècules es troben immobilitzades en zones inferiors a 200 micròmetres de diàmetre, podent arribar a trobar fàcilment milers de zones bioactives diferenciades (*spots*) en una mateixa superfície.

El concepte de *microarray* va ser introduït per Ekins i col·laboradors⁷⁰⁻⁷¹ a finals dels anys 80, arrel del seu model teòric basat en com afecta l'entorn d'un analit en la seva detecció. Segons aquest model els immunoassaigs *microspot*, que es basaven en la immobilització dels elements d'interacció en pocs micròmetres, havien, en principi, de ser capaços de detectar analits a nivells de

concentració més baixos (millor detectabilitat) i amb major rapidesa que els immunoassaigs convencionals macroscòpics.

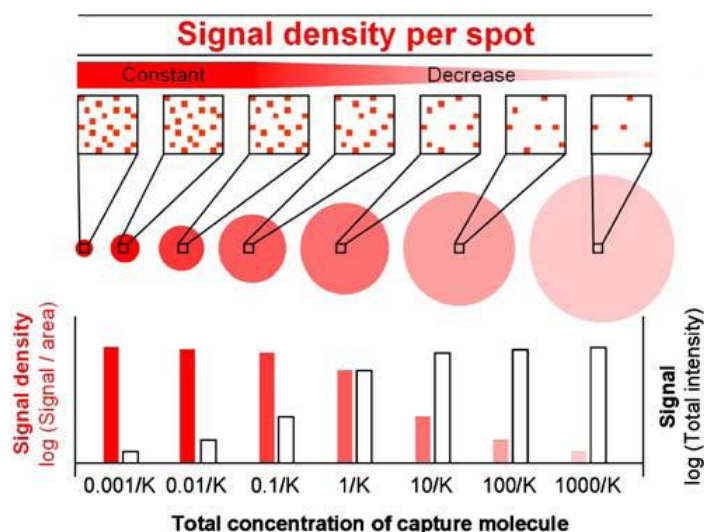


Figura 2.13: Variació de la densitat del senyal (senyal/àrea) i el senyal (intensitat total) de molècules capturades en *spots* de diferents mides per a diferents concentracions de les molècules de captura. Les molècules de captura estan immobilitzades amb la mateixa densitat de superfície en tots els spots⁷².

En la Figura 2.13, es veu com el senyal (senyal total) augmenta al augmentar la quantitat de molècules de captura, és a dir, al augmentar la mida dels *spots*, i també es pot veure com el senyal arriba al seu màxim quan la majoria de molècules d'analit han estat capturades. Per contra, s'observa com la densitat del senyal augmenta al disminuir la quantitat de molècules de captura (quan disminueix la mida del *spot*), arribant a un nivell constant quan la concentració de la molècula de captura és $<0.1/K$ (essent K la constant d'associació). Sota aquestes condicions, la concentració de l'analit en solució es veu mínimament alterada per la quantitat de molècules d'analit capturades en el *spot*.

Finalment, es va comprovar que per un assaig immunoquímic no competitiu, si s'augmenta l'àrea d'un *spot* mentre es manté constant la densitat d'anticossos immobilitzats, disminueix l'ocupació fraccionada per part de l'analit (tot i que l'ocupació total es veu augmentada) i per tant, augmenta el soroll de fons produït pel *spot*; això provoca una disminució en la relació senyal-soroll a mesura que augmenta la mida dels *spots*, fenomen que provoca una reducció de la capacitat de detecció de l'assaig. Per altra banda, també es va demostrar que com menor és la mida dels *spots*, millor és la difusió dels analits cap a la molècula de captura i per tant millora la cinètica de la reacció antigen-anticòs. Així doncs, es podria dir que en general la miniaturització dóna lloc a mètodes de detecció amb una millor detectabilitat i més ràpids. I és per aquest motiu, que el desenvolupament d'assaigs miniaturitzats, que alhora permeten la detecció simultània de molts analits utilitzant un petit volum de mostra, aplicables tant als diferents formats d'immunoassaigs com a l'anàlisi d'àcid desoxiribonucleic (ADN)/àcid ribonucleic (ARN), ha revolucionat àrees d'investigació com el diagnòstic clínic i la indústria farmacèutica.

2.3.1 Chips d'ADN (*DNA Microarrays*)

Tot i l'elevat potencial dels *microarrays* de proteïnes per al diagnòstic, va ser l'ús de l'ADN en aquesta tecnologia, degut a la seva major estabilitat envers les proteïnes, el que va revolucionar el camp⁷³⁻⁷⁴. Els chips d'ADN (també coneguts com *DNA microarrays* o *gene chips*) es basen en explotar l'elevada especificitat de la hibridació que té lloc entre dues cadenes senzilles d'ADN (*single stranded nucleic acid sequences*, ssDNA) complementaries.

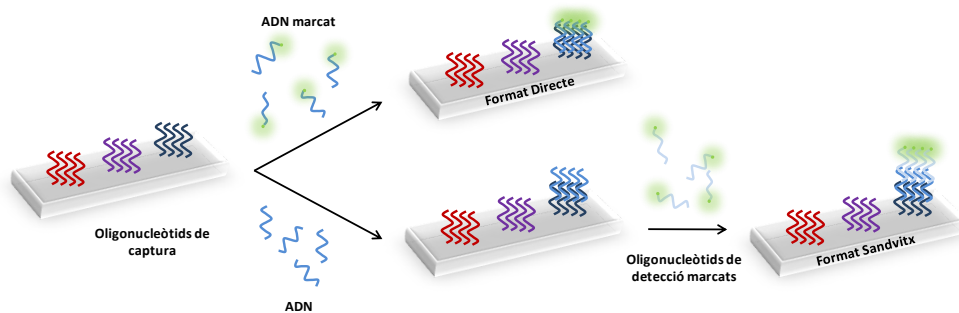


Figura 2.14: Esquema dels dos formats existents de chips d'ADN.

El chip es basa en la immobilització d'una cadena senzilla d'ADN (*probe*) en diferents zones de pocs micròmetres (*spots*) sobre un suport sòlid, generalment vidre, que serà l'encarregada de reconèixer la seva cadena complementària (*target*). La detecció d'aquest gen o seqüència d'ADN pot tenir lloc de forma directa, marcant la seqüència a detectar, o en format sandvitx, fent ús d'una segona seqüència d'ADN coneguda marcada (vegeu Figura 2.14). La detecció pot ser òptica, electroquímica o gravimètrica, però la més emprada per la majoria de cases comercials i grups d'investigació és la detecció òptica fent ús de seqüències marcades amb molècules fluorescents mitjançant l'ús d'escàners de fluorescència.

En l'última dècada ha guanyat molta importància la utilització de chips d'ADN tan per avaluar l'expressió de diferents gens⁷⁵ com per a la detecció de mutacions o polimorfismes, com el d'un únic nucleòtid (*single-nucleotide polymorphism*, SNP)⁷⁶. També són àmpliament emprats en el descobriment de nous fàrmacs, en el desenvolupament d'estudis toxicològics i en el diagnòstic de possibles malalties en pacients, en funció del seu perfil genètic⁷⁷.

Arrel de la gran aplicabilitat que tenen els chips d'ADN, són moltes les empreses, al voltant de 100, que s'han creat i que es dediquen a la preparació de *microarrays*, i que principalment varien entre elles, en el mètode emprat per a la immobilització de l'ADN en la superfície, ja sigui fent créixer les cadenes d'oligonucleòtids directament en la superfície, immobilitzant cadenes prèviament sintetitzades mitjançant dispensadors de nanogotes o adreçant aquestes cadenes ja sintetitzades mitjançant canvis de corrent elèctric (vegeu Taula 2.2). Un extens llistat d'aquestes empreses es pot trobar a la pàgina web de Leming Shi, www.gene-chips.com.

Taula 2.2: Empreses pioneres en la preparació de chips d'ADN.

Empresa	Tècnica d'immobilització	Resolució	Detecció	Aplicació
Affymetrix	Fotolitografia amb nucleòsids activats (síntesi <i>in situ</i>)	9000 spots per 1.6 cm ²	Fluorescència	Perfils d'expressió, estudis de polimorfisme i diagnòstic
NimbleGen	Síntesi <i>in situ</i>	-	Fluorescència, PCR	Perfils d'expressió i diagnòstic
Nanogen	Direccionament electrònic	99 zones actives en 2 mm ²	Fluorescència	Diagnòstic
Agilent	Impressió sense contacte (tecnologia Ink-jet)	-	Fluorescència	Perfils d'expressió

2.3.2 Chips de proteïnes (*Protein Microarrays*)

El fet que la informació genètica no fos suficient per entendre alguns problemes cel·lulars i que els chips d'ADN no poguessin trobar explicació a la falta de relació entre l'abundància de l'ARN a missatger (mARN) i l'expressió proteica, determinà la necessitat d'avançar per desenvolupar chips de detecció de proteïnes^{72, 78}.

Els chips de proteïnes tenen diferents finalitats, com l'estudi d'interaccions proteïna-proteïna, quantificar el nombre de proteïnes expressades en una cèl·lula, caracteritzar l'especificitat d'enzims i anticossos o elucidar la funció d'alguns gens. Quan les proteïnes immobilitzades són anticossos, aleshores els chips reben el nom de *microarrays* d'anticossos (vegeu Figura 2.15).

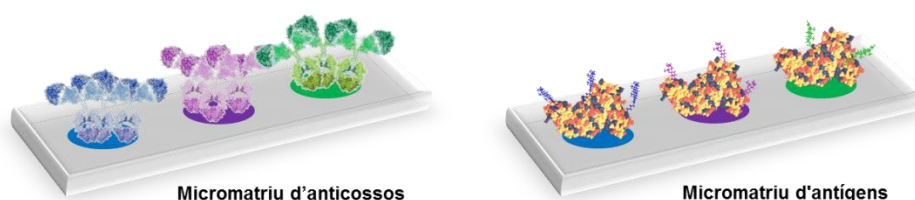


Figura 2.15: Representació de dos *microarrays* de proteïnes. Esquerra) Anticossos. Dreta) Antígens. En ambdós casos, les proteïnes es troben immobilitzades en zones discretes i definides de la superfície (*spots*).

Generalment les proteïnes són immobilitzades sobre superfícies sòlides de vidre a través de diferents estratègies químiques; però tan si la unió és per adsorció o es tracta d'un enllaç covalent, com si la superfície és bi- o tridimensional, el principal objectiu és el d'obtenir la màxima superfície activa. Les tècniques d'immobilització utilitzades són les mateixes que varen ser adoptades per a la producció dels chips d'ADN basades en l'ús de dispensadors de nanogotes. I pel que respecte a la detecció, en els chips de proteïnes també es solen utilitzar marcadors fluorescents, fent la lectura en escàners i tractant i analitzant les imatges obtingudes amb els programes adequats.

Els principals problemes que presenten els chips de proteïnes, són la poca reproduïbilitat i la falta d'homogeneïtat dels *spots*, degudes en gran part a la naturalesa de les proteïnes, que fa que la seva biofuncionalitat depengui de la seva estructura terciària o quaternària, la qual es pot veure alterada per canvis en el contingut de sals o del pH dels tampons, per la presència d'agents oxidants o per la pèrdua d'humitat. Això fa que s'hagin invertit molts esforços en trobar superfícies i mètodes d'immobilització, que permetin per una banda, mantenir l'activitat de les proteïnes un cop unides a la superfície, i per l'altra, que la densitat de molècules actives sigui la major possible, a més de presentar una distribució homogènia al *spot*.

La unió de les proteïnes sobre superfícies sòlides pot tenir lloc a través de tres estratègies diferents: a) interaccions no específiques (immobilització passiva o adsorció), b) interaccions específiques no covalents o c) interaccions covalents. Les superfícies es poden dividir en tres subgrups en funció de la modificació química que s'hi ha realitzat; superfícies bidimensionals, tridimensionals i altres⁷⁹. El primer subgrup estaria format per aquelles superfícies de vidre planes bidimensionals (2D), que poden ser activades amb epoxisilans, aminosilans o amb reactius heterobifuncionals, com glutaralhid o fenildiisotiocianat, i donar lloc a grups funcionals com amines, aldehids, epòxids o esters carboxílics (Figura 2.16, A-B). Les superfícies amb aquesta química poden unir-se a anticossos i proteïnes, tant per interaccions electrostàtiques com a través de la formació d'enllaços covalents, però en aquestes superfícies l'evaporació de les nanogotes és ràpida, la qual cosa pot afectar a l'estructura tridimensional de les proteïnes. Una alternativa és l'ús de polímers que químicament poden formar estructures tridimensionals (3D) com hidrogels o membranes, per exemple de poliacrilamida^{80,81}, agarosa⁸² i nitrocel·lulosa⁸³ (Figura 2.16, C-D). La unió de les proteïnes a aquestes superfícies té lloc principalment per adsorció física i presenten com a avantatge, que permeten mantenir millor l'estructura tridimensional de les proteïnes un cop immobilitzades. Les superfícies amb estructura 3D permeten una immobilització eficient a un major nombre de molècules en comparació amb les superfícies planes 2D, tot i que també s'han observat canvis en la intensitat del senyal en aquestes superfícies amb el pas del temps⁸⁴. I finalment, el tercer grup que inclouria la derivatització de les superfícies, amb molècules com dendrímers o neutravidina/estreptavidina, vindria a ser una mescla dels dos conceptes anteriors. Tot i que aquestes molècules no presenten una estructura 3D visible, tampoc se les pot considerar bidimensionals ja que presenten una estructura supramolecular. Són molts els estudis publicats on es comparen els diferents tipus de superfícies per al desenvolupament de *microarrays* de proteïnes i anticossos⁸⁴⁻⁸⁶; alguns d'ells mostren alternatives a la derivatització química, com el treball realitzat en el grup del Prof. Niemeyer⁸⁷ on varen comparar l'ús de diferents estratègies d'immobilització d'anticossos, com l'adsorció, la immobilització a través de la interacció estreptavidina-biotina fent ús d'anticossos biotinitats o la immobilització a través de la hibridació de cadenes d'oligonucleòtids complementàries (*DNA-directed immobilization*, DDI). Per altra banda, altres

grups mostren un major interès en l'efecte d'una bona orientació de les proteïnes per tal de millorar la capacitat de detecció, com és el cas de Peluso i col·laboradors que varen estudiar com afectava controlar la orientació d'anticossos i dels Fab alhora de la immobilització, i veieren que augmentaven en un 10% la capacitat de detecció⁸⁸.

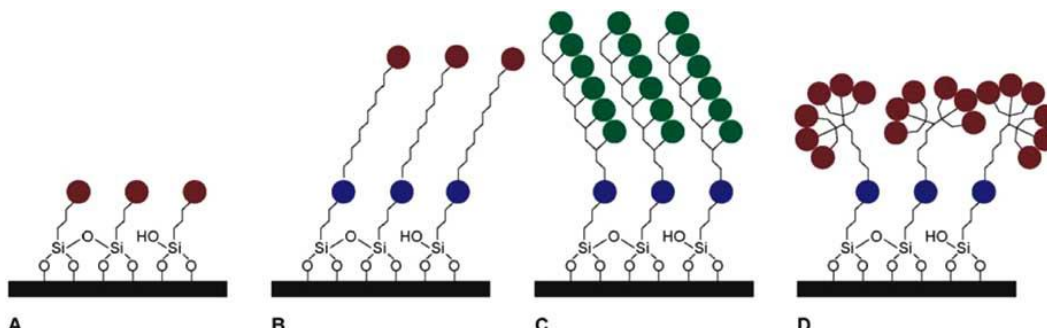


Figura 2.16: Arquitectures moleculars d'algunes modificacions químiques de superfícies⁷⁹. Les boles de colors representen diferents grups funcionals orgànics.

Finalment, un altre factor a tenir en compte i que resulta crucial a l'hora de preparar un chip de proteïnes, és el tampó (*printing buffer*) emprat per a la immobilització de les proteïnes amb el dispensador de nanogotes (*spotter*). Nombrosos estudis s'han fet per trobar els additius ideals que ha de tenir un tampó per tal d'obtenir spots homogenis i reproduïbles⁸⁹. Però malgrat els esforços, la diferent química emprada per a la derivatització de les superfícies, les diferents condicions d'impressió, la extraordinària varietat estructural de les proteïnes, incloent les diferents afinitats dels anticossos envers l'analit corresponent, les diferents condicions d'assaig o el temps d'emmagatzematge de les superfícies un cop funcionalitzades, són alguns dels molts factors implicats en el desenvolupament d'un *microarray* que fan difícil poder trobar un tampó i una superfície universal⁷⁸.

2.3.3 Estratègia DDI (*DNA-directed Immobilization*)

L'ús de la reacció d'hibridació de cadenes d'oligonucleòtids complementàries ha estat àmpliament utilitzada en sistemes de detecció d'ADN, com els biosensors d'ADN (genosensors) o els *microarrays* d'ADN. Concretament els *microarrays* d'ADN han estat àmpliament emprats pel descobriment i l'expressió de gens, i per la detecció de mutacions genètiques, entre moltes altres finalitats. En l'última dècada ha augmentat l'interès general en el desenvolupament de *microarrays* de proteïnes, per tal d'estudiar l'expressió de diferents proteïnes així com també les interaccions proteïna-proteïna, proteïna-ADN, proteïna-ARN, proteïna-fosfolípid i proteïna-mol·lècula de baix pes molecular. Degut a la diversitat estructural de les proteïnes, i la baixa estabilitat d'algunes d'elles així com la seva tendència a desnaturalitzar perdent així la seva biofuncionalitat, grups com el del professor Niemeyer han estudiat l'ús de cadenes d'oligonucleòtids complementàries com a excel·lents candidats per a la creació de superfícies reversibles modificades, utilitzant l'ADN com a nexse d'unió entre la superfície i la molècula d'interès, per exemple, proteïnes, anticossos o

enzims^{87, 90}. Altres grups també han utilitzat aquesta estratègia, per a la preparació de glicoarrays⁹¹ i per a la immobilització d'anticossos de captura⁹²⁻⁹⁴. Pel que fa a molècules petites, només s'ha descrit un treball en el que haptens d'atrazina i d'àcid 2,4-diclorfenoxiacètic son immobilitzats en immunosensors òptics de tipus SPR (*Surface Plasmon Resonance*)⁹⁵ mitjançant aquesta aproximació. Aquesta estratègia coneguda amb el nom de DDI (*DNA-directed immobilization*) es basa en la immobilització d'una cadena d'oligonucleòtids sobre la superfície de detecció, i posteriorment, mitjançant la hibridació amb la seva cadena complementària, prèviament derivatitzada amb la molècula d'interès, s'aconsegueix tenir la superfície biofuncionalitzada amb la molècula en qüestió. Aquest mètode presenta com a avantatge que la superfície biofuncionalitzada únicament amb la cadena d'oligonucleòtids és més estable a canvis de temperatura, pH i al llarg del temps. Per altra banda, després de la hibridació amb la cadena complementària, les biomolècules immobilitzades presenten una millor orientació i accessibilitat que immobilitzant-les directament sobre la superfície sòlida (*random immobilization*), més el fet que una mateixa superfície pot ser emprada per l'anàlisi de diferents compostos, únicament preparant el bioconjugats necessaris.

3. DESENVOLUPAMENT D'UN ELISA MULTIANALIT PER A LA DETECCIÓ D'HORMONES ANABOLITZANTS

3.1 Precedents i Objectius del capítol

En aquest capítol es descriu l'estudi desenvolupat per a la multidetecció d'hormones anabolitzants mitjançant un ELISA en mostres reals. La principal finalitat d'aquest treball consistia en demostrar la viabilitat de la detecció multiplexada d'aquests analits de baix pes molecular en ELISA format microplaca, abans de passar a provar-ho en la plataforma de detecció final en format *microarray*.

3.1.1 Les hormones anabolitzants

Les hormones anabolitzants, o esteroides androgènics-anabolitzants (*androgenic anabolic steroids*, AAS), són substàncies sintètiques derivades de la hormona sexual masculina testosterona, les quals mimetitzen l'efecte produït per aquesta hormona endògena. Els AAS mantenen l'estructura esteroïdal androgènica característica que consisteix en el sistema d'anells ciclopentà-perhidrofenantrè, tot i que, generalment el nombre d'àtoms de carboni associats a les hormones androgèniques és de 19. Donada la seva estructura esteroïdal, una de les peculiaritats més característiques és la seva planaritat, on sobresurten els grups metils a les posicions 18 i 19 (vegeu Figura 3.1).

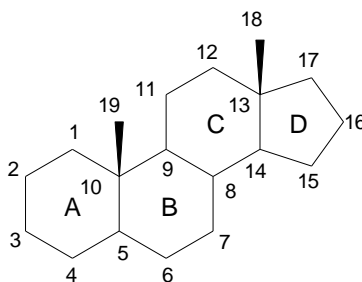


Figura 3.1: Estructura bàsica de la majoria d'esteroides androgènics amb el sistema d'anells ciclopentà-perhidrofenantrè i els dos grups metil en posició 18 i 19 que sobresurten del pla (β).

Els AAS derivats de la testosterona presenten dos efectes, l'anabolitzant, el qual té a veure amb el creixement muscular que aquestes substàncies promouen, i l'androgènic, que és el responsable de les modificacions dels caràcters sexuals masculins. Històricament, en el desenvolupament d'anabolitzants sintètics, s'ha buscat minimitzar l'efecte androgènic i maximitzar l'efecte anabolitzant, així com disminuir el metabolisme dels AAS per tal de mantenir un nivell constant en sang i poder fer arribar l'anabolitzant als teixits d'interès sense passar per la ruta catabòlica. Per aquest motiu, s'han sintetitzat un gran nombre d'anabolitzants esteroïdals com ara la nandrolona i l'estanozolol amb una relació anabòlica/androgènica molt superior a la de la testosterona⁹⁶. Com anàlegs sintètics de la testosterona es van sintetitzar diversos anabolitzants on es va modificar l'estructura androgènica base, canviant diferents grups funcionals; en la Figura 3.2 es mostren les estructures químiques d'alguns d'ells.

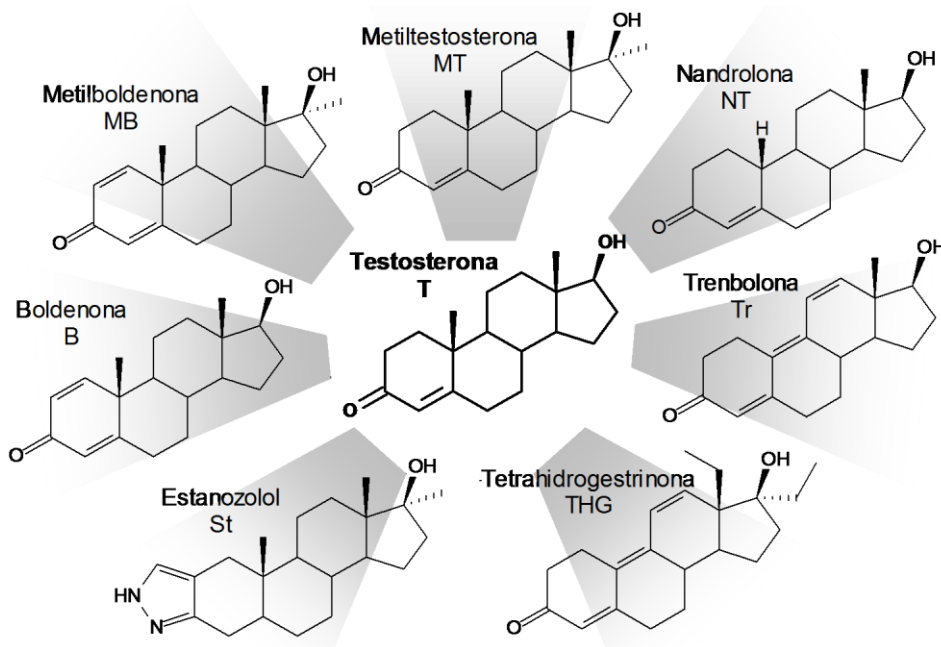


Figura 3.2: Estructures químiques de la testosterona i dels anàlegs sintètics més rellevants⁹⁷.

3.1.1.1 Aplicacions de les hormones anabolitzants

Utilització terapèutica

Els esteroides androgènics es van desenvolupar als anys trenta pel tractament de malalties relacionades amb una producció anormalment baixa de testosterona, com el retràs de la pubertat i alguns tipus d'impotència. Posteriorment, també s'han utilitzat pel tractament del desgast corporal dels pacients amb SIDA i altres malalties que provoquen una pèrdua de la massa muscular. Tot i així, l'ús d'hormones anabolitzants pot provocar greus problemes de salut (vegeu apartat 3.1.1.2), alguns d'ells irreversibles⁹⁸.

Utilització indeguda com agents pel dopatge

En l'àmbit esportiu, com l'atletisme, el futbol, el ciclisme, el beisbol, l'halterofília, la natació, etc. els AAS són àmpliament utilitzats tant per part d'atletes professionals, com amateurs, per tal d'augmentar el seu rendiment físic⁹⁹⁻¹⁰⁰. Al 1954, van aparèixer els primers informes sobre l'ús d'hormones anabolitzants per part d'atletes, buscant un augment tant de massa muscular com de força. Degut al seu mal ús i als possibles efectes secundaris d'aquests compostos, finalment es va prohibir la seva utilització per part del Comitè Olímpic Internacional (COI) l'any 1974. La implantació de controls d'AAS es va dur a gran escala en els Jocs Olímpics de Montreal el 1976 mitjançant radioimmunoassaigs (RIAs). Tot i així, al llarg de la història són nombrosos els casos de resultats positius en controls antidopatge per substàncies com la testosterona, la nandrolona, la metilboldenona (metandienona), l'estanozolol o la tetrahydrogestrinona (apareguda el 2004). L'Agència Mundial Antidopatge (WADA) és l'organisme encarregat de decidir quins compostos estan prohibits¹⁰¹; aquesta llista es revisa i s'actualitza cada any, i després, tant el COI com la resta de federacions internacionals i nacionals de cadascun dels esports, inclouen aquests compostos en la seva normativa. En aquesta llista els esteroides apareixen dividits en tres classes de substàncies prohibides, com són les hormones anabolitzants, els corticosteroides i les substàncies amb propietats antiestrogèniques. En aquesta memòria únicament es parlarà de les hormones anabolitzants, que s'engloben dins el grup de substàncies S1.

Utilització indeguda com a suplementes alimentaris

L'ús d'hormones anabolitzants, tan naturals com sintètiques, per augmentar la producció de carn d'animals per al consum humà, està regulada en molts països pel risc que aquesta pràctica suposa per a la salut pública. Els anabolitzants utilitzats més freqüentment són la testosterona, la nandrolona, la metiltestosterona, la boldenona i també últimament l'estanozolol. Aquesta pràctica està totalment prohibida en la Unió Europea (UE), que estableix un nivell de risc per a la salut pública de zero per residus d'hormones anabolitzants a través de la directiva 96/22/EC¹⁰², posteriorment rectificada per les directives 2003/74/EC¹⁰³ i 2008/97/CE¹⁰⁴, indicant que la UE prohibeix l'administració de determinades substàncies amb efecte hormonal, tirostàtic i substàncies β -agonistes en animals d'explotació. Malgrat tot, són moltes més les substàncies que es troben disponibles com a medicines veterinàries o com a suplementes nutricionals (clenbuterol, diferents ésters o prohormones de la nandrolona i la testosterona), tot i que la composició a vegades no ho indica¹⁰⁵. A més, des del 2004, un àmplia varietat de prohormones derivades d'altres esteroides, incloent la 19-nortestosterona, la boldenona i fins i tot els 17α -alquilesteroides són disponibles sense recepta mèdica. Així doncs, per tal de controlar-ne la utilització i tenint en compte les regulacions establertes per les diferents organitzacions, s'han desenvolupat molts mètodes per a la detecció d'aquests compostos en pèl¹⁰⁶ i en carn¹⁰⁷, així com també, la UE ha establert un pla de

control per a aquest tipus de residus (*National Residue Control Plan*, NRCP) a través de la directiva 96/23/EC¹⁰⁸.

3.1.1.2 Efectes adversos en la salut

Els principals efectes derivats de l'abús d'hormones anabolitzants inclou tumors hepàtics i càncer, icterícia (pigmentació groguenca de la pell, els teixits i els fluids corporals), retenció de líquids, hipertensió arterial, augment de les LDL (lipoproteïnes de baixa densitat) i disminució de les HDL (lipoproteïnes d'alta densitat). Altres efectes, inclouen tumors renals, casos greus d'acne i tremolors. A més a més, hi ha altres efectes que són específics segons el sexe o l'edat de l'usuari (Taula 3.1).

Taula 3.1: Efectes de les hormones anabolitzants en els humans¹⁰⁹⁻¹¹¹.

Homes	Dones	Adolescents
Reducció de la mida dels testicles	Creixement del pèl facial	Finalització del creixement (maduració esquelètica prematura)
Menor producció d'espermatozoides	Calvície (seguint el model masculí)	Canvis accelerats en la pubertat
Infertilitat	Canvis o desaparició del cicle menstrual	
Calvície	Augment de la mida del clítoris	
Creixement de les mames	Enduriment en la veu (tons greus)	
Major risc de càncer de pròstata		

També s'ha demostrat que l'agressivitat i altres efectes col·laterals psiquiàtrics poden estar relacionats amb el consum d'AAS; així com mentre es prenen aquestes substàncies es poden observar comportaments violents¹¹²⁻¹¹³, quan es deixen d'administrar, es solen patir estats depressius.

3.1.1.3 El metabolisme dels AAS

Les hormones anabolitzants en general són compostos lipòfils que són susceptibles de biotransformacions del metabolisme de fase I. Els enzims que causen el metabolisme de tipus I són majoritàriament membres d'una família d'enzims, coneguda com a citocrom P-450. Els enzims citocrom P-450 catalitzen varis tipus de reaccions, bàsicament oxidacions, reduccions, epimeritzacions i hidroxilacions. Els metabòlits que s'obtenen solen ser més polars, facilitant així la seva excreció directa, però, en el casos en què no són suficientment solubles, aquests compostos pateixen un metabolisme de fase II. Al metabolisme de fase II, tenen lloc reaccions de conjugació entre l'hormona anabolitzant (AAS) o el metabòlit obtingut del metabolisme de fase I, i una altra molècula (o part d'aquesta). L'objectiu d'aquestes conjugacions és el d'obtenir productes més polars i així facilitar-ne l'excreció biliar o renal. L'hormona en qüestió ha de tenir un grup

funcional per on poder unir-se a la molècula donadora (àcid glucurònic, sulfat, glutatió, aminoàcid, etc.)¹¹⁴. Aquestes conjugacions es poden produir de forma parcial o total, per tant, els AAS i dels seus metabòlits poden ser excretats en forma no conjugada (lliure) o com a conjugats¹¹⁵. En els humans, els AAS son majoritàriament excretats com conjugats glucurònids¹¹⁶ i sulfats¹¹⁷.

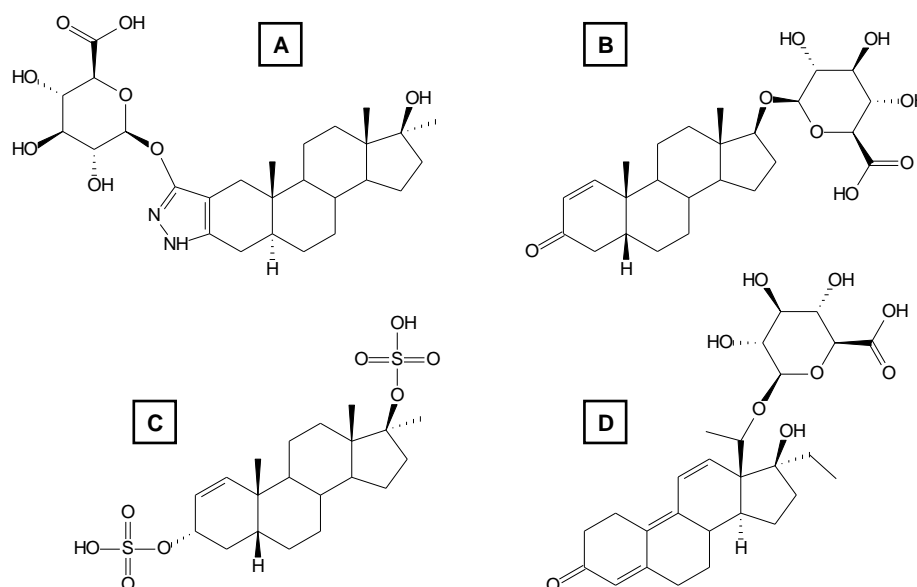


Figura 3.3: Exemples d'alguns conjugats d'ASS. A) Glucurònid de 3'-hidroxiestanozolol, B) glucurònid de 5β-androst-1-en-17β-ol-3-ona, C) sulfat de metandiòl i D) glucurònid de 18α-homo-pregna-4,9,11-trien-17β,18-diòl-3-ona.

En el cas de l'estanozolol, menys d'un 5% dels seus metabòlits es troben en forma lliure; els metabòlits que es troben en forma de conjugat en la orina són majoritàriament, el 16β-hidroxiestanozolol en orina bovina i equina, i el 3'-hidroxiestanozolol en orina humana, tot i que també s'ha trobat el 4β-hidroxiestanozolol¹¹⁸⁻¹¹⁹. Per a la boldenona, s'han trobat en orina bovina tant el 5β-androst-1-en-17β-ol-3-ona com la α-boldenona, sent aquest últim metabòlit el majoritari^{118, 120}. Per a la metilboldenona, s'han trobat tant en orina humana com bovina, la epimetilboldenona, l'epimetandiòl, el metandiòl com a majoritari i la 4β-hidroximetilboldenona¹¹⁶⁻¹¹⁷. I per la tetrahydrogestrinona, s'ha trobat que el metabòlit majoritari en orina humana és la 18α-homo-pregna-4,9,11-trien-17β,18-diòl-3-ona¹²¹ (Figura 3.3).

3.1.1.4 Regulació

La contínua aparició de noves hormones anabolitzants, és un problema que engloba el camp esportiu, el camp agroalimentari i el de la salut pública. Així doncs, és molt important disposar de tècniques de control amb una elevada detectabilitat, ja que estem parlant de substàncies extraordinàriament actives a dosis molt baixes. Per altra banda, és necessari que aquestes tècniques puguin analitzar un elevat nombre de mostres a la vegada i que a més el tractament de la mostra no sigui molt laboriós i no allargui el procés d'anàlisi¹²².

Per tal d'assegurar que els laboratoris són capaços de detectar aquestes substàncies prohibides, els seus metabòlits o els seus marcadors, s'ha establert que els mètodes analítics han de complir uns mínims requeriments de detectabilitat. Així doncs, s'han establert nivells mínim de funcionament exigít (*minimum required performance limit*, MRPL), essent la concentració d'analít que una tècnica analítica ha de ser capaç de detectar e identificar, com a conforme o no-conforme, per a poder ser vàlida per a l'anàlisi de substàncies prohibides. Aquest límit permet harmonitzar els criteris de detectabilitat que han de complir els mètodes d'anàlisi emprats pels diferents laboratoris de control de residus europeus (*European residue control laboratories*, CRLs) per aquelles substàncies per les quals no s'ha establert un nivell permès. La WADA ha reduït recentment el MRPL per AAS exògens de 10 a 5 ng/mL¹²³ en el terreny esportiu, mentre que el RIVM (*National Institute for Public Health and the Environment*), laboratori de referència de la UE pel control de residus, ha establert el MRPL per a la majoria d'AAS ≤ 2 ng/mL¹²⁴.

Degut a la gran varietat de canvis que els AAS experimenten en el metabolisme és necessari poder realitzar-ne la detecció en mostres molt diverses com orina, sèrum, suor i cabell, ja que no en totes es troba l'hormona ni en la mateixa proporció ni de la mateixa forma (conjugada o lliure)¹²⁵. Les matrius més emprades per a la detecció d'hormones anabolitzants són habitualment fluids biològics (orina i sang), tot i que en el camp alimentari també es fan anàlisis en altres teixits com ara múscul i fetge. Val a dir, que l'increment en la detectabilitat dels mètodes analítics ha permès incorporar altres matrius menys invasives com ara, cabell^{106, 126-127} o saliva¹²⁸.

3.1.1.5 Sistemes de detecció d'AAS: Tècniques cromatogràfiques

Un dels mètodes més utilitzats per a la detecció d'aquests compostos ha estat la cromatografia de gasos acoblada a la espectrometria de masses (GC-MS)^{107, 129-130} degut a l'elevada resolució d'aquesta tècnica; però degut a que els AAS són molècules de baix pes molecular, de polaritat moderada i poc termolàbils, pel seu anàlisi és necessària la derivatització dels grups hidroxils (i/o carboxils), generalment situats en les posicions 3, 6, 11, 16, 17 i 20, per formar els corresponents derivats sililats, amb agents com el MSTFA/NH₄I (N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida/Iodur d'amoni). Això ha fet que la cromatografia líquida acoblada a l'espectrometria de masses (LC-MS o LC-MS-MS) hagi esdevingut com la tècnica més emprada actualment per a l'anàlisi d'aquests compostos, ja que ofereix un mètode de detecció universal al no requerir de cap procés de derivatització. La cromatografia líquida s'utilitza molt per a la separació d'esteroides estructuralment molt similars (estereoisòmers). Però també és molt útil per a l'anàlisi d'esteroides conjugats (sulfats, glucurònids, glutatió). La cromatografia líquida d'alta resolució amb detecció ultravioleta ha estat utilitzada per l'anàlisi de testosterona i dels seus metabòlits en fluids biològics¹³¹⁻¹³². Per altra banda, la combinació LC-MS, ofereix una alternativa simplificada, específica i amb una elevada detectabilitat^{118, 133}.

Un dels principals problemes existents és la detecció d'esteroides naturals en humans, com l'estradiol, la testosterona, la dehidroepiandrosterona i la progesterona, tot i que també si sumen compostos naturals excretats per animals productors de carn, com la boldenona (boví, cavall) i la nandrolona (porc senglar, sementals), àmpliament utilitzats com a promotors del creixement. Una de les tècniques que s'utilitza, encara que de forma poc freqüent, es basa en la determinació de la relació $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de la que estan formats els esteroides. Depenent del seu origen, natural (produït pel propi organisme) o exogen (administrat a l'organisme), la relació isotòpica de carboni és significativament diferent, suficient per poder ser mesurada per cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses de relació isotòpica (GC/C/IRMS).

Per a l'estanozolol^{119, 134}, la boldenona, la metilboldenona¹³⁵, i la tetrahydrogestrinona¹²¹ s'han utilitzat tant la cromatografia líquida com la de gasos acoblades a l'espectrometria de masses¹³⁶, variant principalment entre els diferents treballs en l'etapa de pretractament de la mostra emprada, des de l'extracció en fase sòlida (*solid-phase extraction*, SPE), l'extracció líquid-líquid (*liquid-liquid extraction*, LLE), les columnes d'immunoafinitat (*immunoaffinity columns*, IAC) a la microextracció en fase líquida (*liquid-phase microextraction*, LPME)¹¹⁸⁻¹¹⁹.

3.1.1.6 Sistemes de detecció d'AAS: Tècniques immunoquímiques

Una alternativa als mètodes cromatogràfics serien les tècniques basades en la utilització de receptors específics, com ara els anticossos. Aquestes tècniques permeten fer un rastreig ràpid, simple, de baix cost i requereixen de volums petits de mostra.

Immunoassaigs

Les primeres tècniques immunoquímiques que es van desenvolupar per a la detecció d'AAS van ser els radioimmunoassaigs (RIAs)¹³⁷⁻¹³⁸. Els RIA van agafar molta popularitat com a eina de cribratge fins arribar al punt de que es van implementar en els laboratoris de control antidopatge dels Jocs Olímpics de Montreal el 1976¹³⁹. Malgrat la seva elevada detectabilitat (considerant el terme *detectabilitat* com la capacitat d'un mètode per a detectar analits a nivells baixos de concentració), es van començar a desenvolupar altres immunoassaigs no isotòpics, com els immunoassaigs enzimàtics, fluorescents o quimioluminiscent, per les facilitats que representava, a nivell de laboratori, treballar amb aquests tipus de marcadors¹⁴⁰. A la literatura trobem descrits assaigs immunoenzimàtics, majoritàriament ELISAs, per la detecció d'AAS, com la boldenona en orina i sang equina¹⁴¹, la testosterona, metiltestosterona, 19-nortestosterona i els seus metabòlits en mostres reals d'orina bovina amb límits de detecció (LOD) de 74, 266 and 131 pg ml^{-1} (ppt), respectivament¹⁴², la trenbolona en forma "lliure" en bilis bovina amb un LOD de 2.41 ng ml^{-1} ¹⁴³, l'acetat de trenbolona en orina i teixits d'ovella¹⁴⁴, i també s'ha desenvolupat un ELISA genèric per detectar els metabòlits 17- α -alquil d'hormones anabolitzants en orina equina¹⁴⁵. Recentment, s'ha

desenvolupat un ELISA per a la detecció de gestrinona en mostres d'orina humana¹⁴⁶; s'han produït i avaluat anticossos monoclonals per a la detecció de 19-nortestosterona mitjançant ELISAs¹⁴⁷ i s'ha desenvolupat un assaig de tira per la detecció de 19-nortestosterona de forma qualitativa utilitzant un anticòs policlonal unit a nanopartícules d'or¹⁴⁸⁻¹⁴⁹. Concretament en el nostre laboratori, s'han produït els anticossos policlonals (PAC) i s'han desenvolupat els assaigs ELISA per a la detecció de l'estanozolol i els seus metabòlits en orina humana i bovina¹⁵⁰⁻¹⁵¹, tetrahydrogestrinona en orina humana¹⁵² i boldenona i metilboldenona¹⁵³ (vegeu més endavant l'apartat 3.2). I recentment, ha estat publicat un treball en el que es combinen els avantatges d'emprar un assaig immunoquímic semi-automàtic competitiu, amb els d'emprar un cromatògraf de líquids d'ultra resolució acoblat a un espectrometre de masses (ionització electroesprai-triple quadrupol) (UPLC-QqQ-MS) per a la detecció e identificació d'esteroides en suplementos alimentaris¹⁵⁴.

Assaigs immunoquímics multiplexats

Tot i que en algunes ocasions s'han considerat assaigs multianalit aquells que utilitzen anticossos amb un ampli espectre de reconeixement, en aquesta tesi només considerarem com a assaigs immunoquímics multiplexats, aquells desenvolupats en base a l'ús de la combinació de més d'un anticòs per detectar el màxim nombre d'analits de forma simultània. En aquest sentit, només trobem descrit en la literatura un assaig qualitatiu en format *microarray* per a la multidetecció d'hormones anabolitzants¹⁵⁵. En aquest treball Du i col·laboradors, immobilitzen 12 antígens de tapissat diferents sobre una superfície de vidre i la detecció es realitza utilitzant 18 anticossos monoclonals i una anti-*mouse*IgG marcada amb Cy3. El *microarray* ha estat emprat per a l'anàlisi de 24 hormones en mostres d'orina humana fortificades amb un límit de detecció de 100 µg L⁻¹.

Val a dir però, que un problema molt important dels sistemes multianalits son els *fenòmens de cooperativitat* o de *reconeixement creuat*, que dificulten en gran mesura la possibilitat de proporcionar dades fiables. En el context d'aquesta tesi doctoral, enfocada a demostrar la possibilitat de desenvolupar plataformes universals d'anàlisi, utilitzant les hormones AAS com a prova de concepte, entenem com a *fenomen de cooperativitat*, el que es produeix com a resultat del reconeixement no desitjat d'un antigen de tapissat per altres anticossos diferents d'aquell amb el que es produeix la resposta immunoquímica específica. *Reconeixement creuat* és un terme més genèric, que utilitzarem fonamentalment per indicar el perfil de reconeixement d'un anticòs per altres analits relacionats estructuralment. És freqüent que un mateix anticòs reconegui més d'un analit. La reactivitat creuada es un fenomen del que es pot treure partit si parlem de tècniques de rastreig, ja que aquest efecte permet detectar un més ampli ventall de substàncies. En una plataforma multiplexada amb codificació espacial, com les que estem considerant, el fenomen de la reactivitat creuada permet multiplicar el nombre d'analits a detectar de forma considerable, però

amb una avantatge addicional, i és el fet de que la codificació espacial permet determinar a quin grup pertany. Recentment, el nostre grup va descriure un ELISA multianalit per a la determinació de residus d'antibiòtics en aliments, combinant anticossos generats contra les famílies d'antibiòtics de les fluoroquinolones, les sulfonamides i un bioreceptor de β -lactames, tots ells d'ampli espectre de reconeixement¹⁵⁶. Aquest fet permetia realitzar un rastreig simultani d'aproximadament 25 antibiòtics, essent addicionalment possible identificar la família a la que pertanyia el contaminant. Això era possible, perquè les diferències estructurals de totes 3 famílies d'antibiòtics són força importants, però en el cas de sistemes multiplexats de substàncies estructuralment relacionades, com seria el cas de les AAS, tot i que la possibilitat d'incrementar el nombre de substàncies a determinar és clara i per tant l'eficiència del rastreig, les analogies estructurals determinen que molt possiblement un mateix compost pugui ser reconegut per més d'un sistema. Això ocasionaria que un mateix compost pogués donar resposta en les diferents zones (*sites*) del sistema multiplexat, essent doncs difícil saber de quin compost o família de compostos es tracta. Revisant la literatura, trobem que no existeixen molts treballs en la bibliografia que hagin investigat de forma exhaustiva la manera de solucionar aquest problema, si no és mitjançant l'ús de tècniques quimiomètriques i models estadístics per poder fer una correcta identificació i una quantificació acurada dels analits en qüestió. Són molt pocs els grups que han treballat en aquesta direcció; un d'ells ha estat el grup del Prof. Roche, que va adaptar l'equació logística de quatre paràmetres que s'empra en l'ajust de les corbes de calibratge dels immunoassaigs competitius, per permetre l'anàlisi immunoquímic de mostres que continguin un o més compostos que presentin reactivitat creuada entre ells¹⁵⁷⁻¹⁵⁸. Posteriorment, aquest procediment basat en l'anàlisi de multicomponents ha estat emprat per a la detecció immunoquímica de dues classes de pesticides, les triazines i els àcids fenoxialcanoics, tant per separat com en mesclades d'ambdues famílies¹⁵⁹. Malgrat tot, continua sent un terreny a investigar que podria ser de gran ajuda i contribuir favorablement a la interpretació dels senyals en els sistemes multiplexats d'anàlisi.

Immunsorbents i Cromatografia d'Immunoafinitat

Una altra aplicació dels anticossos per AAS ha estat la preparació d'immunsorbents (IS). Els IS són sistemes d'extracció en fase sòlida (*selective solid-phase extraction, selectiveSPE*) basats en la cromatografia d'immunoafinitat (*Immunoaffinity chromatography, IAC*), útils per a la purificació de mostres o bé per a la separació de diferents compostos de la mateixa família en base a la seva diferent afinitat. L'ús dels IS abans de l'anàlisi mitjançant tècniques cromatogràfiques o immunoquímiques, permet minimitzar o eliminar completament l'efecte matriu i millorar la relació senyal-soroll. Per exemple, els IS s'han emprat per detectar trenbolona en orina bovina¹⁶⁰. En la literatura també trobem la cromatografia de multi-immunoafinitat (*Multi-Immunoaffinity chromatography, MIAC*), en la que s'utilitzen diferents anticossos amb diferents especificitats ancorats sobre la mateixa fase, i que ha estat emprada amb èxit per la detecció de nortestosterona i

metiltestosterona¹⁶¹, i per l'aïllament de dotze compostos anabolitzants (metiltestosterona, nortestosterona, fluoximesterona, zeranol, clostebol, etinilestradiol, dietilstilbestrol, i trenbolona) en orina i fems d'origen boví abans de l'anàlisi per GC-MS¹⁶². Machnik et al. va fer servir l'IAC per la purificació de diversos 17 α -metil-17 β -hidroxi-esteroides (metabòlits de ST i MT) a partir d'uns anticossos produïts per MT¹⁶³. I en el nostre grup, la IAC ha estat emprada per a l'anàlisi d'estanozolol i els seus metabòlits en mostres reals d'orina bovina amb detecció final mitjançant ELISA¹⁵¹, així com també per altres analits, com el 2,4,6-tricloroanisol (TCA) i el 2,4,6-tribromoanisol (TBA) en mostres de vi, o el 2,4,6-triclorofenol (2,4,6-TCP) en mostres d'orina¹⁶⁴⁻¹⁶⁵.

Immunsensors

I en el camp dels immunsensors, ha estat desenvolupat un dispositiu basat en la detecció electroquímica per a la detecció de boldenona i metilboldenona amb un límit de detecció (LOD) de 30 pg/mL i 120.3 pg/mL en mostres d'orina bovina, respectivament¹⁶⁶, essent posteriorment el mateix immunosensor emprat per la detecció de testosterona en orina bovina amb un LOD de 1.8 pg/mL¹⁶⁷, la detecció de 19-nortestosterona i metiltestosterona, també en orina bovina, amb LOD de 10.5 pg/mL i 14.8 pg/mL, respectivament¹⁶⁸, i finalment per a la detecció d'estanozolol¹⁶⁹. I concretament en el nostre grup, s'ha desenvolupat un biosensor òptic basat la ressonància del plasmó localitzat de nanopartícules d'or de 100 nm per a la detecció d'estanozolol amb un límit de detecció de 0.7 μ g/L en tampó⁶⁶⁻⁶⁷.

3.2 Resultats i Discussió

En aquesta tesi s'han utilitzat els reactius immunoquímics desenvolupats prèviament pel Dr. J.-Pablo Salvador, en el transcurs de la seva tesi doctoral⁹⁷ en el grup Receptors Molecular Aplicats (AMRg), seguint l'estratègia genèrica que es mostra en la Figura 3.5, per a la detecció d'hormones anabolitzants com la boldenona (B), la metilboldenona (MB), l'estanozolol (ST) i la tetrahydrogestrinona (THG) (vegeu les seves estructures en la Figura 3.4).

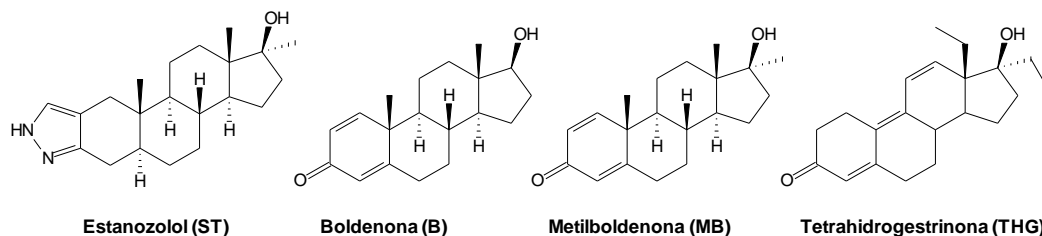


Figura 3.4: Estructures químiques dels esteroides anabolitzants pels quals foren desenvolupats anticossos policlonals i d'altres immunoreactius, prèviament a aquesta tesi doctoral.

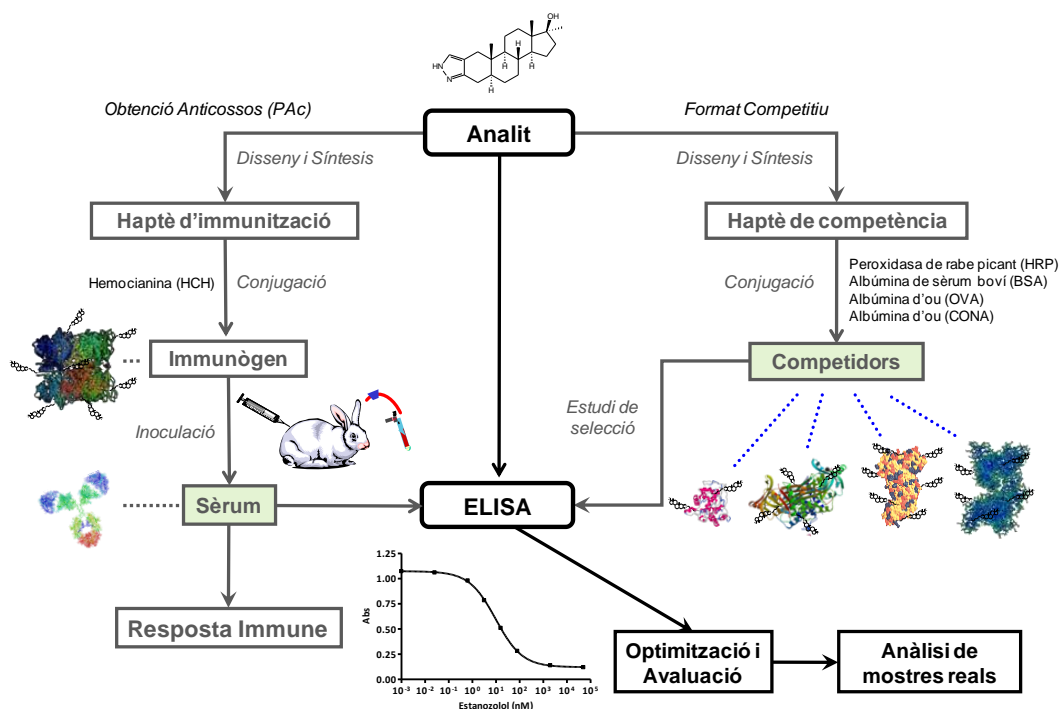


Figura 3.5: Esquema del treball experimental realitzat pel Dr. Salvador en el nostre grup d'investigació per al desenvolupament d'assajos immunoquímics per a la detecció de les hormones anabolitzants que es mostren en la Figura 3.4 en tampó i en mostres reals.

Amb els immunoreactius desenvolupats, el Dr. Salvador va desenvolupar ELISAs en microplaca per a la determinació de les hormones anabolitzants abans esmentades. A la Taula 3.2 s'han recollit de forma resumida els ELISAs que donaren millors resultats per a la detecció d'aquests compostos, així com les matrius assajades, i els límits de detecció assolits. En el cas del ST i la THG, s'analitzaren principalment mostres humanes, ja que són dos compostos utilitzats il·legalment per alguns esportistes per millorar de forma artificial la seva condició física, mentre que en el cas de la B i la MB, les matrius analitzades foren d'origen animal, ja que aquests compostos poden ser eventualment emprats pels grangers com a promotors del creixement animal, per tal d'incrementar la producció de carn. La bona detectabilitat obtinguda pels diferents assaigs en tampó, va permetre l'anàlisi d'aquests compostos en mostres reals complexes aplicant simples mètodes de pre-tractament de la mostra, com fent ús d'immunosorbents (o també anomenades columnes d'immunoafinitat), o bé extraccions i/o precipitacions amb dissolvents orgànics.

Taula 3.2: ELISAs desenvolupats per a la detecció d'hormones anabolitzants*.

Analít	As/Antigen de tapissat	Matriu	Pre-tractament	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$) ^a	R (%) ^b
ST	As147/8-BSA	Sèrum Humà	Precipitació	0.4	48
		Orina Bovina	C18 ^b	0.2	103
		Orina Bovina	IAC ^c	0.2	105
B	As138/hA_T-HRP	Orina Bovina	IAC	2.11	111
MB	As142/14-BSA	Orina Bovina	IAC	1.5	86
THG	As170/hG-BSA	Orina Humana	Extracció	0.25	87

* Els assaigs d'estanolozol (ST), boldenona (B), metilboldenona (MB) i tetrahydrogestrinona (THG) varen ser desenvolupats prèviament al nostre grup de recerca pel Dr. Salvador⁹⁷.

a) El límit de detecció (LOD) emprat ha estat la IC90 que és aquella concentració d'analit necessària per inhibir l'absorbància d'un assaig immunoenzimàtic competitiu al 90%.

b) La recuperació de l'analit (R) s'ha calculat dopant mostres abans i després del pretractament de mostra i mesurant la concentració d'analit en l'ELISA.

c) C18 es refereix a l'ús de columnes amb fase reversa de tipus C18.

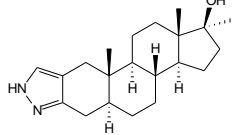
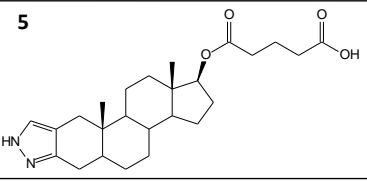
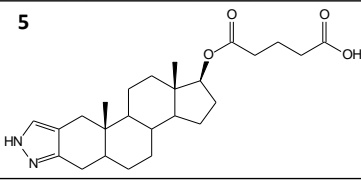
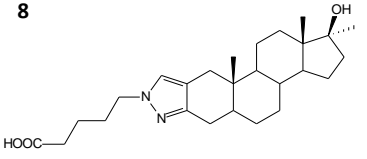
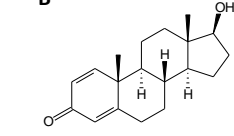
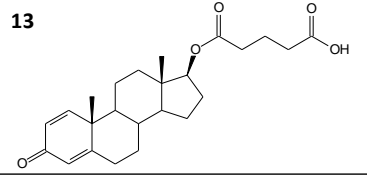
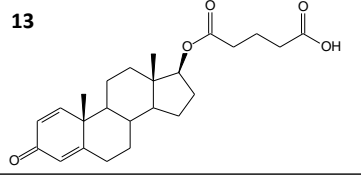
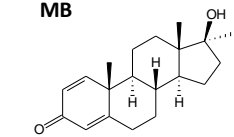
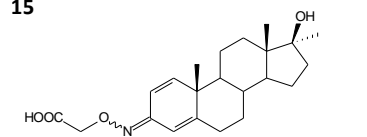
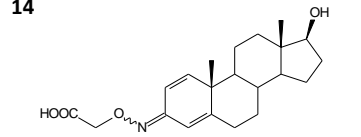
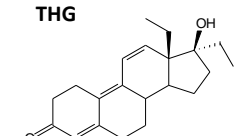
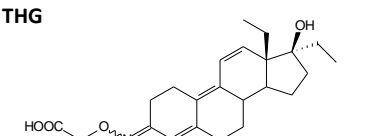
d) IAC es refereix a l'ús de columnes d'immunoafinitat.

3.2.1 Estudis de viabilitat dels immunoreactius seleccionats

Per iniciar l'estudi era necessari comprovar si els diferents anticossos, dels que es disposava en el grup, per a la detecció de ST, B, MB i THG, podien ser utilitzats de forma combinada sense que els respectius assaigs ELISA es veiessin afectats per fenòmens de cooperativitat. Amb això, es pretenia que del còctel d'antisèrums que es faria servir en l'assaig multianalit amb codificació espacial, cada anticòs només donés resposta en la zona on hi hagués immobilitzat el seu respectiu antigen, i no en les altres zones. També es volia aconseguir que la combinació d'anticossos i bioconjugats escollits, permetessin detectar el màxim nombre d'AAS simultàniament, aprofitant els diferents perfils d'especificitat dels anticossos.

Per a la realització d'aquests estudis, es varen utilitzar els antisèrums (As), As145 i As147 per l'ST, l'As138 per la B, l'As143 per la MB i l'As170 per la THG. Així mateix, com antígens de tapissat (AT) es van utilitzar, el 5-BSA i 8-BSA per l'ST, el 13-BSA per la B, el 14-BSA per la MB i l'hG-BSA per la THG. A la Taula 3.3 es mostren els immunoreactius emprats per a cada analit, així com les estructures dels haptens, tant d'immunització com de competència, la qual cosa és important ja que permeté interpretar els resultats obtinguts. Els procediments ELISA en format indirecte emprats van ser els prèviament establerts en el grup per a cada una de les hormones anabolitzants⁹⁷. Així doncs, es va tapissar una microplaca amb els diferents AT a les concentracions escollides, en diferents posicions de la microplaca, i per a cada un d'ells es van afegir els diferents As a les corresponents dilucions, deixant sempre un blanc amb zero As.

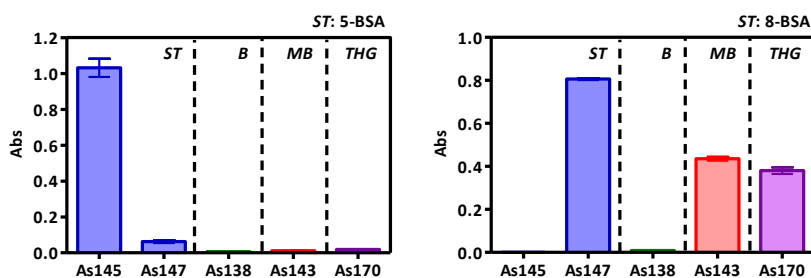
Taula 3.3: Immunoreactius per a la detecció d'AAS emprats en aquests treball^a.

Analit	Haptè d'immunització	Antisèrum	Haptè de competència
ST 	5 	As145	5 
	8 		As147
B 	13 	As138	13 
MB 	15 	As143	14 
THG 	THG 		As170

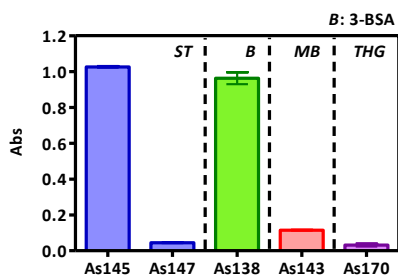
^aLa taula mostra la denominació dels diferents anticossos emprats, juntament amb les estructures químiques dels analits corresponents, les estructures dels haptens d'immunització emprats per a la seva producció i les estructures dels haptens emprats com a antígens de tapissat en els respectius immunoassaigs. En aquest estudi, els haptens de competència es van emprar conjugats amb BSA. Els haptens d'immunització havien estat emprats com a conjugats de HCH per produir els corresponents anticossos⁹⁷.

Finalment, en base als resultats obtinguts es varen seleccionar els immunoreactius que presentaven menys efectes de cooperativitat amb els altres assaigs. D'aquesta manera, es podrien utilitzar els As escollits en forma de còctel per desenvolupar l'ELISA multianalit. Així doncs, l'anticòs contra MB va ser descartat degut a la significant interferència que produïa en l'assaig de B, així com també en l'assaig de ST (As147/8-BSA) encara que en un menor grau (vegeu Figura 3.6). També es va descartar la utilització de l'As145 (ST) donat el gran reconeixement que s'observà amb l'AT de B (vegeu Figura 3.6). En canvi, l'As147 no interferia en l'assaig de B (13-BSA) ni en el de THG (hG-BSA), l'As138 no interferia en l'assaig de ST (8-BSA) ni en el de THG (hG-BSA) i pel que fa a l'As170 no interferia en l'assaig de B, tot i que sí que ho feia significativament en l'assaig de ST (As147/8-BSA).

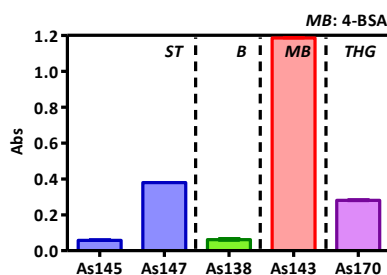
ESTANOZOLOL



BOLDENONA



METILBOLDENONA



TETRAHIDROGESTRINONA

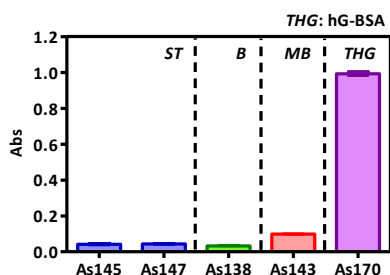


Figura 3.6: Resultats dels estudis de viabilitat en relació als possibles fenòmens de cooperativitat o de reconeixement dels diferents antigens de tapissat o bioconjugats preparats amb els diferents haptens de cadascuna de les hormones anabolitzants (ST: 5-BSA i 8-BSA; B: 13-BSA; MB: 14-BSA i THG: hG-BSA) pels corresponents anticossos seleccionats (ST: 145; 147; B: 138; MB: 143 i THG: 170). Cada gràfica mostra la resposta dels diferents anticossos (al eix de les X) envers un determinat antigen de tapissat identificat amb les seves sigles a l'extrem dret superior de la gràfica. Vegeu Taula 3.3 per les estructures dels diferents haptens de competència i d'immunització.

Per tal de reduir aquesta interferència, es va decidir investigar si treballant amb l'As170 més diluït (1/32000 enlloc de 1/16000) podríem disminuir aquest senyal no desitjat. Tal com es pot veure a la figura 3.7, fou possible disminuir aquesta interferència, tot i que també es va produir una disminució en el senyal màxim de l'assaig per a la detecció de THG (vegeu Figura 3.9).

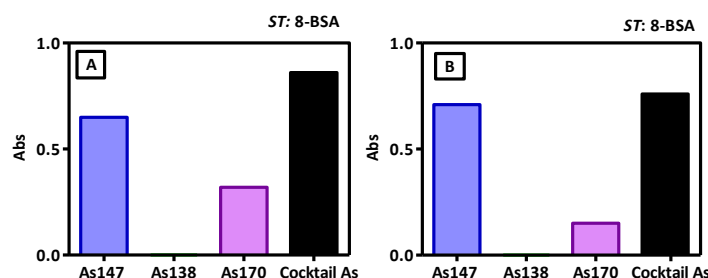


Figura 3.7: Resultats dels estudis de viabilitat en relació als fenòmens de cooperativitat dels As escollits amb el bioconjugat 8-BSA (ST). Es mostra la interferència de l'As170 per a la detecció de ST en l'assaig multianalit a diferents dilucions (A: 1/16000 i B: 1/32000), individualment i juntament amb els altres As (còctel As).

Per tant, l'assaig multianalit es desenvoluparia amb les parelles AT/As, 8-BSA/As147 (ST), 13-BSA/As138 (B) i hG-BSA/As170 (THG). Tot i que amb aquesta combinació d'immunoreactius sembla que la detecció de MB estaria compromesa, vàrem pensar que finalment aquesta hormona podria ser detectada aprofitant el perfil de reactivitat creuada dels altres assaigs¹⁵⁰⁻¹⁵¹. Observant els resultats, una altra bona combinació final hauria pogut ser la formada per les parelles 5-BSA/As145 (ST), 14-BSA/As143 (MB) i hG-BSA/As170 (THG), però aquesta no s'escollí per diversos motius. En primer lloc, perquè l'assaig per a la detecció de ST que s'obtenia amb l'altra parella (8-BSA/As147) tenia una millor detectabilitat, i en segon lloc, tot i que la detectabilitat de l'assaig de B (13-BSA/As138) no era tan bona com la de l'assaig de MB (14-BSA/As143), el primer oferia un perfil de reactivitat creuada amb la MB d'un 18%, mentre que l'assaig de MB era molt més específic i no presentava reactivitat creuada amb la B.

3.2.2 Desenvolupament de l'ELISA multianalit per AAS

En la Figura 3.8 es mostra de forma esquemàtica com funciona l'ELISA multianalit, on cadascun dels As que formen part de la mescla d'As, s'uneixen als seus respectius AT, prèviament immobilitzats en zones concretes (ST-site, B-site i THG-site) i diferenciades de la microplaca, mentre els altres As són eliminats en una etapa posterior de rentat. A continuació els anticossos immobilitzats són reconeguts per una anti-IgG-HRP, i després d'una etapa de rentat i d'afegir el substrat de TMB, es para la reacció enzimàtica amb H₂SO₄ 4N. Finalment, en funció del senyal obtingut en cada una de les posicions de la microplaca, és possible identificar i quantificar quin o quins analits es troben presents en les mostres d'anàlisi.

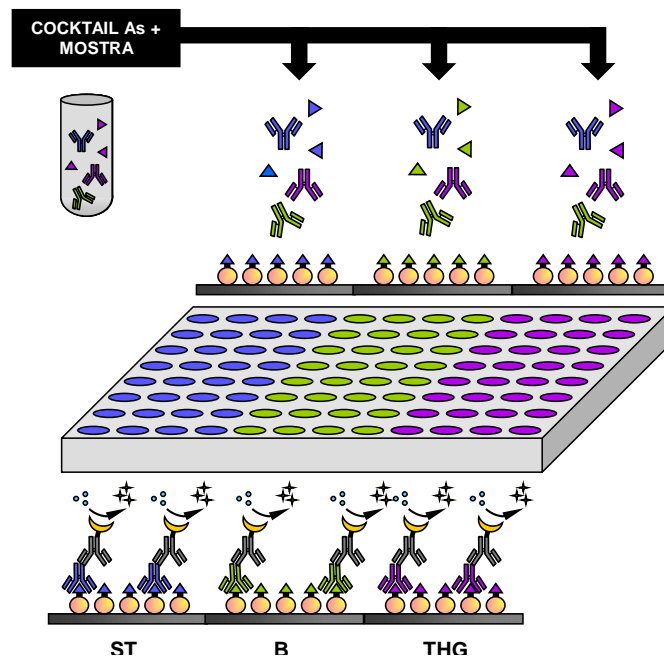


Figura 3.8: Esquema del format d'assaig emprat en l'ELISA multianalític. A la microplaca es van definir tres zones (*sites*) a cadascuna de les quals es van immobilitzar els tres ATs seleccionats per ST, B i THG. D'aquesta manera s'assoleix la codificació espacial necessària per poder identificar els analits.

Un cop escollides les parelles As/AT, només faltava comprovar si en condicions de competència es conservaven els paràmetres analítics de les corbes de calibratge per a cada una dels analits al emprar el còctel d'As. Per a la realització d'aquests assaigs, es varen tapissar diferents seccions d'unes microplaques amb els diferents AT, i a continuació, s'afegiren els diferents As o la mescla d'As, juntament amb diferents concentracions de l'analit a analitzar en cada zona, en funció de l'AT immobilitzat. A la figura 3.9 es pot observar com, cada zona només respon al seu analit, i que les corbes de calibratge obtingudes emprant l'As corresponent, sol o en el còctel, són pràcticament idèntiques. Només s'observa encara el petit efecte produït per l'As170 en la zona del ST, però com es veurà més endavant, aquesta diferència no era significativa (vegeu figura 2 de l'article 1 adjunt).

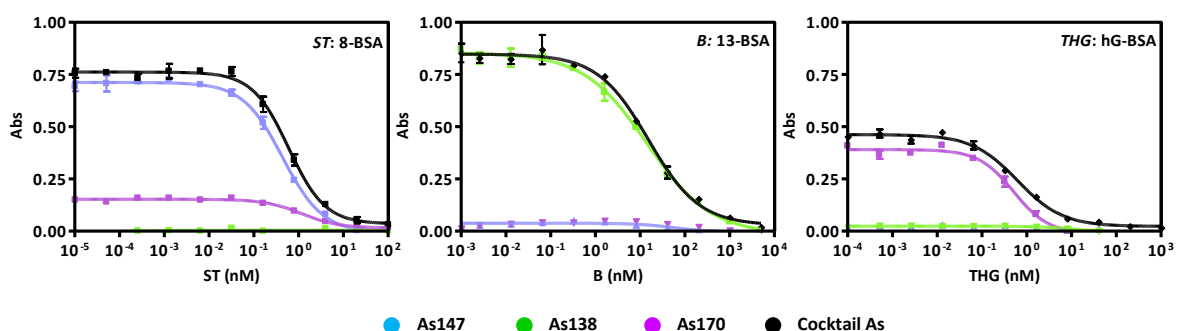


Figura 3.9: Corbes de calibratge obtingudes a cada una de les zones de la microplaca, en afegir els estàndards i els As, de forma individual o com a *còctel*. Els resultats s'han obtingut utilitzant les concentracions d'immunoreactius assenyalades en la Taula 3.4.

Finalment fou possible la detecció simultània de ST, B i THG mitjançant l'ELISA multianalític, mantenint la bona detectabilitat dels respectius assaigs individuals (vegeu els resultats en la Taula

3.4), assolint valors de detectabilitat per sota dels MRPLs establerts per la WADA. A la figura 2 de l'article 1 adjunt, queda demostrat que el comportament dels diferents assaigs és el mateix utilitzant cada un dels anticossos per separat o conjuntament, i que no hi ha cap efecte de cooperativitat. En relació al *microarray* multiplexat prèviament descrit en la literatura¹⁵⁵, l'ELISA multiplexat desenvolupat en aquesta tesi doctoral presenta uns valors de detectabilitat molt superiors, a més de tractar-se d'un assaig quantitatiu.

Taula 3.4: Llista dels paràmetres dels diferents assaigs per separat i emprant el còctel d'As en l'assaig multianalític.

Analít	ST		B		THG	
AT ^a	8-BSA (0.03125)		13-BSA (0.125)		hG-BSA (0.0625)	
As ^b	As147 (1/48000)		As138 (1/64000)		As170 (1/32000)	
Assaig	Individual	Multianalític ^c	Individual	Multianalític	Individual	Multianalític
Amàx	1.04	0.83	1.45	1.18	0.88	0.63
Amín	0.02	0.09	0.05	0.08	0.03	0.12
IC ₅₀ ^d	0.16 ± 0.06	0.22 ± 0.02	5.9 ± 2.9	9.75 ± 3.62	0.45 ± 0.14	0.25 ± 0.05
LOQ ^d	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01	2.44 ± 0.65	3.11 ± 1.12	0.14 ± 0.03	0.07 ± 0.02
LOD ^d	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.23 ± 0.05	0.34 ± 0.10	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01
Pendent	-1.07	-0.92	-0.70	-0.61	-0.999	-0.96
R ²	0.99	0.99	1.00	0.99	0.992	0.99

^aLa concentració dels antígens de tapissat (AT) està en µg mL⁻¹.

^bLa concentració està donada com un factor de dilució respecte el sèrum.

^cEls ELISAs multianalítics es van dur a terme en una microplaca dividida en 3 seccions tapissades amb els antígens de tapissat corresponents. Els estàndards es mesclaren amb el còctel d'antisèrums i s'afegiren a les seccions corresponents.

^dLa IC₅₀, el LOQ i el LOD són aquella concentració d'analít necessària per inhibir un assaig immunoenzimàtic competitiu i obtenir el 50, 80 i 90% de l'absorbància màxima. Els valors s'han donat en µg L⁻¹.

3.2.3 Especificitat de l'assaig multianalític

Es prepararen corbes de calibratge per un elevat nombre d'esteroides i s'analitzaren en les diferents zones d'assaig (ST, B i THG) emprant el còctel d'As. Els resultats obtinguts (vegeu article 1, Taula 3) mostraren un perfil de reactivitat creuada similar al dels ELISAs individuals per ST, B i THG prèviament obtinguts en el grup⁹⁷. L'assaig multianalític desenvolupat ofereix la possibilitat de detectar un nombre més elevat d'esteroides simultàniament, ja que aprofita l'especificitat de les diferents zones d'assaig. En concret, l'assaig desenvolupat és capaç de detectar 11 esteroides, per sota dels MRPLs establerts per la WADA per aquests compostos, únicament fent ús de 3 tres parelles AT/As. Val a dir que hi podrien haver altres hormones i metabòlits que també fossin reconeguts i que no s'haguessin assajat en aquest estudi. Per altra banda, incrementant el nombre de parelles AT/As emprades en l'assaig, també es podria augmentar el nombre d'analítics a ser detectats. En aquest sentit, el *microarray* desenvolupat per Du i col·laboradors¹⁵⁵, era capaç de detectar fins a 24 hormones diferents, fent ús de 12 AT i 18 anticossos monoclonals (MAc) diferents.

Tot i tractar-se de compostos d'una mateixa família i, per tant, amb moltes similituds estructurals, van ser pocs els esteroides que van donar resposta en les tres zones. Això és degut a que els

anticossos emprats en aquest treball havien estat dissenyats per a ser específics per als analits corresponents, d'aquí bé la baixa reactivitat creuada observada. D'entre els esteroides assajats, tant sols hi ha la noretandrolona que reacciona un 7% a la zona-ST i un 14% a la zona-THG, i la metiltestosterona que reacciona un 13% a la zona-ST i un 16% a la zona-B, mentre que les altres hormones són principalment detectades únicament en una zona de l'assaig. Tot i que la interferència no és molt alta, podria donar-se el cas de que mostres amb concentracions suficientment grans d'aquests esteroides donessin resposta en més d'una zona i per tant fos difícil determinar quin esteroide (o grup d'esteroides) està present en la mostra. Val a dir que la introducció de més parelles AT/As agreujaria encara més aquest fenomen. Així doncs, per tal d'arribar a resoldre aquest problema i poder identificar amb un cert grau de fiabilitat de quin esteroide (o grup d'esteroides) es tracta, cal recórrer a l'ús d'eines quimiomètriques.

3.2.3.1 Anàlisi quimiomètric: estudi preliminar

Com a estudi preliminar de com es podrien arribar a resoldre aquest efectes de reactivitat creuada i de cooperativitat, es duagué a terme un treball en col·laboració amb el grup de Processat de Senyals i Informació per Sistemes Sensors (IBEC) liderat pel Dr. Santiago Marco¹⁷⁰. En aquest treball, s'empraren els resultats de reactivitat creuada obtinguts en diferents ELISAs individuals per AAS. Concretament s'utilitzaren les dades obtingudes en 8 ELISAs (8 combinacions AT/As diferents), selectius per ST, B, MB i THG, realitzats per dúplica per a la detecció de mostres fortificades a 8 concentracions diferents d'entre 0.03 a 1000 nM amb 4 hormones anabolitzants, dihidrotestosterona (DHT), estanozolol (ST), progesterona (P) i metilboldenona (MB). En primer lloc, es realitzaren les mitges de les rèpliques dels resultats obtinguts en els diferents nivells de concentració per a cada analit i es construïren línies que definien el patró de comportament per a cada analit en base als canvis de concentració. Tot seguit s'aplicà l'anàlisi de components principals (*principal component analysis*, PCA) per tal de reduir el nombre de variables de 8 (ELISAs) a 3 components principals, essent 3 el nombre escollit per tal d'incloure un 95% de la variació total. Després es va aplicar el classificador *K-Nearest Line* (K-NL) que serveix per a classificar mostres desconegudes i també per estimar valors de concentració. En primer lloc es determina l'analit de què es tracta i tot seguit en base a la concentració del veí més pròxim (podent ser una mostra real o una mostra sintètica creada per interpolació lineal) es determina la concentració de la mostra problema. Així doncs, després de processar aquestes dades mitjançant l'anàlisi de components principals, i classificar-les segons el mètode K-NL, fou possible la detecció e identificació simultània d'aquests 4 compostos a concentracions d'entre 0.1 i 316.2 nM amb un 90.6% d'incertesa (vegeu la taula 3 de l'article 2 adjunt). Amb aquest treball va quedar demostrat que és possible detectar una hormona fins i tot quan no es disposa d'un ELISA selectiu per aquesta, com en el cas de la DHT i la P, únicament emprant les dades de reactivitat creuada obtingudes amb ELISAs per altres AAS.

3.2.4 Anàlisi de mostres biològiques

Després dels bons resultats obtinguts amb l'ELISA multianalit en tampó, tan pel que fa al bon nivell de detectabilitat assolit (vegeu Taula 3.4) com a l'exactitud (vegeu article 1, Fig. 3), es va abordar la implementació de l'ELISA multianalit desenvolupat, a l'anàlisi de mostres biològiques complexes. Els estudis d'exactitud en tampó fent servir mostres fortificades, varen mostrar una excel·lent correlació entre els valors reals i els experimentals, amb una pendent pròxima a 1 pels tres analits escollits i amb coeficients de regressió > 0.95 . Pel que fa respecte al tipus de mostres que s'analitzaren, ens vàrem centrar en l'anàlisi de sèrum i orina humana, ja que com ja s'ha comentat anteriorment en la introducció del capítol, són les matrius més emprades en els controls de dopatge per a la detecció d'AAS.

Sèrum humà

El sèrum emprat en aquest estudi va ser d'origen comercial. Tal i com es va posar de manifest en el transcurs de la tesi doctoral del Dr. Salvador, per tal de poder analitzar aquest tipus de mostra, era necessari precipitar les proteïnes del sèrum afegint un 50% (v/v) d'etanol per tal de reduir efectes inespecífics d'aquesta matriu en l'assaig de ST¹⁵⁰. Així doncs, per tal d'avaluar l'efecte matriu en l'ELISA multianalit es prepararen corbes de calibratge per ST, B i THG emprant el sèrum tractat prèviament (vegeu el protocol a la Figura 3.10) i es compararen amb les respectives corbes preparades en el tampó corresponent. La recuperació d'analit emprant aquest pre-tractament de la mostra era de 107 ± 5 % (ST), 85 ± 5 % (THG) i 99 ± 3 % (B). Com es pot observar en la figura 4 de l'article 1 adjunt, amb el tractament de mostra abans esmentat era possible eliminar l'efecte matriu per a la determinació de B i THG, però no en canvi pel ST. En el treball anteriorment esmentat del Dr. Salvador, es va concloure que la recuperació del ST emprant aquest tractament de mostra era del 48 ± 14 %, encanvi en aquest treball, en la corba obtinguda en la zona ST de la microplaca, s'observà un desplaçament del 50% en la IC₅₀ cap a concentracions més altes i un augment en el senyal màxim, mentre que en les zones B i THG no s'observà cap diferència entre les dues corbes. Segurament en el treball del Dr. Salvador aquest empitjorament en la detectabilitat de l'assaig per a la detecció de ST en serum humà ja existia, i enlloc de recuperar el 50% de l'analit com es va creure en aquell moment, al haver-se desplaçat la corba un 50%, el que passava es que es quantificava la meitat de la concentració al emprar la corba de calibratge en tampó. Possiblement, hagués estat possible eliminar l'efecte matriu observat pel ST amb una dilució addicional del sèrum, però per tal de no comprometre la detectabilitat de l'assaig, es va optar per calibrar l'assaig amb el propi sèrum. D'aquesta manera, els LOD obtinguts en sèrum foren 1.2 ± 0.4 $\mu\text{g L}^{-1}$ (ST), 0.2 ± 0.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ (THG) and 3.0 ± 0.7 $\mu\text{g L}^{-1}$ (B), essent en tots els casos inferiors al MRPL per aquestes substàncies de 5 $\mu\text{g L}^{-1}$.

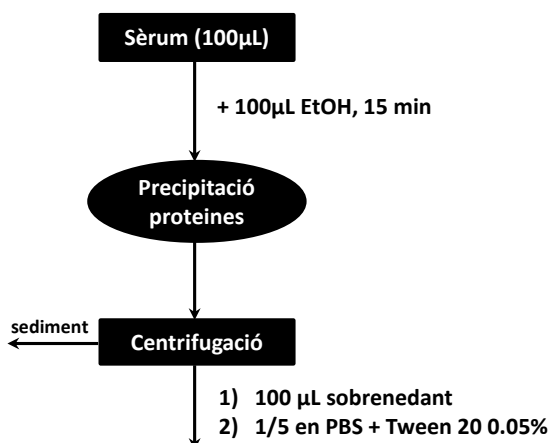


Figura 3.10: Protocol general per a la determinació d'AAS en sèrum humà.

Orina humana

En primer lloc, com ja s'havia fet amb el sèrum, calia veure si la matriu provocava interferències en l'assaig i quina era la seva extensió. Per a la realització d'aquest estudi s'utilitzaren mostres d'orina hidrolitzades, ja que com ja s'ha comentat a la introducció del capítol, els AAS i els seus metabòlits, es solen trobar majoritàriament en forma de conjugats glucorònid i sulfat en aquesta matriu. A continuació, a la Figura 3.11 es pot observar el protocol general emprat per tractar l'orina abans de ser analitzada mitjançant l'ELISA multianalític per a la detecció d'AAS, procediment prèviament emprat pel Dr. Salvador en el transcurs de la seva tesi¹⁵².

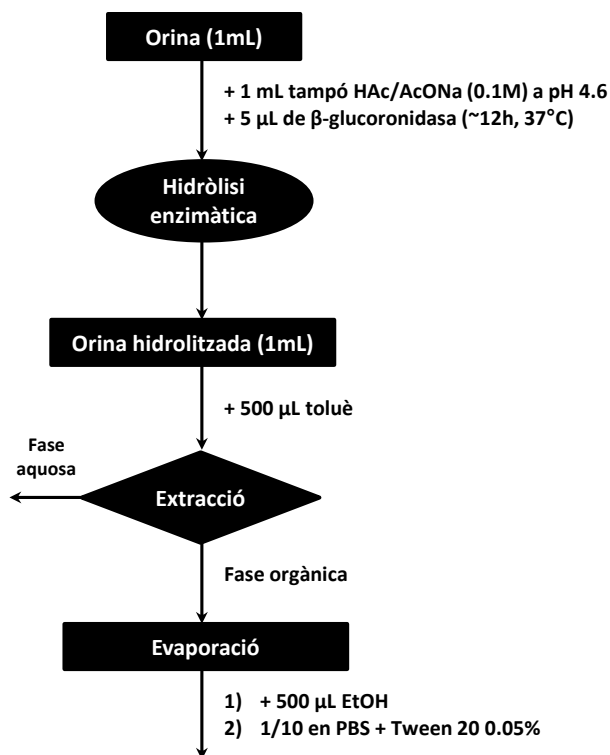


Figura 3.11: Protocol general per a la determinació d'AAS en orina humana.

Per tal d'obtenir una mostra representativa d'orina humana, es va procedir a la recollida de mostres d'un conjunt de 20 persones (10 homes i 10 dones) que no havien rebut cap tractament amb anabolitzants, segons les afirmacions dels propis donants, i es van mesclar a volums iguals. La mostra mescla, es va aliquotar i les diferents fraccions es van congelar a -40°C . Per dur a terme la hidròlisi enzimàtica, a cada 1 mL d'orina, es va afegir 1mL d'una solució tampó 0.1M àcid acètic/acetat de sodi a pH 4.6 i $5\mu\text{L}$ de β -glucuronidasa (activitat de 109600 unitats β -glucuronidasa/mL i 1170 unitat sulfatasa/mL). Es va deixar incubar la mostra tota la nit a 37°C , tapada de la llum. A continuació, fou necessari realitzar una extracció amb toluè per eliminar possibles interferències no específiques provinents de l'orina. En aquest cas, per cada 1 mL d'orina hidrolitzada s'afegien $500\mu\text{L}$ de toluè, la mescla es deixava agitant durant 5 minuts i finalment es centrifugava durant 5 minuts a 14000 rpm, per tal de tenir les dues fases ben diferenciades. Aquest procés es realitzava 2 vegades, i finalment, s'ajuntaven les fraccions orgàniques recollides, s'evaporava el toluè amb una corrent de N_2 , i l'extracte es redissolia amb $500\mu\text{L}$ d'etanol i es diluïa 10 vegades amb PBS, tot afegint la quantitat corresponent de Tween 20. D'aquesta manera s'aconseguia un extracte amb un 10% d'etanol, i en el qual la mostra d'orina original es trobava diluïda 5 vegades.

Per calcular la recuperació de cada un dels analits després d'aquest pretractament de mostra es prepararen mostres cegues en tampó, fortificades a diferents concentracions per a cada un dels analits, i s'analitzaren simultàniament amb les mostres d'orina amb l'ELISA multianalític. Els valors de recuperació obtinguts utilitzant aquest protocol foren de $110 \pm 19\%$ (ST), $94 \pm 6\%$ (THG) i $92 \pm 3\%$ (B).

Pel que fa a l'efecte matriu, va ser avaluat comparant les corbes preparades en PBST amb un 10% (v/v) d'etanol, en cada una de les 3 zones diferenciades de la microplaca (zona ST, zona THG i zona B), amb les corbes preparades en l'orina hidrolitzada diluïda 1/5, 1/12.5, 1/25 i 1/50 en PBST mantenint en tot moment el 10% (v/v) d'etanol (vegeu Figura 3.12).

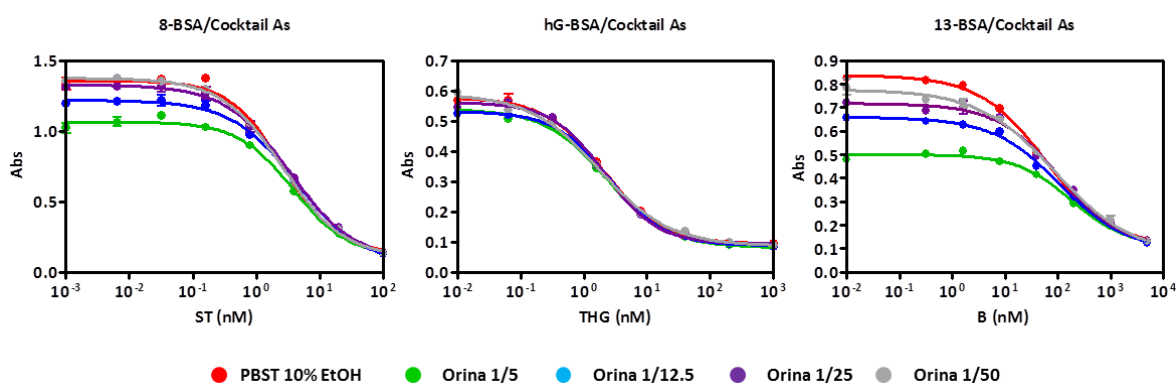


Figura 3.12: Corbes de calibratge en PBST 10%EtOH i en l'orina hidrolitzada i diluïda amb PBST obtingudes amb l'assaig multianalític en cada una de les diferents zones de la microplaca (zona ST, zona THG i zona B).

Com es pot observar en la Figura 3.12, l'orina no afectava la determinació de la THG, obtenint a la zona THG corbes de calibrat en tampó i en orina pràcticament superposades, per tant, aquest assaig permetria la quantificació d'una mostra d'orina diluïda 1/10 utilitzant la corba estàndard en tampó. Aquest resultat corroborava els resultats prèviament obtinguts pel Dr. Salvador per a la detecció de THG emprant l'assaig individual en orina humana¹⁵². Pel que fa referència a la determinació de ST, sí que s'observà efecte matriu, però podent ser eliminat al diluir la mostra 25 vegades en PBST 10% EtOH. Mentre que per a la determinació de la B, s'observà molt efecte matriu, no podent ser eliminat ni tan sols diluint la mostra 50 vegades.

Taula 3.5: Límits de detecció obtinguts amb l'assaig ELISA multianalit al aplicar-ho a l'anàlisi d'orina humana.

Analit	Immunoreactius	Dilució Mostra ^a	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$) ^b
ST	Còctel_As/8-BSA	1/25	4.43
THG	Còctel_As /hG-BSA	1/5	0.54
B	Còctel_As/13-BSA	1/5	17.8

^aLes mostres d'orina es van sotmetre a un procediment d'hidròlisi per tal d'alliberar els possibles conjugats, i posteriorment es van extreure amb toluè. L'extracte un cop sec es va resuspendre amb PBST amb un 10% d'etanol i es va diluir apropiadament amb aquest mateix tampó.

^bEl límit de detecció (LOD) emprat ha estat la IC₉₀ que és aquella concentració d'analit necessària per inhibir un assaig immunoenzimàtic competitiu fins obtenir el 90% de l'absorbància màxima.

Així doncs, l'ELISA multianalit desenvolupat podia ser emprat per a l'anàlisi de ST i THG en orina hidrolitzada diluïda 1/25 i 1/5 en PBST 10% (v/v) d'etanol, respectivament, però no per a la detecció de B, ja que diluint la mostra només 5 vegades, que és el mínim que requereix aquest tractament de mostra, el límit de detecció ja seria superior al MRPL, actualment establert en un valor de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ per la WADA (vegeu Taula 3.5). Cal destacar que tot i no complir els límits de detectabilitat recomanats per la WADA per a la B, en el cas del ST i la THG, en ambdós casos, els valors de detectabilitat assolida en orina humana són molt millors que els $100 \mu\text{g L}^{-1}$ que utilitza el *microarray* desenvolupat per Du i col·laboradors per determinar si una hormona està present o no en la mostra¹⁵⁵. Una possible alternativa per millorar la detectabilitat per a la detecció de B, podria ser fent ús de l'extracció amb fase sòlida (*solid phase extraction*, SPE) per tal de purificar millor la mostra i així reduir més l'efecte matriu; per exemple, utilitzant la fase reversa (*reverse phase*, RP) o els immunosorbents (IS), essent més específics aquests últims. Ambdós procediments foren avaluats prèviament pel Dr. Salvador amb èxit; la SPE-RP fou emprada per la detecció de ST i els seus metabòlits en orina humana¹⁵⁰, mentre que els IS, foren emprats per a la detecció dels mateixos analits¹⁵¹, a més de per la determinació de B i MB en orina bovina obtenint límits de detecció per aquest últims de 2.1 i 1.5 ng/mL, respectivament⁹⁷. Una altra alternativa podria ser la d'utilitzar la pròpia orina com a solució per preparar els calibradors, si no fos pel fet de que aquesta matriu presenta una elevada variabilitat en la seva composició entre individus, però també per a un mateix individu depenent del moment de recollida de la mostra. És per aquest fet, que es considerà la introducció d'una etapa de purificació com la millor alternativa, a més, avalada pels resultats

prèviament obtinguts durant l'aplicació de l'ELISA de B a l'anàlisi d'orina bovina. Malgrat tot, aquesta opció no es va seguir estudiant en el context d'aquesta tesi doctoral, sinó que es va optar per seguir endavant, per tal d'obtenir el nostre objectiu final que era el desenvolupament d'una plataforma universal d'anàlisi mitjançant l'estratègia DDI.

3.2.5 Publicacions relacionades

3.2.5.1 Article 1: *Multiplexed Immunoassay to Detect Anabolic Androgenic Steroids in Human Serum.* N. Tort, J.P. Salvador and M.P. Marco. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012, 1-11.

Resum de l'article: En aquest article es recull un procediment per a l'anàlisi de mostres de sèrum humà que puguin estar contaminades amb hormones anabolitzants mitjançant un ELISA multianalític en format indirecte. Aquest mètode permet la detecció i quantificació simultània de fins a 11 hormones anabolitzants, aprofitant els diferents perfils d'especificitat de 3 anticossos policlonals mesclats en un únic còctel i realitzant la identificació fent ús d'una codificació espacial, al immobilitzar 3 competidors (proteïnes haptenitzades) per estanozolol (ST), boldenona (B) i tetrahydrogestrinona (THG), en zones diferenciades d'una microplaca (zona ST, zona THG i zona B). El protocol es basa en primer lloc, en eliminar les proteïnes del sèrum mitjançant una simple precipitació amb etanol, i a continuació l'anàlisi amb l'ELISA multianalític. L'exactitud d'aquest mètode ha estat demostrada al mesurar mostres fortificades amb les hormones estanozolol, boldenona i tetrahydrogestrinona de forma individual o combinant-les per fer mostres binàries i ternàries. Els valors de detectabilitat aconseguits compleixen els requeriments establerts per la WADA, que marca el límit mínim de funcionament exigint (MRPL) en 10 ng mL^{-1} per a la detecció del compost inicial o del principal metabòlit (actualment el límit ha canviat i és de 5 ng mL^{-1}).

Multiplexed immunoassay to detect anabolic androgenic steroids in human serum

Nuria Tort · J.-Pablo Salvador · M.-Pilar Marco

Received: 12 December 2011 / Revised: 17 February 2012 / Accepted: 24 February 2012 / Published online: 24 March 2012
© Springer-Verlag 2012

Abstract A multianalyte enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) has been developed for the simultaneous detection of anabolic androgenic steroids (AAS) in human serum. The multiplexed method was developed according to a planar strategy in which the analytes are identified by their location in the microtiter plate. In the immunochemical procedure established here, human serum samples are mixed with a cocktail of antibodies and added to the distinct sections of a microplate biofunctionalized with different haptenized biomolecules. The cocktail of antibodies consists of a mixture of polyclonal antibodies raised against stanozolol (ST), boldenone (B), and tetrahydrogestrinone (THG). The whole immunochemical analytical procedure takes around 2 h including sample preparation, and many samples can be processed simultaneously to screen for the presence of the three AAS in a single run. Using this ELISA, ST, B, and THG can be detected and quantified individually. When used as a screening method, due to the cross-reactivity profiles of the immunoreagents used, the presence of up to 11 AAS can be detected simultaneously. The detectabilities achieved by this method in human serum are below the MRPLs (minimum required performance limits) proposed by WADA (World Anti-Doping Agency) and reference laboratories of the European Community.

Keywords Anabolic-androgenic steroids (AAS) · ELISA · Multianalyte · Human serum

Introduction

Anabolic-androgenic steroids (AAS) are synthetic derivatives of the male endogenous hormone testosterone, which was isolated, identified, and synthesized in the 1930s by Butenandt and Ruzicka [1]. Like testosterone, AAS have both anabolic and androgenic effects. The term “anabolic” refers to muscle building, while “androgenic” refers to increased male sexual characteristics. The anabolic properties of AAS have been used in medicine mainly to rebuild protein mass in diseases such as cancer, osteoporosis, anemia, and AIDS, or following severe trauma such as extensive burns, as well as to stimulate bone growth or appetite, or to induce male puberty [2]. Athletes also use steroids in an attempt to improve their performance in competitive sports—at both the professional and amateur levels—due to their ability to increase muscle mass and physical strength [3–6]. However, serious health risks can result from the long-term use of excessive doses of anabolic steroids. These effects include harmful changes in cholesterol levels (increased low-density lipoprotein and decreased high-density lipoprotein), acne, high blood pressure, liver damage, and dangerous changes in the structure of the left ventricle of the heart [7], in addition to alterations of the genitalia, gynecomastia (development of breast tissue in men), depressed mood, and increased thoughts of suicide. The use of AAS in sports was prohibited by the International Olympic Committee in 1976, and WADA (World Anti-Doping Agency) now publishes an annual list of prohibited substances [8, 9]. Anabolic steroids are included in the group S1 of these banned substances, and WADA has defined the minimum

N. Tort · J.-P. Salvador (✉) · M.-P. Marco
Applied Molecular Receptors group (AMRg), IQAC-CSIC,
Jordi Girona 18-26,
08034 Barcelona, Spain
e-mail: jpablo.salvador@iqac.csic.es

N. Tort · J.-P. Salvador · M.-P. Marco
CIBER de Bioingeniería,
Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN),
Jordi Girona 18-26,
08034 Barcelona, Spain

required performance limits (MRPLs) that an analytical method must achieve before it can be used to analyze these compounds [10]. On the other hand, exposure to AAS may also take place through the consumption of contaminated food. Thus, the illegal use of AAS as growth promoters in cattle [11, 12], pigs [13], sheep, horses [14, 15], *etc.* is well known to constitute a risk to human health [16]. In fact, the use of natural and synthetic hormones for growth promotion purposes in meat-producing animals has been prohibited in the European Community since 1996 [17, 18] in order to protect consumers from possible developmental, neurobiological, genotoxic, and carcinogenic effects due to the intake of hormone residues and their metabolites. In 2003, following several studies on six hormones (17 β -estradiol, progesterone, β -testosterone, zeranol, trenbolone acetate, and melengestrol), the EU Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health (SCVPH) confirmed that the use of hormones as growth promoters for cattle presents a potential health risk to consumers [19].

Food safety and doping are monitored by reference and accredited laboratories through the analysis of different types of matrices. The main matrices analyzed to detect these analytes and their metabolites in sportsmen and women are urine and blood [20–23]. Higher steroid concentrations and noninvasive access are the main advantages of urine analysis, but serum, which can easily be obtained from blood, is undoubtedly the most valuable specimen for investigating steroid metabolism and bioavailability. Some other matrices, such as hair [24], have the advantage of long-term detectability of unchanged precursors but present difficulties due to low target concentrations, while alternatives such as sweat present metabolic patterns that vary depending on the body site that the matrix was taken from, making analysis more complex [25]. The techniques most commonly used to detect these analytes are GC/MS [26–33] and HPLC/MS/MS [34–43], utilizing full ion scan or selective ion monitoring modes, which make it possible to develop multidetection methods. Several immunoassays [44–52], immunosensors [53–56], and immunochromatographic test strip assays [47, 57] have been used to detect certain AAS individually or in groups based on the cross-reactivity patterns of the antibodies used. As an example, Lu *et al.* reported an ELISA that is able to detect testosterone, methyltestosterone, 9-nortestosterone, and their metabolites in tenfold-diluted bovine urine, using separate antibodies for each hormone [50]. Hungerford *et al.* reported an ELISA based on the use of polyclonal antibodies with a wide recognition profile for 17 α -alkyl-anabolic steroid metabolites. The steroids are detected in equine urine after hydrolysis of the conjugates followed by solid-phase extraction (SPE) [15]. Recently, the use of innovative microarray formats has also been described. Thus, Du *et al.* reported a microarray for the multiplexed detection of anabolic steroids

in urine with a sensitivity of above 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ [58], but this does not comply with WADA requirements. In this respect, we have recently demonstrated the potential of DNA-directed immobilization (DDI) strategies by developing a site-encoded DNA addressable hapten microarray for the simultaneous detection of several AAS, which achieves LOD values of below 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ in buffer [59].

In this paper, we report a multianalyte ELISA protocol for the detection of anabolic steroids in human serum samples. The assay is based on a site-encoded ELISA microplate; three coating antigens are immobilized at separate sites on the plate (ST-SITE, THG-SITE and B-SITE) and a cocktail of three polyclonal antisera with different reactivity profiles is used. Using this strategy, the AAS present in a sample is identified based on the location of the signal produced on the microplate. This assay allows up to 11 anabolic steroids to be detected simultaneously in a single run at concentrations below the MRPL values established by WADA, and opens the door to the development of other multiplexed immunoassays performed in a microarray format.

Materials and methods

Chemicals and immunochemicals

Stanozolol (ST), boldenone (B), methylboldenone (MB), testosterone (T), and gestrinone (G) were purchased from Sequoia Research Products, Ltd. (Oxford, UK). Other chemical reagents were purchased from Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, USA). Tetrahydrogestrinone (THG) was synthesized in our laboratory [52]. Immunochemical reagents were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). The immunoreagents for the detection of ST [51] (8-BSA and As147), THG [52] (hG-BSA and As170), B (13-BSA and As138) and MB (14-BSA and As143) were produced in the laboratory. The cocktail As consisted of a combination of the selected antisera (As147, As170, and As138) diluted in PBST at the concentrations shown in Table 1. The stock solutions of the analytes used as standards or cross-reactants were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) at 10 mM and stored at 4 °C.

Solutions

PBS was 0.01 M phosphate buffer in a 0.8 % saline solution (137 mmol L⁻¹ NaCl, 2.7 mmol L⁻¹ KCl) at pH 7.5. PBST was PBS with 0.05 % Tween 20. PBST-I was PBS with 0.005 % Tween 20. PBST-II was PBS with 0.005 % Tween 20 and 10 % ethanol. Coating buffer was 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6. Citrate buffer was a 0.04 M solution of sodium citrate, pH 5.5. The substrate solution

Table 1 List of parameters for the individual assays and the multianalyte ELISA test^a

Analyte	Stanozolol (ST)		Boldenone (B)		Tetrahydrogestrinone (THG)	
	Individual	Multianalyte ^b	Individual	Multianalyte ^b	Individual	Multianalyte ^b
Coating antigen, (µg mL ⁻¹)	8-BSA (0.03125)		13-BSA (0.125)		hG-BSA (0.0625)	
Antibody (dilution)	As147 (1/48000)		As138 (1/64000)		As170 (1/32000)	
Assay configuration	Individual	Multianalyte ^b	Individual	Multianalyte ^b	Individual	Multianalyte ^b
Amax	1.04 ± 0.03	0.83 ± 0.04	1.45 ± 0.33	1.18 ± 0.16	0.88 ± 0.14	0.63 ± 0.06
Amin	0.02 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.05 ± 0.03	0.08 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.12 ± 0.01
IC ₅₀ (µg L ⁻¹)	0.16 ± 0.06	0.22 ± 0.02	5.9 ± 2.9	9.75 ± 3.62	0.45 ± 0.14	0.25 ± 0.05
LOQ (µg L ⁻¹)	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01	2.44 ± 0.65	3.11 ± 1.12	0.14 ± 0.03	0.07 ± 0.02
LOD (µg L ⁻¹)	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.23 ± 0.05	0.34 ± 0.10	0.045 ± 0.015	0.03 ± 0.01
Slope	-1.07 ± 0.08	-0.92 ± 0.07	-0.70 ± 0.04	-0.61 ± 0.05	-0.9991 ± 0.14	-0.96 ± 0.09
R ²	0.991 ± 0.008	0.99 ± 0.01	1.00 ± 0.01	0.99 ± 0.01	0.992 ± 0.004	0.99 ± 0.01

^a The table shows the parameters of each immunochemical assay as well as those of the multianalyte ELISA. The parameters are extracted from the four-parameter logistic equation used to fit the standard curves. Each standard concentration was measured on three-well replicates. The values shown are the averages and standard deviations of assays run on three different days. ^b The multianalyte ELISA was performed on a microplate divided into three sections coated with the corresponding coating antigen. The standards were mixed with a cocktail of antiserum (cocktail As) and added to the corresponding sections. A specific dose-dependent response was obtained on each section

contained 0.01 % TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) and 0.004 % H₂O₂ in citrate buffer.

Instrumentation

The pH values and the conductivities of all buffers and solutions were measured with a pH 540 GLP pH meter and a LF 340 conductimeter, respectively (WTW, Weilheim, Germany). Polystyrene microtiter plates were purchased from Nunc (Maxisorp, Roskilde, Denmark). Washing steps were performed on a SLY96 PW microplate washer (SLT Labinstruments GmbH, Salzburg, Austria). Absorbances were read at 450 nm on a SpectramaxPlus (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). The competitive curves were analyzed with a four-parameter logistic equation using the software Softmax-Pro v4.7 (Molecular Devices) and GraphPad Prism v4 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Unless otherwise indicated, each data value presented is the average of the values from at least two well replicates.

ELISA general protocol

The concentrations of all of the immunoreagents are summarized in Table 1. Microtiter plates were coated with the haptenized protein conjugate at the appropriate concentration in coating buffer (100 µL/well) overnight at 4 °C. The following day, the plates were washed four times with PBST. The different standard solutions or samples were diluted in PBST-I and added to the microtiter plates (50 µL/well), followed by the corresponding solution of the antiserum in PBST-I (50 µL/well), and incubated for 30 min at RT. The plates were washed again as before,

and a solution of anti-IgG-HRP (1/6000 in PBST) was added (100 µL/well) and incubated for 30 min more at RT. After a new washing step, the substrate solution was added (100 µL/well) and the enzymatic reaction was stopped after 30 min at RT with 4 N H₂SO₄ (50 µL/well). The absorbances were read at 450 nm. The standard curves were fitted to a four-parameter equation according to the following formula: $Y = [(A - B) / (1 + (x/C)^D)] + B$, where *A* is the maximal absorbance, *B* is the minimum absorbance, *C* is the concentration that yields an absorbance that is 50 % of the maximum absorbance (*i.e.*, it is the IC₅₀), and *D* is the slope at the inflection point of the sigmoid curve. The limit of detection (LOD) is defined as the concentration that produces 90 % of the maximum absorbance (IC₉₀), while the limit of quantification (LOQ) is defined as the concentration that produces 80 % of the maximum absorbance (IC₈₀).

Multianalyte ELISA protocol

The multianalyte ELISA was performed by following the same procedure as described above, using a microtiter plate coated with three different haptenized bioconjugates in three distinct sections of the microplate—ST-SITE, THG-SITE, and B-SITE (see Fig. 2)—and a cocktail of antibodies (cocktail As). The concentrations of the immunoreagents used are shown in Table 1. The standards or the samples (diluted in PBST-I) were added to the microplate (50 µL/well), followed by the cocktail As solution (50 µL/well), and the microplate was processed as described in the previous section. The assay was performed in triplicate on six nonconsecutive days to evaluate the intraday and interday precisions in the linear concentration range (IC₂₀ and IC₈₀).

Specificity studies

Standard calibration curves for each steroid were prepared in PBST-I (1 μ M to 0.01 nM for the ST-SITE/THG-SITE and 5 μ M to 0.01 nM for the B-SITE) and measured with the multianalyte ELISA. The cross-reactivity (CR) values were calculated according to the following equation: $[IC_{50}(\text{analyte of interest})/IC_{50}(\text{reference analyte}) \times 100]$. The results shown in Table 3 are the averages obtained by analyzing two wells, and the experiments were repeated over three days.

Human serum samples

Human serum was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Prior to the ELISA, serum proteins were precipitated by adding ethanol at 50 % (v/v) to 100 μ L of serum and shaking the mixture for 15 min. The supernatants, separated by centrifugation, were diluted five times in PBS to achieve 10 % (v/v) of ethanol, and a solution of 5 % (v/v) Tween 20 was added to reach a final concentration of 0.005 %. Further dilutions were made with PBST-II to maintain the ethanol and Tween 20 percentages.

Matrix effect studies

Human serum samples prepared as described above were used to prepare standard curves to test the nonspecific interferences caused by the sample matrix in the multianalyte ELISA test. The matrix effect was evaluated by comparison with the standard curves obtained in PBST-II.

Accuracy and recovery studies

Blind samples were prepared in PBST-II and in human serum (1/10 in PBST-II) and measured using the multianalyte ELISA protocol described above. Analyses were performed in duplicate and analyzed twice on three different days.

Results and discussion

In this study, immunoreagents and immunochemical protocols for ST [51], THG [52], and B/MB [49] that present high detectability and good performance were combined in order to develop a multianalyte ELISA that is able to detect several AAS simultaneously in human serum samples. Depending on the specificity of these assays, combining them could allow the detection of up to 11 AAS.

Affinity studies

The first objective was to check for the absence/presence of cross-recognition between the antisera selected and the

corresponding haptenized proteins that were used to coat the different microplate sections, in order to exclude any contribution from cooperation phenomena to the final signal. To do this, the microplates were divided in an initial study into four different sections coated with distinct haptenized proteins (ST: 8-BSA; THG: hG-BSA; B: 13-BSA; and MB: 14-BSA) and mixed with the different antisera (ST: As147; THG: As170; B: As138; and MB: As143). Upon the binding of more than one kind of antibody to an immobilized coating antigen, the “shared reactivity” would lead to distorted signals that would depend on the different antibody recognitions of that antigen. Thus, testing for the absence/presence of shared reactivity was a critical task. A similar study performed while developing a multianalyte ELISA for antibiotic detection that combined bioreceptors for three different antibiotic families (β -lactams, sulfonamides and fluoroquinolones) did not show any cross-recognition [60], but the risk of cross-recognition was higher in our technique due to the structural similarities between the different steroids. Thus, the multianalyte ELISA was run in order to assess the response of each antiserum in the distinct microplate sections. The results of these studies are shown in Fig. 1 on a scale that is normalized to the maximum signal obtained in the absence of the analyte. As can be observed, As143 (MB) also recognized 8-BSA (ST), probably due to the identical molecular moieties of the immunizing hapten 15 (used to raise As143) and hapten 8 in the areas distant from the linker location. On the other hand, antigen 14-BSA (MB) was recognized not only by As143 (MB) but also by As147 (ST) and As170 (THG). This was attributed to the fact that the immunizing hapten 8 (used to raise antibodies against ST) maximized the recognition of rings C and D, which differ from hapten 14 only in the methyl group at position 17. Moreover, the THG-immunizing hapten has the same spacer arm as hapten 14. As result of these studies, we decided to move forward by using the combinations As147/8-BSA (ST), As170/hG-BSA (THG) and As138/13-BSA (B) to develop the multianalyte ELISA. We decided not to use As143/14-BSA (MB) as, although using it would expand the number of analytes detected, problems arising from the observed shared reactivity effects could make it more complicated to interpret the results. Thus, the plate was divided in three sections: ST-SITE, THG-SITE and B-SITE.

Multiplexed immunoassay

Calibration curves were prepared and run on microplates using the individual and multianalyte protocols. As seen in Fig. 2, the calibration curve obtained for each steroid was identical regardless of whether it was measured in the individual assay or with the multianalyte ELISA using the cocktail As. Similarly, the features of the assays were not significantly affected, as can be observed in Table 1. The variation in the results obtained for replicate calibration

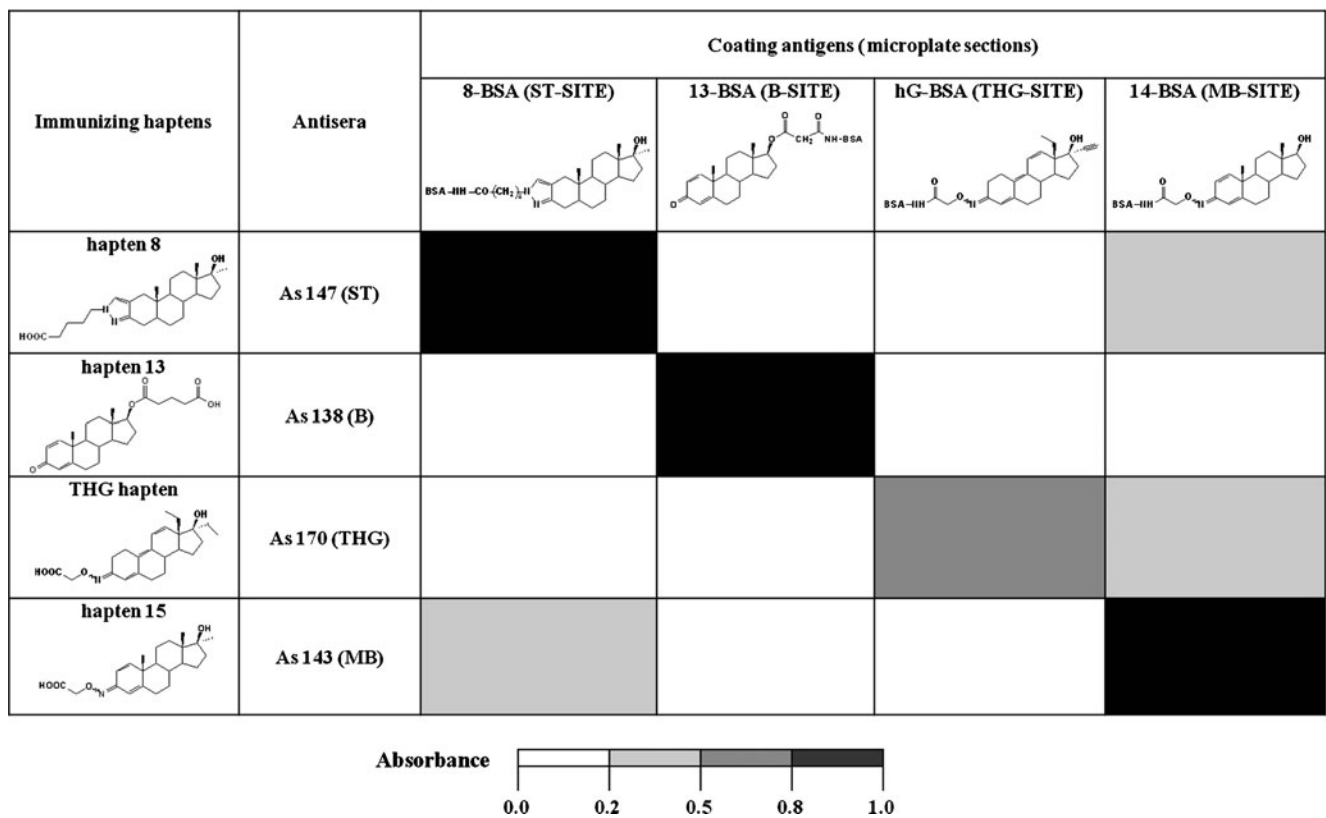


Fig. 1 Affinities of the antisera for the coating antigens

standards with the ELISA multianalyte (see Table 2) were in agreement with proposed guidelines for precision, standardization, and quality control in immunoassays, which establish an acceptable maximum variation of 25 % for the low and high concentration limits, and 15 % for the midpoint (IC₅₀) [61].

Specificity studies

The specificity of the multianalyte ELISA was evaluated to check that the use of the cocktail As had no effect on the

recognition profiles of the individual assays (for a comparison with individual assays, see the previous works [51, 52]). Results demonstrated that the multianalyte ELISA responded selectively in each corresponding section to samples containing a single anabolic-androgenic steroid (*i.e.*, ST, B, or THG) and other steroids that are also used as doping substances or dietary supplements. Table 3 shows the cross-reactivity pattern for this multianalyte ELISA and the steroids detected at the different recognition sites of the microplate. The italicized values indicate the steroids that comply with the requirements of WADA, who define the MRPL value for most anabolic agents as

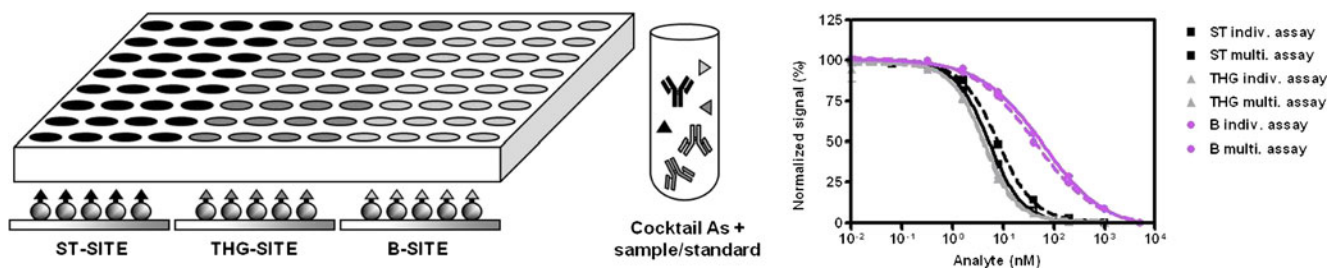


Fig. 2 Left: scheme for the multianalyte ELISA. Different sections of the microtiter plate were coated with the haptenized proteins of the anabolic-androgenic steroids, leading to three response sites: ST-SITE (stanozolol), THG-SITE (tetrahydrogestrinone), and B-SITE (bolde-none). The samples and the standards were mixed with the cocktail As and added to each section of the microplate. Right: graph showing the

standard curves obtained for each analyte (ST, THG, and B) in the corresponding individual immunoassays (*solid line*) and in the multi-analyte ELISA (*dashed line*). A mixture of the standards was mixed with the cocktail As and added to the three sections of the microplate. The dose–response curves were obtained for the respective sections of the microplate

Table 2 Coefficients of variation (CV) obtained with the multianalyte ELISA test using three different concentration levels of the corresponding standard analyte in each microplate location

Precision (%CV)	Concentration	ST-SITE	THG-SITE	B-SITE
Intraassay ^a	IC ₂₀	3	13	13
	IC ₅₀	3	4	9
	IC ₈₀	4	10	8
Interassay ^b	IC ₂₀	10	7	19
	IC ₅₀	9	12	18
	IC ₈₀	20	26	28

^a Each standard concentration was measured in three well replicates.

^b Each standard concentration was measured in three well replicates on six nonconsecutive days

10 µg L⁻¹, although there are some exemptions such as 17β-methyl-5β-androst-1-ene-3α,17α-diol (methylboldenone metabolite), 17α-methyl-5β-androstane-3α,17β-diol (methyltestosterone metabolite) and 3'-hydroxystanozolol (stanozolol metabolite), whose MRPLs are 2 µg L⁻¹. Thus, at the B-SITE, boldenone (IC₅₀: 9 nM), testosterone (IC₅₀: 32 nM), progesterone (IC₅₀: 27 nM) and androstenedione (IC₅₀:

27 nM) were detected with sufficient sensitivity. At the THG-SITE, tetrahydrogestrinone (IC₅₀: 0.3 nM), gestrinone (IC₅₀: 4 nM), norethandrolone (IC₅₀: 2 nM) and methyltestosterone (IC₅₀: 9 nM) were also detected with enough sensitivity to comply with the MRPLs. At the ST-SITE, methylboldenone (IC₅₀: 21 nM), norethandrolone (IC₅₀: 16 nM), and methyltestosterone (IC₅₀: 8 nM), in addition to ST (IC₅₀: 1 nM) and its main metabolites 16β-OH-ST (IC₅₀: 27 nM) and 3'-OH-ST (IC₅₀: 28 nM), could also be detected with sufficient sensitivity, although the sensitivity achieved for the metabolite 3'-hydroxystanozolol (3'-OH-ST) was higher than the defined maximum limit. Therefore, the multianalyte ELISA developed here was able to detect a significant number of AAS with a sensitivity that complied with WADA's requirements. In the case of ST, it was also possible to investigate the ability of the method to detect relevant metabolites such as 16β-OH-ST (more abundant in cattle) and 3'-OH-ST (the main metabolite in human samples) [62, 63], but it could be that THG and B metabolites were also detected with this assay. Further studies that utilize AAS metabolite standards are needed to probe this possibility. Among all of the steroids investigated in this study, approximately 11 were detected at levels below the MRPLs established by WADA.

Table 3 Immunochemical responses provided by different steroids at the different sites on the microplate of the AAS multianalyte ELISA^a

Analytes	Immunoreactivity					
	ST-SITE ^b		B-SITE ^c		THG-SITE ^d	
	IC ₅₀ (nM)	CR (%)	IC ₅₀ (nM)	CR (%)	IC ₅₀ (nM)	CR (%)
Stanozolol	1	100	>1000	<0.9	91	0.3
Norstanozolol	33	3	>1000	<0.9	>1000	<0.03
16β-OH-stanozolol	27	4	>1000	<0.9	>1000	<0.03
3'-OH-stanozolol	28 ^e	4 ^e	>1000	<0.9	>1000	<0.03
Boldenone	>1000	<0.1	9	100	116	0.2
α-Boldenone	>1000	<0.1	234	4	>1000	<0.03
Methylboldenone	21	5	49	18	135	0.2
Tetrahydrogestrinone	>1000	<0.1	839	1	0.3	100
Gestrinone	>1000	<0.1	>1000	<0.9	4	8
Norethandrolone	16	7	669	1	2	14
Methyltestosterone	8	13	53	16	9	3
Testosterone	333	0.3	32	27	101	0.3
Nandrolone	>1000	<0.1	181	5	>1000	<0.03
Ethynilestradiol	>1000	<0.1	>1000	<0.9	66	0.4
Progesterone	26	4	27	32	>1000	<0.03
Trenbolone	802	0.1	256	3	582	0.05
Estrone	259	0.4	>1000	<0.9	>1000	<0.03
Estradiol	820	0.2	>1000	<0.9	>1000	<0.03
Androstenedione	>1000	<0.1	69	13	>1000	<0.03
Androstadienedione	>1000	<0.1	27	32	>1000	<0.03
Dihydrotestosterone	195	0.5	74	12	>1000	<0.03

^a A calibration curve was constructed for each steroid by preparing solutions at different concentrations (1 µM to 0.01 nM for the ST-SITE/THG-SITE and 5 µM to 0.01 nM for the B-SITE), mixing them with the cocktail As, and adding them to each section of the microplate. The responses were fitted to a four-parameter equation to calculate the IC₅₀ value. ^b Microwells coated with 8-BSA. ^c Microwells coated with 13-BSA. ^d Microwells coated with hG-BSA. The cocktail As consisted of a solution containing a mixture of As147, As170, and As138. The concentrations of the immunoreagents are shown in Table 1. ^e The sensitivity achieved for the metabolite 3'-hydroxystanozolol (3'-OH-ST) was higher than the maximum limit required

Accuracy studies

Accuracy studies were performed by utilizing the multi-analyte ELISA to measure a collection of blind samples prepared in buffer and spiked with the AAS either individually or in binary or tertiary mixtures. In the initial experiments, samples spiked with just one AAS at different concentration levels were analyzed. As it can be observed in Fig. 3, an excellent correlation between the spiked and measured values was obtained. The slope values were always close to 1 and the coefficients of regression were >0.95 . Moreover, blind samples containing mixtures of AAS were also analyzed in order to demonstrate that the method was able to identify the type of steroid present in the sample based on the site on the microplate that shows signal inhibition. The results shown in Table 4 indicate that the method is able to identify the presence of an AAS and individually quantify it in a sample with high accuracy even when other steroids are also present. However, as is generally the case in immunochemical and other biochemical assays, we must always consider that the immunochemical response may be due to the presence of other cross-reactants that are recognized in each particular microplate site (see Table 3). For this reason, the results should always be expressed in immunoreactivity equivalents (i.e., ST, THG, or B IR equiv.) when analyzing real samples. The fact that each microplate site can detect several compounds makes it difficult to unequivocally identify the analyte present in the sample. In this respect, we have recently demonstrated that multivariate data analysis can aid in the identification of the compound present in a sample when data obtained on the responses of an array of assays to this sample are combined. In particular, data obtained with the immunoreagents used here were analyzed by principal component analysis in conjunction with a novel k -nearest line classifier, and the results showed that within

a certain concentration range (~ 0.1 – 300 nM), up to four different steroids can be identified while maintaining a correct detection rate of 90.6 % [64].

Human serum samples

As a preliminary study, we evaluated the potential of this methodology to detect illegal doping by analyzing human serum samples. The effect of nonspecific interferences had already been evaluated, because the complexity of this type of sample could alter the results, as reported previously [65–69]. These interferences can be attributed to the high protein content of the serum (i.e., ~ 50 gL⁻¹), and for this reason we attempted to remove the proteins by precipitation using ethanol as an organic solvent [70]. This method has been used before in our laboratory, with good results [51]. Therefore, human serum samples were treated with absolute ethanol at a concentration of 50 % (v/v), centrifuged, the supernatant was diluted five times with PBS, and the corresponding percentage of Tween 20 was added. This solution represented a serum dilution of 1/10, and it contained 10 % ethanol and 0.005 % Tween20. Further serum dilutions were performed using PBST-II to keep the organic solvent and detergent concentrations constant. Calibration curves were constructed for the AAS in human serum and compared to the same standard curve constructed for the AAS in PBST-II (Fig. 4). For the ST-SITE, a shift in the IC₅₀ value of 50 % and a decrease in the maximum absorbance were observed, but the other sites did not show any shifts. To avoid this effect, the serum could be diluted further or alternatively measured while calibrating the microplate with serum (diluted 1/10 in a buffer with 10 % ethanol and 0.005 % Tween 20) instead of with buffer. Thus, to improve the accuracy, we used the 1/10-diluted serum curve as a standard curve. Using this approach, the limits of detection accomplished in serum with this multi-analyte ELISA were 1.2 ± 0.4 $\mu\text{g L}^{-1}$ (stanozolol), 0.2 ± 0.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ (tetrahydrogestrinone) and 3.0 ± 0.7 $\mu\text{g L}^{-1}$

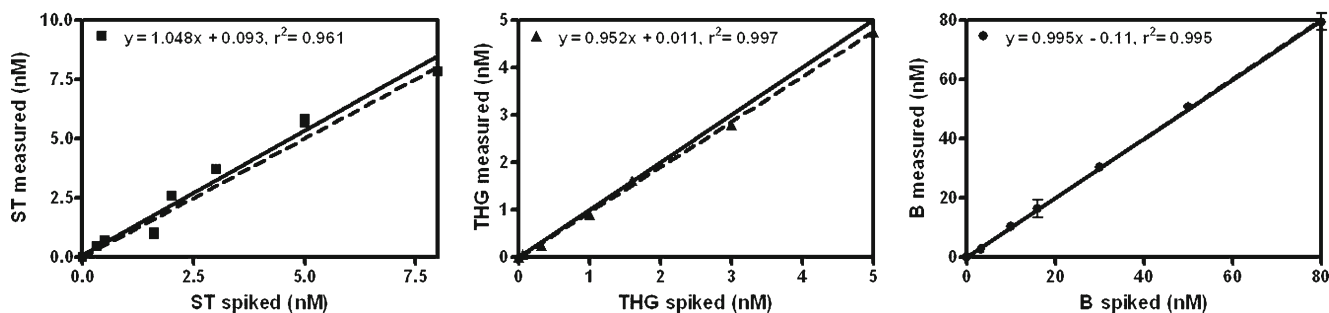


Fig. 3 Graphs showing the results of accuracy studies performed with the multianalyte ELISA in which samples prepared in buffer were analyzed. Each graph shows the correlation between the spiked concentration and the corresponding values measured by the multianalyte

ELISA at the distinct sites (ST, THG, and B). The dashed line corresponds to perfect correlation (slope = 1). Each point is the average and standard deviation of the results obtained from two well replicates and from analyses performed on three different days

Table 4 Results from the analysis of blind spiked samples, prepared in buffer and in human serum, using the multianalyte ELISA

Samples	Measured immunoreactivity (nM)				
	Type	#	ST-SITE	B-SITE	THG-SITE
Buffer ^a	CTR-A		0.42 ± 0.08 (0.5)	- (0)	- (0)
	CTR-B		0.6 ± 0.07 (1)	- (0)	- (0)
	CTR-C		1.6 ± 0.07 (2)	- (0)	- (0)
	CTR-D		- (0)	7.8 ± 0.9 (10)	- (0)
	CTR-E		- (0)	51 ± 5 (50)	- (0)
	CTR-F		- (0)	91 ± 6 (100)	- (0)
	CTR-G		- (0)	- (0)	0.6 ± 0.1 (0.5)
	CTR-H		- (0)	- (0)	0.9 ± 0.1 (1)
	CTR-I		- (0)	- (0)	2.1 ± 0.2 (2)
	CTR-J		1.42 ± 0.04 (2)	7.1 ± 0.8 (10)	- (0)
	CTR-K		1.9 ± 0.2 (2)	10,04 ± 0.09 (10)	2.0 ± 0.2 (2)
	CTR-L		1.7 ± 0.2 (2)	- (0)	2.0 ± 0.1 (2)
	CTR-M		1.0 ± 0.1 (1)	45 ± 2 (50)	- (0)
	CTR-N		0.9 ± 0.2 (1)	55 ± 2 (50)	1.3 ± 0.7 (1)
	CTR-O		- (0)	51.8 ± 0.7 (50)	1.11 ± 0.01 (1)
Human serum ^b	SR-1		0.44 ± 0.03 (0.5)	- (0)	- (0)
	SR-2		0.92 ± 0.03 (1)	- (0)	- (0)
	SR-3		1.75 ± 0.02 (2)	- (0)	- (0)
	SR-4		4.08 ± 0.17 (5)	- (0)	- (0)
	SR-5		- (0)	4.04 ± 0.49 (5)	- (0)
	SR-6		- (0)	18.26 ± 0.37 (20)	- (0)
	SR-7		- (0)	141.5 ± 7.0 (100)	- (0)
	SR-8		- (0)	221.2 ± 60.5 (200)	- (0)
	SR-9		- (0)	- (0)	1.97 ± 0.44 (2)
	SR-10		- (0)	- (0)	4.54 ± 1.07 (5)
	SR-11		- (0)	- (0)	17.41 ± 1.47 (20)

^aControls with known concentrations of each AAS were measured to assess the reliability of the assay. The controls were treated as samples, mixed with the cocktail As, and added to each section of the microplate. ^bHuman serum samples were treated as described in the “Experimental” section to remove proteins, mixed with the cocktail As, and measured with the AAS multianalyte ELISA. The results shown are the averages and standard deviations of results obtained from two wells and experiments repeated on three days. Spiked concentrations appear in parentheses

(boldenone). These limits of detection are all lower than the MRPLs proposed by WADA [10] and the Community Reference Laboratory for food and residue analysis (RIVM) [71] for the detection of anabolic steroids. This strategy allowed us to quantify the AAS in a human serum sample with good accuracy at the three SITES on the microplate. The average recoveries obtained were 107 ± 5 % (stanozolol, $N=3$), 85 ± 5 % (tetrahydrogestrinone, $N=3$), and 99 ± 3 % (boldenone, $N=3$) when measuring blind serum samples spiked with these AAS at three different concentrations.

Accuracy of the multiplexed ELISA with human serum samples

Finally, a battery of blind spiked human serum samples were treated as described above and measured with the multianalyte ELISA in order to probe the reliability of the method. The results of these studies are shown in Table 4. As can be observed, the assay was able to unequivocally identify the AAS present in the sample, and the values measured closely matched the spiked values.

Conclusions

A multianalyte ELISA for screening AAS residues in human serum has been developed using a site-encoded

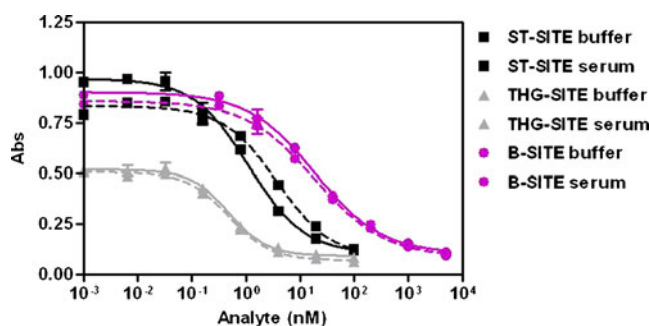


Fig. 4 Graphs showing the calibration curves constructed for the three AAS in PBST-II buffer (*continued line*) and in human serum diluted 1/10 in PBST-II (*dashed line*) for the different microplate sections: ST-SITE (*squares*), THG-SITE (*triangles*), and B-SITE (*circles*). The serum samples were treated with ethanol in order to precipitate the proteins and diluted with buffer before they were analyzed with the multianalyte ELISA

configuration where the identity of the target analyte is derived based on the location of the signal in the detection platform. Human serum samples can be directly measured with the multianalyte ELISA by simple precipitation of the proteins and dilution with buffer. The treated samples are mixed with the cocktail As and added to the microplate. The multiplexed platform described here provides a specific response and good accuracy in approximately 2 h (30 min of sample pretreatment and 1.5 h of assay). The results presented here demonstrate the potential of this multiplexed platform to determine important AAS used illegally in the sporting area and as animal growth promoters. Parallel work has been performed in mathematical data analysis that aimed to improve selectivity by overcoming the problems derived from the potential presence of cross-reactants in the same sample [64]. Moreover, we have also reported preliminary experiments that address the implementation of this multiplexed platform on a microarray using a DNA-directed immobilization approach [59], in order to expand the applicability of the well-established DNA microarray technology.

Acknowledgments This work has been supported by the Ministry of Science and Innovation (MAT2011-29335-C03-01). The AMR group is a consolidated research group (Grup de Recerca) of the Generalitat de Catalunya and has support from the Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació la Generalitat de Catalunya (expedient 2009 SGR 1343). CIBER-BBN is an initiative funded by the VI National R&D&i Plan 2008–2011, Iniciativa Ingenio 2010, Consolider Program, CIBER Actions, and financed by the Instituto de Salud Carlos III with assistance from the European Regional Development Fund. Núria Tort has a FI_B fellowship from the AGAUR (Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca) of the Government of Catalonia (Generalitat de Catalunya).

References

- Ruzicka L (1945) Multimembered rings, higher terpene compounds and male sex hormones (Nobel lecture). http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1939/ruzicka-lecture.pdf
- Wilson JD, Griffin JE (1980) The use and misuse of androgens. *Metabolism* 29(12):1278–1295
- Bahrke MS, Yesalis CE (2004) Abuse of anabolic androgenic steroids and related substances in sport and exercise. *Curr Opin Pharmacol* 4(6):614–620
- Ciocca M (2005) Medication and supplement use by athletes. *Clin Sports Med* 24(3):719–738
- Hall RC (2005) Abuse of supraphysiologic doses of anabolic steroids. *South Med J* 98(5):550–555
- Yesalis CE, Bahrke MS (2000) Doping among adolescent athletes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 14(1):25–35
- Maravelias C, Dona A, Stefanidou M, Spiliopoulou C (2005) Adverse effects of anabolic steroids in athletes: a constant threat. *Toxicol Lett* 158(3):167–175
- Mukhopadhyay R (2007) Catching doping athletes. *Anal Chem*:5522–5528
- WADA (2010) The 2010 prohibited list: international standard. http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-Prohibited-list/WADA_Prohibited_List_2010_EN.pdf
- WADA (2010) Minimum required performance limits for detection of prohibited substances. http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-IS-Laboratories/WADA_TD2010MRPLv1.0_Minimum%20Required%20Performance%20Levels_Sept%202010%202010_EN.pdf
- Ferretti G, Palleschi L, Marchiafava C, Fd Q, Fantozzi L, Ferranti C, Cammarata P, Macri A, Montesissa C, Draisci R (2007) Excretion profile of boldenone and its metabolites after oral administration to veal calves. *Anal Chim Acta* 589(2):269–274
- Gallina G, Ferretti G, Merlanti R, Civitareale C, Capolongo F, Draisci R, Montesissa C (2007) Boldenone, boldione, and milk replacers in the diet of veal calves: the effects of phytosterol content on the urinary excretion of boldenone metabolites. *J Agric Food Chem* 55(20):8275–8283
- Tang H, Vasselli JR, Tong C, Heymsfield SB, Wu EX (2009) In vivo MRI evaluation of anabolic steroid precursor growth effects in a guinea pig model. *Steroids* 74(8):684–693
- Dehennin L, Bonnaire Y, Plou P (2002) Human nutritional supplements in the horse: comparative effects of 19-norandrostenedione and 19-norandrostenediol on the 19-norsteroid profile and consequences for doping control. *J Chromatogr B* 766(2):257–263
- Hungerford NL, Sortais B, Smart CG, McKinney AR, Ridley DD, Stenhouse AM, Suann CJ, Munn KJ, Sillence MN, McLeod MD (2005) Analysis of anabolic steroids in the horse: development of a generic ELISA for the screening of 17[alpha]-alkyl anabolic steroid metabolites. *J Steroid Biochem Mol Biol* 96(3–4):317–334
- Buiarelli F, Cartoni G, Coccioli F, Merolle M, Neri B (2004) Excretion study of stanozolol in bovine by HPLC–tandem mass spectrometry. *Chromatographia* 60(9):545–551
- EC (1996) Directive 96/23/EC. *Off J Eur Commun L* 125:3
- EC (1996) Council directive 96/22/EC. *Off J Eur Commun L* 125:1–14
- SCVPH (1999) Report of the Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health (European Commission DG XXIV), 30 April 1999. European Commission, Brussels
- Birkeland KI, Hemmersbach P (1999) The future of doping control in athletes—issues related to blood sampling. *Sports Med* 28(1):25–33
- Carlstrom K, Palonek E, Garle M, Oftebro H, Stanghelle J, Bjorkhem I (1992) Detection of testosterone administration by increased ratio between serum concentrations of testosterone and 17-alpha-hydroxyprogesterone. *Clin Chem* 38(9):1779–1784
- Palonek E, Gottlieb C, Garle M, Bjorkhem I, Carlstrom K (1995) Serum and urinary markers of exogenous testosterone administration. *J Steroid Biochem Mol Biol* 55(1):121–127
- Peng SH, Segura J, Farre M, Gonzalez JC, de la Torre X (2002) Plasma and urinary markers of oral testosterone undecanoate misuse. *Steroids* 67(1):39–50
- Kintz P (2003) Testing for anabolic steroids in hair: a review. *Legal Med* 5(Supplement 1):S29–S33
- Thieme D, Anielski P, Grosse J, Sachs H, Mueller RK (2003) Identification of anabolic steroids in serum, urine, sweat and hair: comparison of metabolic patterns. *Anal Chim Acta* 483(1–2):299–306
- Aman C, Pastor A, Cighetti G, de la Guardia M (2006) Development of a multianalyte method for the determination of anabolic hormones in bovine urine by isotope-dilution GC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem* 386(6):1869–1879
- Dubois M, Taillieu X, Colemonts Y, Lansival B, De Graeve J, Delahaut P (1998) GC-MS determination of anabolic steroids after multi-immunoaffinity purification. *Analyst* 123(12):2611–2616
- Impens S, Van Loco J, Degroot JM, De Brabander H (2007) A downscaled multi-residue strategy for detection of anabolic steroids in bovine urine using gas chromatography tandem mass spectrometry (GC-MS3). *Anal Chim Acta* 586(1–2):43–48
- Kootstra PR, Zoontjes PW, van Tricht EF, Sterk SS (2007) Multi-residue screening of a minimum package of anabolic steroids in urine with GC-MS. *Anal Chim Acta* 586(1–2):82–92

30. Rambaud L, Monteau F, Deceuninck Y, Bichon E, Andre F, Le Bizec B (2007) Development and validation of a multi-residue method for the detection of a wide range of hormonal anabolic compounds in hair using gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 586(1–2):93–104
31. Stanley SMR, Smith L, Rodgers JP (1997) Biotransformation of 17-alkylsteroids in the equine: gas chromatographic–mass spectral identification of ten intermediate metabolites of methyltestosterone. *J Chromatogr B* 690(1–2):55–64
32. Van Ginkel LA, Stephany RW, Van Rossum HJ, Steinbuch HM, Zomer G, Van de Heeft E, De Jong APJM (1989) Multi-immunoaffinity chromatography: a simple and highly selective clean-up method for multi-anabolic residue analysis of meat. *J Chromatogr B* 489(1):111–120
33. Van Thuyne W, Van Eenoo P, Delbeke FT (2008) Implementation of gas chromatography combined with simultaneously selected ion monitoring and full scan mass spectrometry in doping analysis. *J Chromatogr A* 1210(2):193–202
34. Blasco C, Van Poucke C, Van Peteghem C (2007) Analysis of meat samples for anabolic steroids residues by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1154(1–2):230–239
35. Deventer K, Eenoo PV, Delbeke FT (2006) Screening for anabolic steroids in doping analysis by liquid chromatography/electrospray ion trap mass spectrometry. *Biomed Chromatogr* 20(5):429–433
36. Draisci R, Palleschi L, Ferretti E, Lucentini L, delli Quadri F (2003) Confirmatory analysis of 17[beta]-boldenone, 17[alpha]-boldenone and androsta-1,4-diene-3,17-dione in bovine urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 789(2):219–226
37. Guan F, Uboh CE, Soma LR, Luo Y, Rudy J, Tobin T (2005) Detection, quantification and confirmation of anabolic steroids in equine plasma by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 829(1–2):56–68
38. Nielen MWF, Lasaroms JJP, Mulder PPJ, Van Hende J, van Rhijn JHA, Groot MJ (2006) Multi residue screening of intact testosterone esters and boldenone undecylenate in bovine hair using liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 830(1):126–134
39. Pozo OJ, Deventer K, Van Eenoo P, Delbeke FT (2008) Efficient approach for the comprehensive detection of unknown anabolic steroids and metabolites in human urine by liquid chromatography–electrospray-tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 80(5):1709–1720. doi:10.1021/ac7020757
40. Shao B, Zhao R, Meng J, Xue Y, Wu G, Hu J, Tu X (2005) Simultaneous determination of residual hormonal chemicals in meat, kidney, liver tissues and milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 548(1–2):41–50
41. Van Poucke C, Van Peteghem C (2002) Development and validation of a multi-analyte method for the detection of anabolic steroids in bovine urine with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 772(2):211–217
42. Xu CL, Chu XG, Peng CF, Jin ZY, Wang LY (2006) Development of a faster determination of 10 anabolic steroids residues in animal muscle tissues by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 41(2):616–621
43. Yu NH, Ho ENM, Leung DKK, Wan TSM (2005) Screening of anabolic steroids in horse urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 37(5):1031–1038
44. Brun EM, Hernandez-Albors A, Ventura R, Puchades R, Maquieira A (2010) Enzyme-linked immunosorbent assays for the synthetic steroid gestrinone. *Talanta* 82(4):1581–1587. doi:10.1016/j.talanta.2010.07.067
45. Fitzpatrick J, Manning B, O’Kennedy R (2004) Enzyme-linked immunosorbent assay-based detection of free trenbolone in bovine bile. *J Agric Food Chem* 52(14):4351–4354. doi:10.1021/jf0352531
46. Hagedorn H-W, Schulz R, Jaeschke G (1994) Identification and verification of the anabolic steroid boldenone in equine blood and urine by HPLC/ELIS. *Biomed Chromatogr* 8(2):63–68
47. Jiang J, Wang Z, Zhang H, Zhang X, Liu X, Wang S (2011) Monoclonal antibody-based ELISA and colloidal gold immunoassay for detecting 19-nortestosterone residue in animal tissues. *J Agric Food Chem* 59(18):9763–9769. doi:10.1021/jf2012437
48. Jiang JQ, Zhang HT, Yao SX, Wang ZL, Wang JH (2011) Production and characterisation of monoclonal antibodies against 19-nortestosterone. *Biomed Environ Sci* 24(2):172–179. doi:10.3967/0895-3988.2011.02.012
49. Kramer K, Hubauer A, Lausterer R, Salvador J-P, Marco M-P (2007) Production of antibodies for the quantitative detection of the anabolically active androgens 17β-boldenone and methylboldenone. *Anal Lett* 40:1461
50. Lu H, Conneely G, Crowe MA, Aherne M, Pravda M, Guilbault GG (2006) Screening for testosterone, methyltestosterone, 19-nortestosterone residues and their metabolites in bovine urine with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Anal Chim Acta* 570(1):116–123
51. Salvador JP, Sánchez-Baeza F, Marco MP (2008) Simultaneous immunochemical detection of stanozolol and the main human metabolite, 3'-hydroxy-stanozolol, in urine and serum samples. *Anal Biochem* 376(2):221–228
52. Salvador J-P, Sanchez-Baeza F, Marco M-P (2007) Preparation of antibodies for the designer steroid tetrahydrogestrinone and development of an enzyme-linked immunosorbent assay for human urine analysis. *Anal Chem* 79(10):3734–3740
53. Conneely G, Aherne M, Lu H, Guilbault GG (2007) Development of an immunosensor for the detection of testosterone in bovine urine. *Anal Chim Acta* 583(1):153–160
54. Conneely G, Aherne M, Lu H, Guilbault GG (2007) Electrochemical immunosensors for the detection of 19-nortestosterone and methyltestosterone in bovine urine. *Sensor Actuat B* 121(1):103–112
55. Kreuzer M, Quidant R, Salvador JP, Marco MP, Badenes G (2008) Colloidal-based localized surface plasmon resonance (LSPR) biosensor for the quantitative determination of stanozolol. *Anal Bioanal Chem* 391(5):1813–1820
56. Kreuzer MP, Quidant R, Badenes G, Marco M-P (2006) Quantitative detection of doping substances by a localised surface plasmon sensor. *Biosens Bioelectron* 21(7):1345–1349
57. Liqiang Liu CP, Jin Z, Chuanlai Xu (2007) Development and evaluation of a rapid lateral flow immunochromatographic strip assay for screening 19-nortestosterone. *Biomed Chromatogr* 21(8):861–866
58. Du H, Lu Y, Yang W, Wu M, Wang J, Zhao S, Pan M, Cheng J (2004) Preparation of steroid antibodies and parallel detection of multianabolic steroid abuse with conjugated hapten microarray. *Anal Chem* 76(20):6166–6171
59. Tort N, Salvador JP, Marco MP, Eritja R, Poch M, Martínez E, Samitier J (2009) Fluorescence site-encoded DNA addressable hapten microarray for anabolic androgenic steroids. *TrAC Trends Anal Chem* 28(6):718–728
60. Adrian J, Pinacho DG, Granier B, Diserens JM, Sánchez-Baeza F, Marco MP (2008) A multianalyte ELISA for immunochemical screening of sulfonamide, fluoroquinolone and β-lactam antibiotics in milk samples using class-selective bioreceptors. *Anal Bioanal Chem* 391:1703–1712
61. Krotky AJ, Zeeh B (1995) Immunoassays for residue analysis of agrochemicals: proposed guidelines for precision, standardization and quality control. *Pure Appl Chem* 67(12):2065–2088
62. Kuuranne T, Kotiaho T, Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE, Leinonen A, Westwood S, Kostianinen R (2003) Feasibility of a liquid-phase microextraction sample clean-up and liquid chromatographic/mass spectrometric screening method for selected

- anabolic steroid glucuronides in biological samples. *J Mass Spectrom* 38:16–26
63. Poelmans S, De Wasch K, De Brabander HF, Van De Wiele M, Courtheyn D, van Ginkel LA, Sterk SS, Delahaut P, Dubois M, Schilt R (2002) Analytical possibilities for the detection of stanozolol and its metabolites. *Anal Chim Acta* 473(1–2):39–47
 64. Calvo D, Tort N, Salvador J, Marco M, Centi F, Marco S (2011) Preliminary study for simultaneous detection and quantification of androgenic anabolic steroids using ELISA and pattern recognition techniques. *Analyst* 136:4045–4052
 65. Nichkova M, Galve R, Marco MP (2002) Biological monitoring of 2,4,5-trichlorophenol (II): evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the analysis of water, urine, and serum samples. *Chem Res Toxicol* 15(11):1371–1379. doi:10.1021/tx025556+
 66. Abad A, Montoya A (1997) Development of an enzyme-linked immunosorbent assay to carbaryl. 2. Assay optimization and application to the analysis of water samples. *J Agric Food Chem* 45(4):1495–1501
 67. Jaeger LE, Jones AND, Hammock BD (1998) Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for atrazine mercapturic acid in human urine. *Chem Res Toxicol* 11(4):342–352
 68. Staimer N, Gee SJ, Hammock BD (2001) Development of a class-selective enzyme immunoassay for urinary phenolic glucuronides. *Anal Chim Acta* 444(1):27–36
 69. Hendriks L, Gielen B, Pottie G, Haesen V, Bagyary S, Raus J (1993) Matrix effects in the radioimmunoassay of estradiol and testosterone in plasma of veal calves and how to avoid them. *Anal Chim Acta* 275(1–2):113–122
 70. Maickel R (1994) In: Hill HM, Wilson, ID, Reid E (eds) *Biofluid and tissue analysis for drugs including hypolipidaemics*. Royal Society of Chemistry, pp 3–16
 71. EC (2005) Summary report for EU CRL-NRL Workshop, 10–12 Oct 2005. RIVM, Bilthoven

3.2.5.2 Article 2: Preliminary study for simultaneous detection and quantification of androgenic anabolic steroids using ELISA and pattern recognition techniques. D. Calvo, N. Tort, J.P. Salvador, M.P. Marco, F. Centi and S. Marco. *Analyst*, 2011 Oct 7;136(19):4045-52.

Resum de l'article: Els resultats obtinguts en la detecció de diversos AAS amb diferents ELISAs individuals, amb perfils de reactivitat creuada característics, han estat emprats conjuntament amb tècniques d'anàlisi de dades amb multivariables, per demostrar la possibilitat de detectar, identificar i determinar la concentració de diferents hormones simultàniament en una mostra problema. En primer lloc, les dades obtingudes en els ELISAs han estat transformades per tal de linealitzar la resposta, i tot seguit han estat processades mitjançant un anàlisi de components principals per tal de reduir el nombre de variables a tres components principals. A continuació, un classificador (*K-nearest line*) ha estat aplicat per tal d'identificar els diferents analits presents en la mostra, i tot seguit, estimar-ne la concentració. Emprant aquesta metodologia ha estat possible la multidetecció de 4 AAS en el rang de concentració de 0.1 a 316.2 nM amb un 90.6% d'encert.

Preliminary study for simultaneous detection and quantification of androgenic anabolic steroids using ELISA and pattern recognition techniques

Daniel Calvo,^{*a} Núria Tort,^{cd} J. Pablo Salvador,^{dc} M.-Pilar Marco,^{cd} Fabiana Centi^{ab} and Santiago Marco^{abd}

Received 11th February 2011, Accepted 24th June 2011

DOI: 10.1039/c1an15114b

A first step towards the multidetection, identification and quantification of anabolic androgenic steroids by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) has been performed in this study. This proposal combines multiple competitive ELISA assays with different cross-reactivity profiles and multivariate data analysis techniques. Data have been analyzed by principal component analysis in conjunction with a novel *K*-nearest line classifier. This proposal allows simultaneous detection of up to four different steroids in the range of concentration from 0.1 to 316.2 nM with a total rate of 90.6% of correct detection, even in the presence of cross-reactivities. A methodology for concentration prediction is also presented with satisfactory results.

Introduction

Anabolic androgenic steroids (AAS) are illegally used as growth promoters in cattle, to increase the performance in athletes and in horse racing.¹ The use of substances having a hormonal action for growth promotion in farm animals was prohibited in 1981 by the European Union (Directive 81/602/EEC). With regard to human sports, every year, the World Antidoping Agency (WADA) publishes a list of prohibited drugs,² where anabolic steroids are included in the S1 group.

As a consequence of the illegal use of the AAS the development of new methodologies for detecting these compounds becomes indispensable in our society. The immunochemical methods provide an accurate measurement with fast results and they can measure simultaneously a large number of samples;^{3,4} in consequence, there is a decrease in the price per analysis. One of the most widely used immunochemical techniques is the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). ELISAs are based on the specific recognition of antigens by specific antibodies; when the antigen is a small molecular weight molecule, like AAS, a competitive format is used. Work with immunoassays helps to reduce the sample preparation time, because matrix effects which usually appear with other types of sensors can be avoided by high dilutions of the sample.⁵ In contrast, the classical techniques based on chromatography coupled to mass spectrometry, GC-MS or LC-MS,^{6–10} used as confirmatory methods for the

detection and identification of these compounds, are more time consuming, because a more complex sample treatment is needed, and are more expensive.

However, the ELISA technique has few disadvantages. Its main problem is the cross-reactivity that appears in the determination of compounds with a very similar structure, like AAS. The fact that one assay can detect several compounds makes it difficult to discriminate which is the analyte present in the sample. However, since different assays may show different sensitivities to different compounds, the use of an array of assays in conjunction with multivariate data analysis opens new doors for the determination and identification of compounds of the same family. At this point, multivariate data analysis can help us to improve the system selectivity and also to perform the multidetection approach. A multianalyte assay brings us advantages such as simplicity, faster measurements, and lower costs compared to performing each assay individually. There are some classical approximations to perform the multidetection using immunoassays techniques,¹¹ but in general these methods avoid the cross-reactivity recognition with a previous optimization of the immunoreagent concentrations. Other types of multidetection strategies are forced to use very specific immunosensors to perform the multidetection with a sequential analysis, a spatial separation of immunosensors¹² or using multiple labels. But in any case, these classical methods of multidetection use a single calibration curve for each analyte.

The multivariate data analysis techniques are usually used for solving problems in the selectivity (due to cross-recognition effects),¹³ as well as to perform multidetection using high dimensionality data^{14,15} (for instance multiple ELISAs). This strategy, that is well-known in artificial olfaction¹⁶ and electronic tongues,¹⁷ uses a unique mathematical model to detect and/or quantify various analytes simultaneously. This approach usually improves the possibilities of single calibrations,¹³ because the

^aIntelligent Signal Processing Group, Department of Electronics, University of Barcelona, Martí i Franques 1, 08028 Barcelona, Spain. E-mail: dcalvo@el.ub.es; Fax: +34 93 402 11 48; Tel: +34 93 403 91 58

^bArtificial Olfaction Group, Institute for Bioengineering of Catalonia, Baldri Reixac 13, 08028 Barcelona, Spain

^cApplied Molecular Receptors Group, IQAC-CSIC, Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain

^dCIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina, Zaragoza, Spain

effect of the cross-reactivity recognition is counteracted in the final mathematical model. In fact, it has been already reported for analysing mixtures of two pesticides using immunosensors.^{18,19}

The development and cross-reactivity characterization of different ELISAs for 24 different AAS have been performed to achieve the final aim of this work, which is to combine some ELISA assays and multivariate data analysis techniques to perform AAS multidetection and quantification.

Regarding data evaluation, here we use a novel pattern classifier. Most of the classical pattern recognition methods assume Gaussian clusters, where sample scatter is due to perturbances and experimental errors. In the current scenario, every class corresponds to an analyte, and the data processing intends to recognise the correct class for a large range of concentrations; in these cases, and in particular for non-linear sensors, the pattern dispersion due to potential variations in concentration of the analyte in the sample under analysis dominates other sources of dispersion and the clusters become elongated and in many occasions curvilinear. If the clusters remain linear, every class can be represented by a different subspace. This is the strategy behind SIMCA classifiers.²⁰ However, for curvilinear clusters this strategy fails. This problem has been already considered by A. Ortega *et al.*²¹ The authors proposed here the use of Self-Organizing Maps followed by a pruning step to build a Minimum Spanning Tree. Here in this work, and following the same ideas, a simplified version is presented. It is an extension of the well-known *K*-Nearest Neighbour, where the prototypes are now lines. This method can be called *K*-Nearest Line (*K*-NL) classifier in analogy.

Experimental

Materials

(a) ELISA. Polystyrene microtiter plates were purchased from Nunc (Maxisorp, Roskilde, Denmark). Washing steps were carried out using a SLY96 PW microplate washer (SLT Labinstruments GmbH, Salzburg, Austria). Absorbances were read using a SpectramaxPlus (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) at a single wavelength mode of 450 nm. The competitive curves were analyzed with a four-parameter equation using the software SoftmaxPro v2.7 (Molecular Devices) and GraphPad Prism v4 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Unless otherwise indicated, data presented correspond to the average of at least two well replicates. Immunochemicals were obtained from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO). Other chemical reagents were purchased from Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI). The immunoreagents for AAS were produced in the laboratory, and were described before. For the detection of St (**8BSA**, **5BSA** and **As147**),^{22,23} for THG (**hG-BSA** and **As170**)²⁴ and the immunoreagents employed in this work for the detection of B (**13BSA** and **As138**) and MB (**15BSA**, **12BSA**, **14BSA** and **As140**, **As142**, **143**) will be described elsewhere.

(b) Buffers. PBS is 10 mM phosphate buffer 0.8% saline solution, and unless otherwise indicated the pH is 7.5. Coating buffer is 50 mM carbonate–bicarbonate buffer pH 9.6. PBST is PBS with 0.05% Tween 20. Citrate buffer is a 40 mM solution of

sodium citrate pH 5.5. The substrate solution contains 0.01% TMB (tetramethylbenzidine) and 0.004% H₂O₂ in citrate buffer.

Analytes

Stanozolol (St), Boldenone (B), a-Boldenone (a-B), Methylboldenone (MB), Androstandiendione (ADD), Methyltestosterone (MT), 19-nortestosterone (NT), Progesterone (P), Testosterone (T), Androstandione (A1), Pregnenolone (Preg), Cholesterol (Ch), Dihydrotestosterone (DHT), Estrone (E1), Dexamethasone (D21P), Norstanozolol (Norst), 16 β -hydroxystanozolol (16OH), 3 β -hydroxystanozolol (3OH), Trenbolone (Tr), Estradiol (E2), Ethynylestradiol (EES), Tetrahydrogestrinone (THG), Gestrinone (G) and Norethandrolone (NEth).

Stanozolol, Boldenone, Methylboldenone, Testosterone and Gestrinone were purchased from Sequoia Research Products, Ltd. (Oxford, UK). Other chemical reagents were purchased from Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI). Tetrahydrogestrinone was synthesized in the laboratory.²⁴

ELISA assay

The ELISAs employed in this work have been optimized, demonstrated and published their applicability before, for St^{22,23} and THG.²⁴ In the case of the assays for the determination of B and MB will be published elsewhere.

(a) General procedure. Microtiter plates were coated with the coating antigens, BSA conjugates (in coating buffer; 100 μ L per well in all cases) overnight at 4 °C. The following day, the plates were washed four times with PBST, and the standard curves prepared (0.064–1000 nM different AAS) were added to the microtiter plates (in PBST; 50 μ L per well) followed by the corresponding dilution of antiserum, previously optimized in the laboratory (in PBST; 50 μ L per well) and incubated for 30 min at RT.^{22–24} The plates were washed again as before, and a solution of anti-IgG-HRP (1/6000 in PBST) was added (100 μ L per well) and incubated for 30 min more at RT. After a new washing step, the substrate solution was added (100 μ L per well) and the enzymatic reaction was stopped after 30 min at RT with 4 N H₂SO₄ (50 μ L per well). The absorbances were read at 450 nm. The standard curves were fitted to a four parameter equation according to the following formula:

$$Y = \left[\frac{(A - B)}{1} - \left(\frac{x}{C} \right)^D \right] + B \quad (1)$$

where *A* is the maximal absorbance, *B* is the minimum absorbance, *C* is the concentration producing 50% of the maximum absorbance (or IC₅₀), and *D* is the slope at the inflection point of the sigmoid curve. The limit of detection (LOD) for a single ELISA is defined as the concentration that produces 90% of the maximum absorbance (IC₉₀).

(b) Cross-reactivity characterization. Stock solutions of different steroidal compounds were prepared (10 mM in dimethylsulfoxide) and stored at 4 °C. Standard calibration curves for each one were prepared by serial dilutions in PBST and measured with the different ELISAs (same procedure as above). The IC₅₀

were determined in the competitive experiments as described above and the cross-reactivity values were calculated according to the following equation:

$$CR = \left[\frac{IC_{50}(\text{Reference_assay})}{IC_{50}(\text{AAS_tested})} \right] \times 100 \quad (2)$$

Dataset description and statistical methods

The pattern recognition proposed in this work has basically three steps: (i) preprocessing, (ii) dimensionality reduction, and (iii) classifier. This section gives a short introduction to the techniques used. In this work, a modified version of *K*-NN²⁵ is presented, specially designed to operate with cluster elongation due to concentration scatter. A description of the procedure is given in this section.

(a) Description of dataset. Two cases with different numbers of ELISAs and analytes were selected in order to study the possibilities of multidetection. The first case consists on use all eight previously characterized ELISA assays. Four analytes (DHT, MB, P and St) at 8 concentrations from 0.03 to 1000 nM were measured twice with these immunoassays. Thus, there were 64 assays in the first case (4 analytes \times 8 ELISAs \times 2 replicates). In the second case, only 4 ELISAs (As138/13BSA, As140/15BSA, As142/15BSA and As147/8BSA) were used for measuring up to 7 AAS, also twice at 8 concentrations from 0.03 to 1000 nM. In this case there were 56 assays (7 analytes \times 4 ELISAs \times 2 replicates).

(b) Data preprocessing. First, the mean of each pair of replicates in the training set was performed. In order to build lines that follow the expected evolution of the patterns due to concentration changes, synthetic samples were obtained by linear interpolation within the available training data. The interpolated patterns correspond to concentrations from 0.03 to 1000 nM with increments of 0.1 (in logarithm units of nM). Thus, there were 46 synthetic samples per ELISA assay (that included the original concentrations).

Next, the logit transformation was applied to linearize the response:²⁶

$$x = \log \left(\frac{y}{1-y} \right) \quad (3)$$

After that, the data were autoscaled before Principal Component Analysis is carried out. Finally, principal component analysis was used to reduce the dimensionality and to visualize data. Thanks to PCA, original dataset is transformed from a high number of variables (up to eight ELISAs) to few numbers of new variables (three principal components). The final number of principal components was selected according to the minimal number of principal components that achieve up to 95% of the total variance.

(c) Classification and quantification. Next, the *K*-nearest line classifier is applied in the principal components space. The novel *K*-nearest line is a supervised method to classify unknown samples and it can also be used for concentration estimation. There is one line per class/analyte that is made up for a dense

sequence of samples with increasing concentrations. In fact, no actual line is built, however due to the density of the interpolated data, one assumes that looking for the nearest neighbour is the same as looking for the nearest line.

The main principle of *K*-NL is to assign the class of one sample by the majority vote of its *k* nearest lines. Using *k* = 1, the classifier *K*-NN was considered as a nearest line approach. The distance used for evaluating the nearest neighbours was the Euclidean distance in the principal component space.

Once the detection of the compound is done, the concentration of the nearest neighbour (it can be a synthetic or real sample) was used to assign the concentration of the test sample. In the interpolation scheme, every synthetic sample has an associated concentration value.

(d) Validation and interpretation of results. In order to evaluate the predictive ability of the classifier, a leave-one-pair-out validation was used. This scheme is due to the use of replicates. If a measurement replicate is let in the training set, the results are always almost perfect for very simple classifiers. Leaving both replicates out of the training set means that the measurement conditions in the validation set are not present in the training set.

This methodology uses all real sample pairs, excluding one pair, as a training set and the excluded sample pair is used as a test set. After that, the model is constructed again using all samples without the next test sample. This process is repeated *N* times, where *N* is the number of test pair samples. In this work, the original samples were used as test samples.

The classification results are presented in the confusion matrix that contains the classification rate per analyte, and the confusions between analytes. If the model predicts perfectly, the confusion matrix will show a diagonal matrix with 100% in its diagonal. To facilitate the interpretation of the results, the rate of the correct classification for each concentration was also calculated.

As mentioned before, this scheme also permits to estimate concentrations. The evaluation of the quantification was performed by plotting the obtained concentrations *versus* the expected concentrations. When the quantification is done correctly, the linear regression of this comparison has values of slope, intercept and correlation near to 1, 0 and 1, respectively.

Data organization, mathematical transformations and graphics were performed using Matlab® R2007a from The Mathworks™. PCA was carried out using the special functions provided by PLS_Toolbox 5.0 from Eigenvector Research Inc. for Matlab use.

Table 1 Details of the ELISA assays employed and their values of IC₅₀ for its target analyte

Assay	Target analyte	As dilution	Coating antigen/ μg mL ⁻¹	IC ₅₀ /nM
As138/13BSA	B	1/64 000	0.0625	23.77
As140/15BSA	MB	1/16 000	0.0625	4.33
As142/15BSA	MB	1/32 000	0.125	0.79
As143/12BSA	MB	1/16 000	0.125	10.51
As143/14BSA	MB	1/16 000	0.5	3.98
As147/5BSA	St	1/2000	0.625	2.60
As147/8BSA	St	1/32 000	0.039	0.38
As170/hG-BSA	THG	1/16 000	0.125	1.39

Table 2 Recognition of anabolic androgenic steroids, expressed by their percentage of cross-reactivity of each ELISA assay

Cross-reactivity (%)								
Compound	As138/13BSA	As140/15BSA	As142/15BSA	As143/12BSA	As143/14BSA	As147/5BSA	As147/8BSA	As170/hG-BSA
St	<2	33	11	104	57	100	100	4
B	100	8	15	<1	<0.4	0.5	0.3	0.5
MB	14	100	100	100	100	21	21	2
a-B	12	<0.4	<0.1	<1	<0.4	— ^a	—	—
ADD	96	2	<0.1	—	—	—	—	<0.1
MT	6	93	75	372	123	55	—	0.5
NT	3	—	—	3	<0.4	<0.2	—	0.7
P	10	<0.4	<0.1	8	<0.4	4	1	3
T	5	3	4	—	19	2	<0.1	<0.1
A1	8	<0.4	<0.1	—	—	—	<0.1	<0.1
Preg	<2	<0.4	4	—	<0.4	—	—	<0.1
Ch	<2	<0.4	<0.1	<1	2	1	—	<0.1
DHT	4	9	2	26	12	4	<0.1	<0.1
E1	<2	15	9	2	<0.4	1	<0.1	<0.1
D21P	—	—	—	<1	<0.4	—	—	—
NorSt	—	—	—	—	—	45	2.5	—
16OH	—	—	—	—	—	18	1.5	—
3OH	—	—	—	—	—	51	2	—
Tr	—	—	—	—	—	1	—	0.5
E2	—	—	—	—	—	1	—	<0.1
EES	—	—	—	—	—	4	—	0.3
THG	—	—	—	—	—	—	—	100
G	—	—	—	—	—	—	—	20
NEth	—	—	—	—	—	—	—	62

^a Not tested.

Results and discussion

ELISA assay

Different ELISA assays have been developed^{22–24} for the determination of AAS. The assays employed in this study are summarized in Table 1. The concentrations of the immunoreagents were previously optimized in the laboratory. The assay As138/13BSA achieved a detectability value (IC_{50}) of 23.77 nM for the determination of Boldenone. Regarding the determination of Methylboldenone, there are different assays with different behaviour: As140/15BSA, As142/15BSA, As143/12BSA and

As143/14BSA, with a detectability of 4.33, 0.79, 10.51 and 3.98 nM, respectively. In the case of the analysis of Stanozolol, we characterized that the assays As147/5BSA and As147/8BSA had an IC_{50} value of 2.60 and 0.38 nM, respectively. Finally, the assay employed for the determination of Tetrahydrogestrinone was As170/hG-BSA with an IC_{50} of 1.39 nM.

Cross-reactivity study

Regarding the cross-reactivity studies, as it can be observed in Table 2, each assay has a different profile of recognition of the different analytes of interest. For instance, it is remarkable that the assay As138/13BSA can recognize B and ADD equally. For the assays developed for MB, it can be observed that the recognition of MT is very similar to MB. Within these assays, the recognition of St is also important, as in the assay of As143/12BSA. In the case of the St ELISAs, a different profile was obtained only changing the coating antigen. For As147/5BSA were obtained cross-reactivity values of 100, 21, 45, 18 and 51% for St, MB, NorSt, 16OH and 3OH, respectively. And, on the

Table 3 Classification results for case 1 (eight different ELISAs and four analytes). A confusion matrix is presented, where the rates of correct answers for each analyte are presented and one can see how the misclassification happens

	Obtained DHT	Obtained MB	Obtained P	Obtained St
Expected DHT	75.0%	12.5%	12.5%	0.0%
Expected MB	0.0%	100.0%	0.0%	0.0%
Expected P	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%
Expected St	12.5%	0.0%	0.0%	87.5%

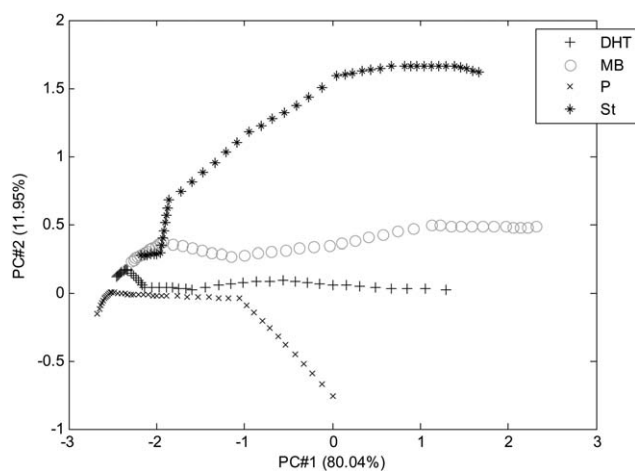


Fig. 1 2D dataset representation consisting of eight different ELISAs and four analytes (case 1). In this graph, the two first principal components are plotted that explain a total variance of 91.99%.

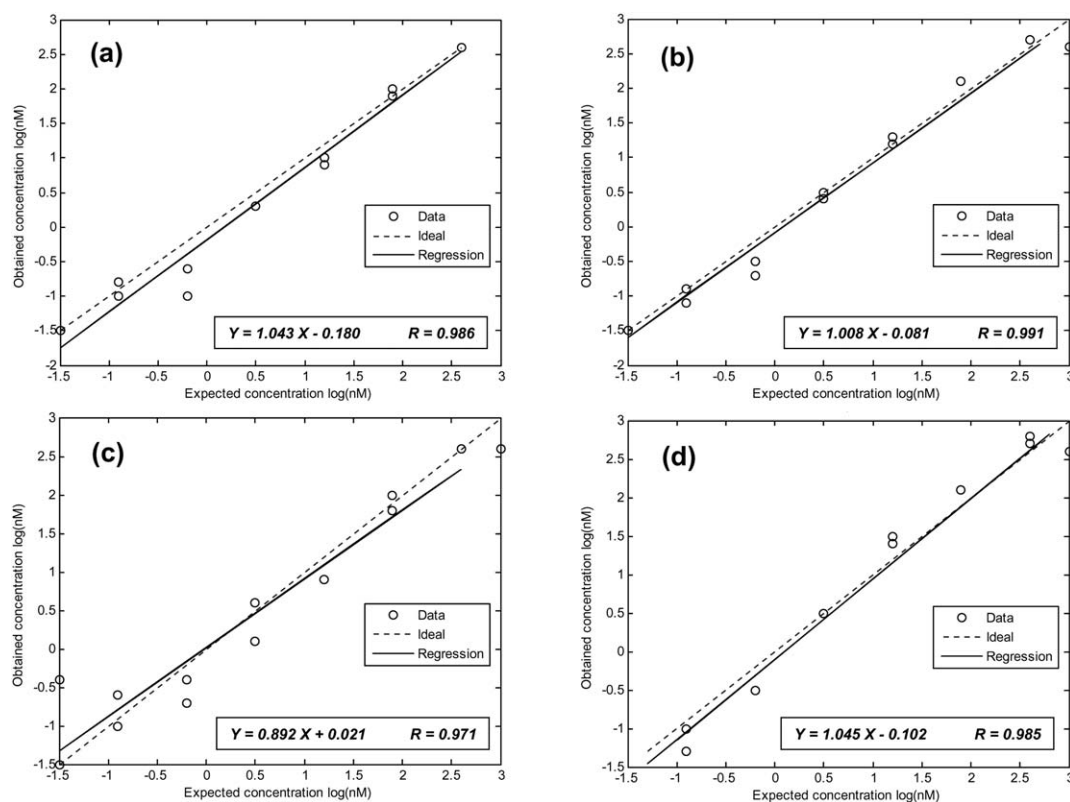


Fig. 2 Quantification results for case 1 (eight different ELISAs and four analytes). Correlations between the obtained and the expected concentrations of DHT (a), MB (b), P (c) and St (d). The dashed line represents the ideal values, the solid one the regression of the obtained vs. expected values.

other hand, for As147/8BSA were obtained 100, 21, 2.5, 1.5 and 2% for the same analytes. In the case of THG detection, a specific assay was obtained, which can only partially recognize *G* and *NEth* with 20 and 62%, respectively.

With a general perspective, one can observe that all assays have cross-reactivity for at least 5 different compounds, which makes difficult the individual detection and quantification of AAS using the classical approach of the single ELISA.

Multianalyte ELISA assay

All ELISAs were performed independently from others. However, the pattern of response is built by grouping the responses of the different ELISAs for the same analyte concentration.

Case 1: four analytes and eight ELISAs procedure. In this case, four analytes (DHT, MB, P and St) and the data from the 8 ELISAs were selected. After data pre-processing, PCA captured 80.04% of the total variance in the first principal component, the second one captured 11.95% and the third captured 5.27%. These three PCs with an accumulated variance of 97.26% were used to perform the *K*-nearest line classifier. Fig. 1 shows the first principal component (PC1) vs. the second principal component (PC2) (also called scores plot) for all synthetic and real samples. It can be clearly observed that PC1 evolution basically reflects the common mode response of the assay to the increase of concentration of the different analytes. In the scores plot, there are two main tendencies: the first with values $PC1 < 1.5$, where different

analytes are overlapped (at low concentrations all assays converge to the same point on the principal component space, since assays do not show response) and the second with higher values of PC1, where we can distinguish visually the analytes. One can see in the scores plot that the samples were distributed as a line per analyte, as expected.

After applying the 1-NL classifier, the total rate of correct classification using leave-one-pair-out validation was 90.6%. As

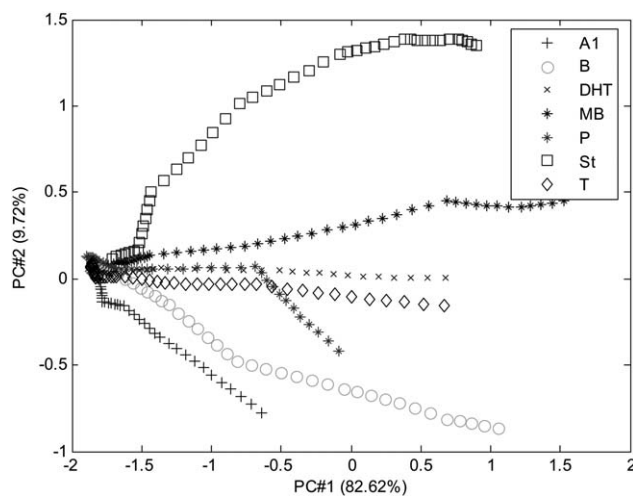


Fig. 3 2D dataset representation consisting of four different ELISAs and seven analytes (case 2). In this graph, the two first principal components are plotted that explain a total variance of 92.34%.

Table 4 Classification results for case 2 (four different ELISAs and seven analytes). A confusion matrix is presented, where the rates of correct answers for each analyte are presented and one can see how the misclassification happens

	Obtained A1	Obtained B	Obtained DHT	Obtained MB	Obtained P	Obtained St	Obtained T
Expected A1	87.5%	0.0%	12.5%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Expected B	0.0%	68.7%	0.0%	0.0%	0.0%	6.3%	25.0%
Expected DHT	18.7%	6.3%	31.2%	0.0%	6.25%	0.0%	37.5%
Expected MB	0.0%	0.0%	0.0%	87.5%	0.0%	0.0%	12.5%
Expected P	0.0%	0.0%	12.5%	0.0%	81.2%	6.3%	0.0%
Expected St	0.0%	6.3%	0.0%	0.0%	12.5%	81.2%	0.0%
Expected T	0.0%	18.7%	18.8%	12.5%	0.0%	0.0%	50.0%

shown in the confusion matrix (Table 3), the samples that had MB and P were correctly classified. The St had a rate of 87.5%, and its confusions are with DHT. The worst classified analyte was DHT that had a 75% of correct classification. DHT is sometimes confused with MB or P.

The combined rate of correct classification for each concentration shows that the classifier fails only at lowest and highest concentrations, with 62% and 75% at values of 0.03 and 1000 nM, respectively. The fault at lowest concentrations can be caused by the overlapping in the scores plot, and at highest concentrations the failure is produced because an extrapolation is done using the leave-one-pair-out strategy (sample falls out of the domain covered by the calibration points). In conjunction, all analytes were well recognised between 0.1 and 316.2 nM with more than 85% of correct answers at each

concentration. According to this concentration range, 0.1 nM can be assigned as the limit of identification using this methodology.

The comparison plots of quantification are presented in Fig. 2, where the concentrations obtained *versus* expected values and their linear regression are presented for all analytes. One can observe that all regressions have good behaviour, near to the ideal. The correlations are higher than 0.97 and the slopes and intercepts are near to 1 and 0, respectively. That confirms that our 1-NL model to perform the quantification works correctly.

An important fact is that the best cross-reactivity values achieved for P and DHT using the immunoassays are 8 and 26%, respectively (see Table 2). Although, using this methodology, P and DHT can be detected correctly, even without a specific ELISA for them.

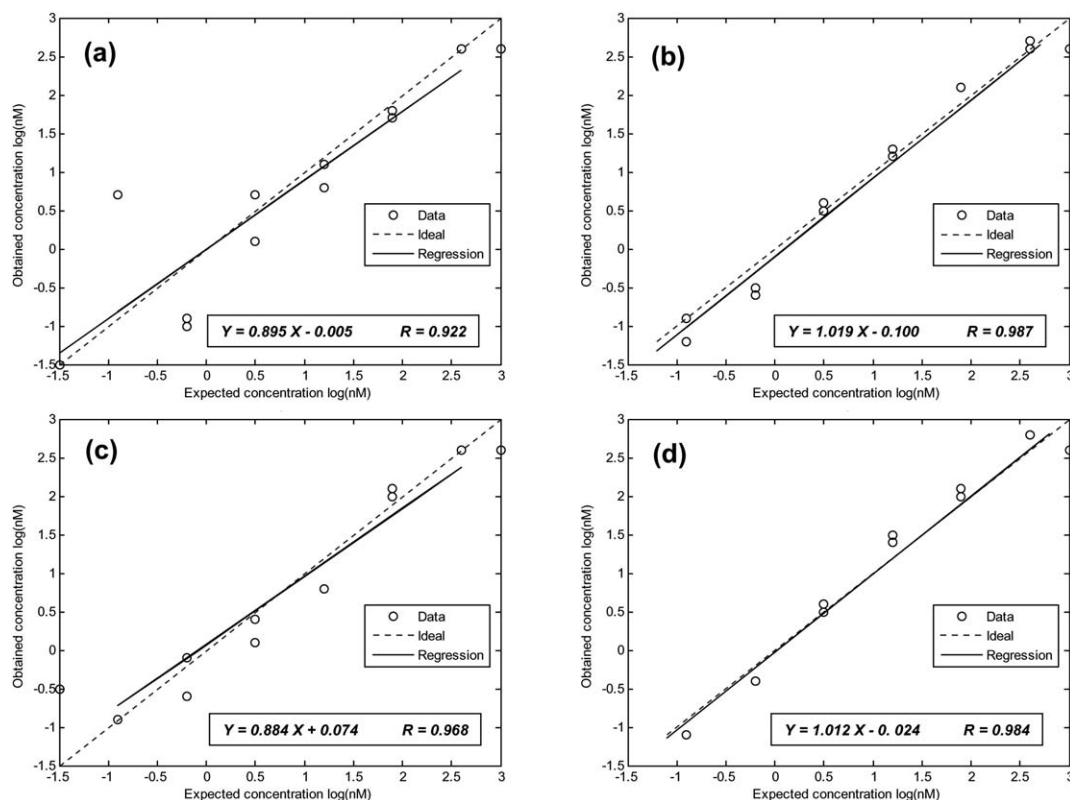


Fig. 4 Quantification results for case 2 (four different ELISAs and seven analytes). Correlations between the obtained and the expected concentrations of A1 (a), MB (b), P (c) and St (d). The dashed line represents the ideal values, the solid one the regression of the obtained *vs.* expected values.

Case 2: seven analytes and four ELISAs procedure. The second selection of data included seven analytes (A1, B, DHT, MB, P, St and T) and four assays (As138/13BSA, As140/15BSA, As142/15BSA and As147/8BSA). The scores plot, where first principal component vs. second principal component are plotted for all samples, is shown in Fig. 3. The 99.21% of the variance of the dataset is captured in the three first components, with the 82.62, 9.72 and 6.87% in the PC1, PC2 and PC3, respectively. We can observe a similar behaviour as in the previous case. At low values of PC1, which corresponds to low concentrations of compounds, an overlapping effect exists for all analytes. However, now there are some overlapped lines at higher concentrations. DHT, MB, P and T lines are quite close to each other in the PC1 vs. PC2 projection.

Once a 1-NL classifier is applied, some of these overlapping lines cause multiple confusions in the detection. The confusion matrix is shown in Table 4, where one can observe that only 4 analytes are well detected (with more than 75% of correct answers): A1, MB, P and St. These compounds are sometimes confused: A1 with DHT; MB with T; P with DHT and St; St with P. The analyte B has obtained 68.8% of correct answers and presents confusions with St and T. The detection of T was performed with 50% of correct answers, and it has quite confusions with B, DHT and MB. Finally, the DHT has a rate of 31.3% of correct detections and presents high confusions with A1, B, P and T.

When the rate of correct classification in function of the concentration was studied, it is shown that the A1, MB, P and St have more than 90% of correct detection from 3.16 nM to the highest concentration, at each value of concentration. Although the results are a bit worse than in the previous case, it is important to note that in this case there are more analytes than sensors.

The results of quantification only for the analytes with more than 75% of correct classification were presented, because when a sample is misclassified, this sample is not taken into account for the quantification evaluation. Analytes with the best classification rates have been selected, in order to have enough samples to build relevant statistical comparison regressions. The comparison results are presented in Fig. 4. The worst behaviour corresponds to the regression of A1 that has a correlation of 0.92 but the parameters for the three other analytes are really near to the ideal.

As well as the previous case, this methodology is able to detect and quantify two AAS that have no specific ELISA assay. These compounds are A1 and P, and their maximum values of cross-reactivity are only 8 and 10% for the ELISAs used (see Table 2).

Conclusions

The ELISA technique had been used in this work to detect and quantify various anabolic androgenic steroids simultaneously. The different recognition profile of eight ELISAs has been evaluated for a variety of steroids. After data preprocessing using statistical tools, the PCA showed the data structure. The structure visualization gave us an idea about if multidetection of AAS was possible and how we could perform it.

The K-Nearest Line procedure was implemented. Line formation was accomplished by producing a dense line

representation by adding synthetic samples between consecutive training samples (once ordered in analyte concentration).

Finally, the multianalyte ELISA approach was performed using a 1-NL classifier and using the leave-one-pair-out validation. Our proposal carried out multidetection and quantification of four different compounds using eight assays in the range from 0.1 to 316.2 nM. The proposed methodology also can be used with few assays, obtaining correct multidetection and quantification of four different compounds in the range from 3.16 to 1000 nM using only three assays.

We can conclude that multidetection and quantification of anabolic androgenic steroids using ELISA data are possible in buffer, even when no specific ELISA is available. Just ELISAs with a wide cross-reactivity profile and multivariate data analysis are needed to be able to perform an identification and quantification of AAS. In the future this method could be used to analyze these substances in real samples, like human sera, because it has been already demonstrated in a previous work²² that with a simple pre-treatment consisting of precipitation of the proteins present in the serum, and then dilution of the sample in the assay buffer, the matrix effect disappears.

Acknowledgements

This work has been supported by the Ministry of Science and Education (Contract No DEP2007-73224-C03-01) and by the CIBER-BBN (MICROPLEX intramural project). CIBER-BBN is an initiative funded by the VI National R&D&i Plan 2008–2011, *iniciativa Ingenio 2010*, Consolider Program, CIBER Actions and financed by the Instituto de Salud Carlos III with assistance from the European Regional Development Fund. The ISP group is a consolidated *Grup de Recerca de la Generalitat de Catalunya* and has support from the *Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació la Generalitat de Catalunya (expedient 2009 SGR 0753)*. The AMR group is a consolidated *Grup de Recerca de la Generalitat de Catalunya* and has support from the *Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació la Generalitat de Catalunya (expedient 2009 SGR 01343)*. D. Calvo thanks the Ministry of Science and Education for his *Juan de la Cierva* grant. Nuria Tort thanks *l'Agència de Gestió i d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR) de la Generalitat de Catalunya* for her FI predoctoral grant.

References

- 1 S. Poelmans, K. De Wasch, H. F. De Brabander, M. Van De Wiele, D. Courtheyn, L. A. van Ginkel, S. S. Sterk, P. Delahaut, M. Dubois, R. Schilt, M. Nielen, J. Vercammen, S. Impens, R. Stephany, T. Hamoir, G. Pottie, C. Van Poucke and C. Van Peteghem, *Anal. Chim. Acta*, 2002, **473**, 39–47.
- 2 WADA, *The 2011 Prohibited list. International Standard*, World Anti-Doping Agency, 2011, <http://www.wada-ama.org/>, accessed 10th January, 2011.
- 3 J. P. Salvador, J. Adrian, R. Galve, D. G. Pinacho, M. Kreuzer, F. Sánchez-Baeza, M. P. Marco and D. Barceló, *Comprehensive Analytical Chemistry*, Elsevier, 2007, vol. 50, pp. 279–334.
- 4 M.-P. Marco, S. Gee and B. D. Hammock, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 1995, **14**, 415–425.
- 5 D. G. Cooke, J. E. Binnie and L. F. Blackwell, *Steroids*, 2007, **72**, 580–591.
- 6 W. Schänzer, P. Delahaut, H. Geyer, M. Machnik and S. Horning, *J. Chromatogr., Biomed. Appl.*, 1996, **687**, 93–108.

- 7 C. Van Poucke and C. Van Peteghem, *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2002, **772**, 211–217.
- 8 H. F. D. Brabander, K. D. Wasch, L. A. van. Ginkel, S. S. Sterk, M. H. Blokland, P. Delahaut, X. Taillieu, M. Dubois, C. J. M. Arts, M. J. van Baak, L. G. Gramberg, R. F. Witkamp, R. Schilt, E. O. van. Bennekom, D. Courtheyn, J. Vercammen and R. F. Witkamp, *Analyst*, 1998, **123**, 2599–2604.
- 9 A. Leinonen, T. Kuuranne, T. Kotiaho and R. Kostianen, *Steroids*, 2004, **69**, 101–109.
- 10 N. Deshmukh, I. Hussain, J. Barker, A. Petroczi and D. P. Naughton, *Steroids*, 2010, **75**, 710–714.
- 11 A. Brecht and R. Abuknesha, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 1995, **14**, 361–371.
- 12 S. Rodriguez-Mozaz, S. Reder, M. Lopez de Alda, G. Gauglitz and D. Barceló, *Biosens. Bioelectron.*, 2004, **19**, 633–640.
- 13 F. J. Acevedo, J. Jiménez, S. Maldonado, E. Domínguez and A. Narváez, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 2010, **100**, 41–47.
- 14 D. Calvo, A. Duran and M. del Valle, *Anal. Chim. Acta*, 2007, **600**, 97–104.
- 15 D. Calvo, A. Durán and M. del Valle, *Sens. Actuators, B*, 2008, **131**, 77–84.
- 16 S. M. Scott, D. James and Z. Ali, *Microchim. Acta*, 2007, **156**, 183–207.
- 17 Y. Vlasov, A. Legin, A. Rudnitskaya, C. Di Natale and A. D'Amico, *Pure Appl. Chem.*, 2005, **77**, 1965–1983.
- 18 G. Jones, M. Wortberg, B. D. Hammock and D. M. Rocke, *Anal. Chim. Acta*, 1996, **336**, 175–183.
- 19 S. Reder, F. Dieterle, H. Jansen, S. Alcock and G. Gauglitz, *Biosens. Bioelectron.*, 2003, **19**, 447–455.
- 20 S. Wold and M. Sjöström, *Chemometrics: Theory and Application*, American Chemical Society, Washington, D.C., 1977, pp. 243–282.
- 21 A. Ortega, S. Marco, T. Sundic and J. Samitier, *Sens. Actuators, B*, 2000, **69**, 302–307.
- 22 J. P. Salvador, F. Sánchez-Baeza and M. P. Marco, *Anal. Biochem.*, 2008, **376**, 221–228.
- 23 J. P. Salvador, F. Sánchez-Baeza and M. P. Marco, *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2010, **878**, 243–252.
- 24 J. P. Salvador, F. Sánchez-Baeza and M. P. Marco, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 3734–3740.
- 25 B. G. M. Vandeginste, D. L. Massart, L. M. C. Buydens, S. De Song, P. J. Lewi and J. Smeyers-Verbeke, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B*, Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1998.
- 26 L. F. Capitán-Vallvey, E. Arroyo-Guerrero, M. D. Fernández-Ramos and L. Cuadros-Rodríguez, *Anal. Chim. Acta*, 2006, **561**, 156–163.

3.3 Resum de les aportacions principals del capítol

- Per primera vegada ha estat possible desenvolupar un ELISA multiplexat per a la detecció d'hormones anabolitzants, capaç de detectar en tampó un nombre important d'AAS per sota dels MRPLs establerts per la WADA. Aquest sistema multiplexat es fonamenta en l'ús d'un còctel d'anticossos i una codificació espacial, assolida mitjançant la immobilització dels antigens de tapissat en diferents zones de la microplaca. Des del punt de vista de la detectabilitat, l'ELISA multianalit desenvolupat en aquesta tesi per la detecció d'AAS en sèrum humà, supera significativament la assolida pel *microarray* desenvolupat prèviament per Du i col·laboradors¹⁵⁵, tot i que en aquest cas s'empraren mostres d'orina. Pel que fa a l'anàlisi d'orina humana amb l'ELISA multianalit, en el cas del ST i la THG, la detectabilitat assolida també és millor a l'assolida en el *microarray* anteriorment esmentat, mentre que per la B, podria millorar amb un tractament de mostra més complex.
- Aquest assaig permet la detecció d'AAS en mostres de sèrum humà, amb un simple tractament previ de la mostra, que consisteix en precipitar les proteïnes del sèrum amb un medi orgànic, tal com s'ha posat de manifest amb els estudis realitzats amb la ST, la B i la THG. Tot el procés, del tractament de la mostra a l'assaig, dura aproximadament 2 hores, per tant es tracta d'un mètode ràpid en comparació amb altres mètodes existents basats en l'ús de tècniques cromatogràfiques. Pel que fa a l'aplicació d'aquest sistema multiplexat a l'anàlisi de mostres d'orina, ha quedat demostrat que l'orina és una matriu molt més complexa i que tot i el pre-tractament aplicat, la detectabilitat es podria veure compromesa pels esteroides que només donen resposta a la zona-B de la microplaca, tal com s'ha posat en evidència per la detectabilitat de la B, al ser necessària una dilució de l'orina d'unes 100 vegades per poder eliminar l'efecte que té aquesta matriu en l'assaig de B. En canvi d'altres esteroides que donen resposta a la zona-ST i a la zona-THG, podrien ser detectats per sota dels MRPLs, tal com s'ha pogut demostrar amb el ST i la THG, pels quals l'ELISA multiplexat mostra un LOD de 4.4 i 0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivament. No obstant, per treure tot el partit possible d'aquest ELISA en mostres d'orina seria necessària la introducció d'una etapa d'extracció en fase sòlida prèvia a l'anàlisi, per tal de poder assolir els nivells de detectabilitat requerits pels organismes reguladors als nous mètodes de detecció per a l'anàlisi d'aquestes substàncies.
- Aprofitant els diferents perfils de reactivitat creuada dels diferents anticossos emprats en el còctel és possible arribar a detectar la presència de fins a 11 hormones anabolitzants simultàniament. Encara que per poder determinar amb certesa quin compost o compostos han estat els causants de la inhibició del color, cal recórrer a l'ús de tècniques quimiomètriques, per tal de a partir del senyal obtingut en les diferents zones d'assaig,

poder fer una estimació de quins compostos i amb quina concentració es troben presents en la mostra. En aquest sentit, el grup Processat de Senyals i Informació per Sistemes Sensors de l'IBEC, liderat pel Prof. Santiago Marco, ha aconseguit mitjançant l'anàlisi de dades amb multivariables i aplicant el classificador *K-nearest line* als resultats obtinguts en la detecció d'un ampli nombre d'hormones amb diferents ELISAs individuals (desenvolupats per a ST, B, MB i THG), la multidetecció, identificació i quantificació de 4 AAS, concretament DHT, MB, P i ST. En aquest treball ha quedat demostrada la gran utilitat d'aquesta metodologia, ja que en el cas de la DHT i de la P, tot i no disposar de cap ELISA selectiu per aquests analits, i amb baixos valors de reactivitat creuada amb els diferents assaigs, essent 26 i 8% els millors valors, respectivament, ha estat possible la seva detecció, identificació i quantificació. La metodologia emprada en aquest treball pot ser de molta utilitat en assaigs multianalit amb codificació espacial, per ajudar en la identificació de compostos quan el senyal ve donat per un mateix marcador.

4. MARCATGE D'IMMUNOREACTIUS I CARACTERITZACIÓ

4.1 Precedents i Objectius del capítol

En el capítol anterior s'ha demostrat la possibilitat de detectar diferents AAS de forma simultània en format ELISA, fent ús d'un còctel d'As i amb els diferents AT immobilitzats en diferents zones d'una microplaca. Aquest resultat ha estat la base per continuar amb les nostres investigacions adreçades a demostrar la possibilitat de desenvolupar una plataforma de diagnòstic multiplexada universal. Com ja s'ha comentat en el capítol de la introducció, l'aproximació seleccionada consistiria en fer ús de l'estratègia DDI per desenvolupar un *microarray* de detecció òptica. Com a prova de concepte, ens centràriem en la detecció dels AAS, motiu pel qual el primer pas va ser demostrar si era possible desenvolupar sistemes de diagnòstic multiplexat en format ELISA per aquestes substàncies.

D'acord amb l'estratègia DDI, una superfície que contingués diferents cadenes d'oligonucleòtids immobilitzades en zones discretes i diferenciades (*microarray* d'ADN), podria ser emprada per a l'anàlisi d'un elevat nombre de substàncies simultàniament, i no només ADN, sinó qualsevol altra biomolècula o substància química, sempre i quan aquesta superfície pogués ser convertida en un *microarray* específic per a la substància en qüestió. Per tal de convertir la superfície universal en una superfície específica, caldria la preparació de sondes específiques, consistents en biomolècules/molècules unides covalentment a cadenes d'oligonucleòtids complementaries a les prèviament immobilitzades en la superfície de detecció, i la posterior immobilització d'aquestes sondes en la superfície a través de la reacció d'hibridació entre les cadenes complementàries. Un dels principals avantatges d'aquesta aproximació és que la mateixa superfície, podria ser reutilitzada per a la detecció de les mateixes o d'altres substàncies, amb una simple etapa de

deshibridació. Per altra banda, la detecció podria ser en base a qualsevol principi de transducció o generació de senyal, però en el nostre cas concret ens hem volgut centrar en principis òptics, com son aquells derivats de les propietats del plasmó superficial de l'or, desenvolupant biosensors de tipus SPR o LSPR, o bé per detecció fluorescent. En el primer cas, els biosensors de tipus SPR o LSPR no necessiten de l'ús de reactius marcats, ja que les propietats físiques del plasmó superficial es veuen afectades directament per les interaccions biomoleculares que es puguin produir a la superfície d'aquest metall noble (per a més informació vegeu l'apartat corresponent a aquest tipus d'immunosensors a la introducció), mentre que en el cas de la detecció fluorescent per a la detecció d'AAS mitjançant un format indirecte competitiu, la detecció es podria dur a terme, o bé fent servir un reactiu secundari de tipus anti-IgG marcat amb un fluoròfor, tal com ja es fa servir amb l'ELISA però amb un enzim (veure capítol 3) o bé marcant els anticossos primaris, per així disminuir el nombre d'etapes de l'assaig i reduir el temps d'anàlisi.

En el cas concret de la detecció d'AAS mitjançant la superfície de diagnòstic universal, la molècula que s'hauria d'immobilitzar sobre la superfície seria l'AT, tal com s'havia fet per l'ELISA multianalit desenvolupat anteriorment (vegeu capítol 3). Per això hagués calgut unir els bioconjugats 8-BSA (ST), hG-BSA (THG) i 13-BSA (B) a diferents cadenes d'oligonucleòtids, però donada la dificultat per preparar sondes de composició definida degut a la mescla de funcionalitats químiques presents en la molècula de BSA, es va optar per preparar aquestes sondes lligant directament els haptens 8 (ST), hG (THG) i 13 (B) a diferents oligonucleòtids.

Així doncs, en aquest capítol s'exposa el treball realitzat per a la preparació i avaluació dels bioconjugats necessaris pel desenvolupament de la plataforma universal per a la detecció d'AAS. En concret, és descriu el desenvolupament d'immunoassaigs fluorescents tipus FLISA (*fluorescent-linked immunosorbent assay*), com una manera d'avaluar el funcionament dels anticossos primaris marcats amb molècules fluorescents (vegeu a continuació l'apartat 4.2.1 i l'Annex 2), i la preparació de les sondes haptè-oligonucleòtid, juntament amb la seva avaluació en un biosensor SPRi (vegeu a continuació l'apartat 4.2.2).

4.1.1 Els fluoròfors

Un fluoròfor és aquella molècula capaç d'absorbir radiació electromagnètica d'una

determinada longitud d'ona i després emetre fotons a longituds d'ona superiors (menys energètiques). Els fluoròfors són generalment hidrocarburs poliaromàtics o heterocicles (sistemes conjugats). Un fluoròfor es pot caracteritzar segons les següents propietats:

A. Propietats espectrals (espectres d'absorció i d'emissió).

Les propietats espectrals d'un fluoròfor venen determinades per la seva estructura molecular i pel seu entorn (dissolvent, pH, *etc.*). El desplaçament de Stokes (*Stokes shift*), que és la diferència (en longitud d'ona o energia) entre la posició del màxim en l'espectre d'absorció i la posició del màxim en l'espectre d'emissió. Sol ser característic de cada fluoròfor.

B. Coeficient d'extinció molar (ϵ) o absortivitat molar.

Es tracta de la capacitat que té un fluoròfor per absorbir llum, i es defineix com la unitat d'absorbància per unitat de concentració, expressada en mols per litre, per unitat de longitud de la trajectòria de llum. D'acord amb la Llei de Beer-Lambert, l'absortivitat és proporcional a la conductivitat del solut absorbent.

$$\text{Abs} = \epsilon c l$$

C. Rendiment quàntic de fluorescència (*Fluorescence quantum yield*, η_{FI}).

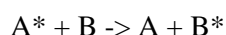
Es defineix com el quocient del nombre de fotons emesos (n_{FI}) i el nombre de fotons absorbits (n_{Abs}).

$$\eta_{\text{FI}} = n_{\text{FI}} / n_{\text{Abs}}$$

D. Temps de vida (*Fluorescence lifetime* (τ_{FI})).

És la mitjana de temps que tarda una molècula que es troba en un estat excitat (S_1) fins que emet un foto i torna a l'estat fonamental (S_0).

Per altra banda, tot i que no sigui una característica intrínseca de cada fluoròfor, es convenient saber que el fotoblanqueig (*photobleaching*) és la pèrdua permanent de la capacitat d'emetre fluorescència d'un fluoròfor. El nº de cicles d'excitació i emissió que poden tenir lloc per un fluoròfor abans de patir fotoblanqueig depèn de la seva estructura molecular, del seu entorn, de la intensitat de la font d'excitació, *etc.* Així com, que la transmissió d'energia per ressonància (*resonance energy transfer*, RET) és un mecanisme de transferència d'energia entre cromòfors, ja siguin fluorescents o no, i que té lloc quan l'espectre d'emissió de la molècula donadora es superposa amb l'espectre d'absorció de la molècula acceptora, sempre i quan les dues molècules estigui molt a prop, entre 10 i 100 Å¹⁷¹.



Una molècula excitada (A^*) passa la seva energia a una altre molècula (B); aquest és un altre fenomen pel qual a vegades el senyal obtingut, en aquest cas fluorescent, a vegades pot ser inferior al teòricament esperat.

Els fluoròfors es poden dividir en dues classes: intrínsecs i extrínsecs. Els fluoròfors intrínsecs són aquells que emeten fluorescència de forma natural. Com a exemple, trobem les proteïnes que presenten fluorescència intrínseca degut al seu contingut en aminoàcids aromàtics, com el triptòfan (trp), la tirosina (tyr) i la fenilalanina (phe). Els grups indols dels residus de triptòfan, que absorbeixen a uns 280 nm i emeten a uns 340 nm, són els que predominen en els espectres d'absorció i d'emissió de les proteïnes¹⁷¹. Per contra, en aquells casos en què la molècula d'interès no és fluorescent o la seva fluorescència intrínseca no és l'adequada per a l'experiment que es pretén realitzar, la fluorescència s'obté unint a la molècula en qüestió un marcador fluorescent extern (fluoròfor extrínsec), ja sigui de forma covalent o a través d'altres mètodes. El nombre de fluoròfors existents ha crescut molt en els últims anys; un ampli ventall de fluoròfors orgànics, útils per al seu ús en per exemple immunoassaigs, es pot trobar a diferents cases comercials (Molecular Probes®, Fluka, *etc*).

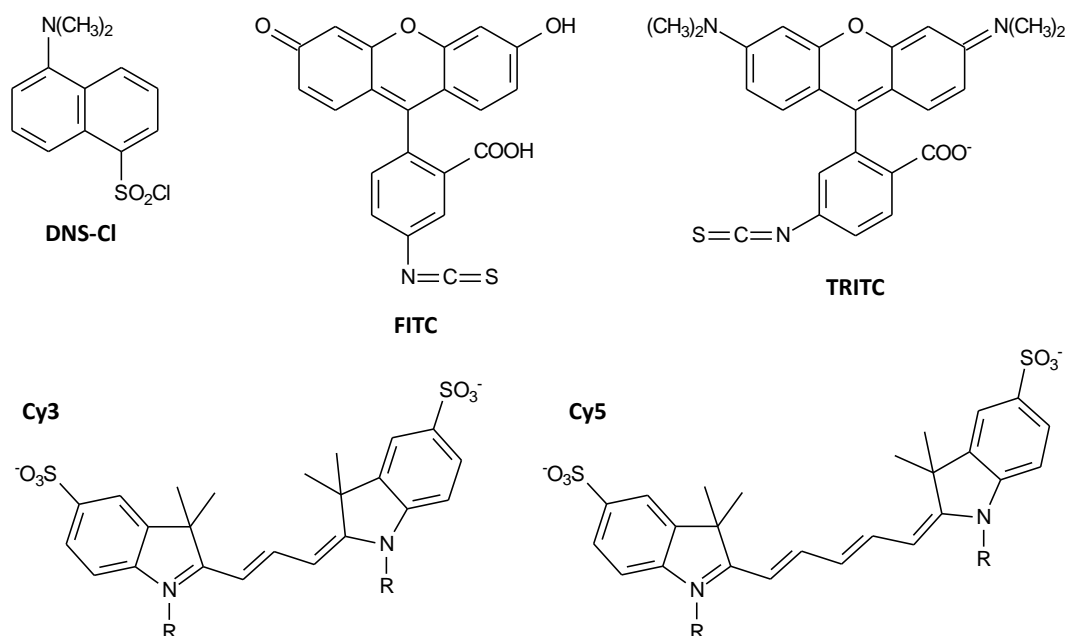


Figura 4.1: Estructures químiques d'alguns fluoròfors orgànics existents. DNS-Cl, Clorur de dansil; FITC, isotiocianat de fluoresceïna; TRITC, isotiocianat de tetrametilrodamina; i les cianines més comuns, Cy3 i Cy5.

Un dels primers fluoròfors que es va utilitzar i va permetre demostrar el gran nombre d'avantatges en l'ús de marcadors externs fluorescents en el camp de la bioquímica va ser el clorur de dansil (DNS-Cl), originàriament descrit pel Prof. Weber¹⁷² (vegeu Figura 4.1). Aquest fluoròfor té un temps de vida llarg ~ 10 ns, pot ser excitat a 350 nm on les proteïnes no absorbeixen, però el seu espectre d'emissió, típicament a prop dels 520 nm, és molt sensible a la polaritat del dissolvent. Per contra les fluoresceïnes i les rodamines, no són sensibles a la polaritat del dissolvent, fet que ha propiciat que siguin els fluoròfors extrínsecs més emprats; altres avantatges d'aquestes fluoròfors són que presenten els seus màxims d'absorció i d'emissió a elevades longituds d'ona, minimitzant així possibles problemes d'autofluorescència de mostres biològiques. També presenten valors

d'extinció molar força elevats, propers a $80.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ i tenen rendiments quàntics elevats i temps de vida aproximadament de 4 ns. Hi ha una gran varietat de derivats comercials d'aquestes famílies per poder ser units a amines com iodoacetamides, isotiocianats (vegeu Figura 4.1), N-hidroxisuccinimides i clorurs de sulfonil; freqüentment, es venen com a mescla d'isòmers. Una gran varietat d'immunoglobulines derivatitzades amb fluoresceïnes i rodamines es poden trobar en cases comercials. Un problema que presenta la fluoresceïna però, és la seva tendència al *quenching*; al tenir un desplaçament de Stokes molt petit, quan més d'una molècula de fluoresceïna és unida a una proteïna, pot tenir lloc transferència d'energia entre elles degut a l'elevada proximitat ($\sim 40 \text{ \AA}$) en la que es troben, ja que es troba dins la distància de Förster per a la transferència fluoròfor-fluoròfor. Per aquest motiu, per marcar proteïnes és millor treballar amb fluoròfors que presentin un desplaçament de Stokes més gran. Malgrat que el clorur de dansil posseeix un gran desplaçament de Stokes, la seva hidrofobicitat esdevé un problema a elevats graus de conjugació arribant a provocar agregació de les proteïnes. Per això, és constant el desenvolupament de nous fluoròfors que miren de complir les dues propietats desitjades, com són un elevat desplaçament de Stokes i una bona solubilitat en aigua.

En aquest context van aparèixer les cianines, fluoròfors que presenten el seu màxim d'absorció a longituds d'ona més elevades, entre la zona del vermell i de l'infraroig pròxim; les més emprades són la Cy3 i la Cy5. Aquests fluoròfors presenten un desplaçament de Stokes de l'ordre de 30 nm, essent bastant petits, però el principal avantatge que presenten és que millora la detectabilitat al treballar amb mostres biològiques perquè el soroll de fons produït per l'autofluorescència de les mostres disminueix. Les càrregues de les cadenes laterals també ajuden a millorar la solubilitat d'aquestes molècules (vegeu Figura 4.1).

Taula 4.1: Característiques dels fluoròfors més emprats per al marcatge de proteïnes (ISS company, *Innovations in Fluorescence*).

Fluoròfor	$\epsilon \text{ (M}^{-1} \text{ cm}^{-1})^a$	$\eta \text{ (\%)}^b$	$\tau \text{ (ns)}^c$	solvent	$\lambda_{\text{Abs}} \text{ (nm)}$	$\lambda_{\text{Em}} \text{ (nm)}$
Fluoresceïna	93.000	95	4.1 (dianió)	PBS	495	517
Rodamina B	106.000	31	1.68	Aigua	562	583
Cy3	150.000	4	0.3	PBS	548	562
Cy5	250.000	27	1.0	PBS	646	664

^a Coeficient d'extinció molar. ^b Rendiment quàntic de fluorescència. ^c Temps de vida.

Tot i que els fluoròfors orgànics encara són àmpliament utilitzats, en l'última dècada ha augmentat molt l'ús d'altres marcadors fluorescents com ara nanopartícules polimèriques fluorescents, nanocristalls semiconductors luminescents anomenats *quantum dots* (QDs), etc. Les nanopartícules polimèriques fluorescents consisteixen en milers de molècules de fluoròfor que es troben a l'interior d'una nanopartícula polimèrica, que pot ser de diversos materials com poliestirè (PS),

poliacrilonitril (PAN), *etc.* Cada material els ofereix unes propietats diferents pel que fa a solubilitat i fotoestabilitat, però en tots els casos les nanopartícules fluorescents, ofereixen un senyal més estable i més intens respecte al del fluoròfor corresponent aïllat. Per altra banda, les peculiars propietats fotofísiques dels QDs fan que puguin ser molt útils pel seu ús en assaigs fluorescents multiplexats. Aquestes propietats inclouen elevats rendiments quàntics, elevats coeficients d'extinció molar, elevada fotoestabilitat i, el més important, la capacitat de poder absorbir llum en un ampli rang de longituds d'ona unit al fet que els espectres d'emissió són modulables i estrets i es veuen desplaçats cap a zones de major energia a mesura que disminueix la mida de les nanopartícules, que solen ser d'entre 2 i 8 nm de diàmetre¹⁷³⁻¹⁷⁴. Això fa possible excitar a la vegada diferents quantum dots utilitzant una sola longitud d'ona, i que cada QD emeti a la seva longitud d'ona característica (vegeu Figura 4.2). En la regió del visible, trobem nanocristalls de CdSe-CdS amb una emissió que va des de 550 nm (verd) a 630 nm (vermell), mentre que altres sistemes, formats per InP i InAs, donen lloc a QDs fluorescents en la zona de l'IR pròxim. Tot i que els nanocristalls semiconductors (II-VI i III-V) no són solubles en aigua, és possible funcionalitzar-los amb molècules com per exemple, àcid mercaptoacètic, o fer créixer una fina capa de sílice en la seva superfície per facilitar la seva solubilitat¹⁷⁵. Els QDs també poden trobar-se a l'interior de nano- o micropartícules polimèriques per tal de millorar la seva biocompatibilitat, mantenint les seves propietats fluorescents¹⁷⁶.

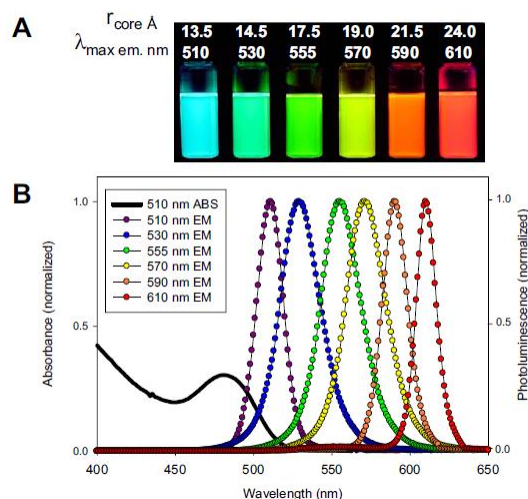


Figura 4.2: A) Sis dispersions de CdSe-ZnS QDs amb diferent mides de nucli, totes excitées a 365 nm. B) Absorció i emissió dels QDs normalitzades. La línia negra mostra l'absorció dels QDs amb emissió a 510 nm¹⁷³.

4.1.2 Fluoroimmunoassaigs (FIAs)

Els immunoassaigs fluorescents (FIAs) utilitzen marcadors fluorescents com fluoròfors orgànics o alternativament, quelats de lantànids com Europi(III), Terbi(III) o Samari(III), nanopartícules fluorescents o *quantum dots* (QDs). En el cas dels fluoroimmunoassaigs, la detectabilitat es sol veure limitada pel soroll de fons, principalment degut a la llum dispersada per molècules solubles (dispersió Rayleigh i Raman), partícules petites o per la pròpia fase sòlida (dispersió Tyndall), així

com també, per diferents compostos fluorescents de la pròpia mostra, o a alguna impuresa present en els reactius. Les interferències degudes a la dispersió de la llum, poden ser eliminades utilitzant fluoròfors amb un gran desplaçament de *Stokes*, sent preferible que sigui superior als 50 nm, i a més amb una longitud d'ona d'excitació i d'emissió màxima en la zona del vermell llunyà, per reduir la fluorescència intrínseca d'algunes mostres que solen donar el soroll de fons (fluorescència provinent de mostres biològiques, excitació 280-360 nm i emissió 320-470 nm). En formats heterogenis el soroll de fons intrínsec de les mostres reals, es veu reduït pel fet d'haver-hi una separació física. En la literatura podem trobar FIAs que utilitzen fluoròfors orgànics com a marcadors fluorescents per a la detecció d'analits com la mesotriona¹⁷⁷, el 2,4,6-trinitrotoluenè (TNT)¹⁷⁸, la testosterona¹⁷⁹, la sulfametazina¹⁸⁰, el 2,4,6-triclorofenol¹⁸¹, etc. Però des del treball de Chan i Nie¹⁷⁵ sobre l'aglutinació de QDs induïda per anticossos, ja han aparegut diferents immunoassaigs en els què s'han utilitzat les propietats òptiques dels QDs com a marcadors fluorescents. Entre els avantatges d'aquest sistema estan la possibilitat de desenvolupar sistemes multiplexats no planars (sense codificació espacial) fent servir QDs amb propietats òptiques diferents, o d'incrementar la detectabilitat dels immunoassaigs gràcies al seu bon rendiment quàntic. Per exemple, s'ha descrit un fluoroimmunoassaig multiplexat en el que s'utilitzen diferents conjugats anticòs-QD per a la detecció de diferents toxines simultàniament¹⁸², o també, un fluoroimmunoassaig per a la detecció de *Escherichia coli* O157:H7 patogènica, a través de la unió dels anticossos específics biotinilats a CdSe/ZnS QDs conjugats a estreptavidina¹⁸³. Recentment el nostre grup ha descrit la detecció d'*Escherichia coli* O157:H7 en un microarray fluorescent en format sandvitx, fent ús de conjugats anti-IgG-QD¹⁸⁴, essent possible incrementar en un factor de 100 vegades la detectabilitat de l'ELISA amb els mateixos immunoreactius.

4.1.3 L'ADN

L'àcid desoxiribonucleic (ADN) és un polímer lineal format per la successió de quatre unitats monomèriques diferents. Aquestes unitats són els nucleòtids, que estan formats per un grup fosfat, una pentosa (2-desoxiribosa) i una de les diferents bases nitrogenades (adenina (A), citosina (C), guanina (G) o timina (T)). En la unió de diversos nucleòtids, com en el cas de l'ADN, el polímer rep el nom de *polinucleòtid*. Mentre que quan es tracta d'una seqüència de nucleòtids curta, de 50 o menys bases, el polímer s'anomena *oligonucleòtid*. A la Figura 4.3 es mostra l'estructura d'una cadena d'ADN.

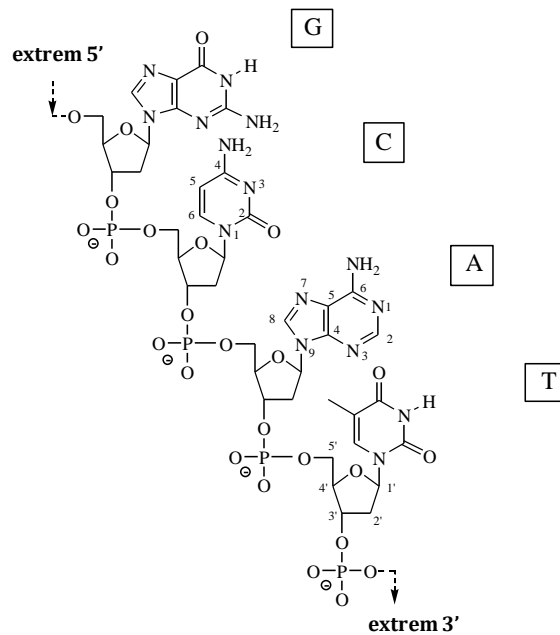


Figura 4.3: Estructura de la cadena d'ADN formada per la unió de nucleòtids que contenen les quatre bases nitrogenades, púriques (adenina i guanina) i pirimidíniques (citosina i timina).

En els organismes vius, l'ADN no sol existir en forma de molècula única, sinó com un parell de molècules estretament associades. Aquestes dues cadenes s'entrellacen formant una doble hèlix, tal i com varen descobrir Watson i Crick l'any 1953¹⁸⁵ a través d'unes dades prèviament obtingudes per Rosalind Franklin mitjançant la cristal·lografia de raigs X¹⁸⁶. Les característiques més importants del model de la doble hèlix de l'ADN de Watson i Crick són les següents:

- Les dues cadenes d'ADN s'uneixen específicament per la complementarietat de les bases nitrogenades (A-T i G-C). La unió de les dues cadenes complementàries d'ADN es coneix amb el terme d'*hibridació* (vegeu Figura 4.4).
- Les dues cadenes es disposen en sentits oposats, una en sentit 3' → 5' i l'altra en sentit 5' → 3', per tant, són antiparal·leles.
- La forma més estable de l'hèlix de l'ADN és una espiral helicoidal dextrogira on apareixen dues cavitats de diferent mida, el solc major i el solc menor. Els parells de bases adjacents es troben a una distància de 0.34 nm (3.4 Å) i a cada volta de la doble hèlix hi ha aproximadament 10 parells de nucleòtids (1 volta = 3.4 nm). El diàmetre de la doble hèlix es manté aproximadament constant en 2 nm (20 Å) (vegeu Figura 4.4).
- Un cop formada la doble hèlix, les bases nitrogenades es situen a l'interior de l'hèlix degut al seu caràcter hidrofòbic, amb els plans dels seus anells perpendiculars a l'eix de l'hèlix, mentre que els esquelets pentosa-fosfat de les dues cadenes es troben a la part exterior de l'espiral, degut al caràcter hidròfil d'aquesta estructura. A pH fisiològic, la doble hèlix té

una càrrega neta negativa deguda als àtoms d'oxigen dels grups fosfats situats a l'exterior de les cadenes.

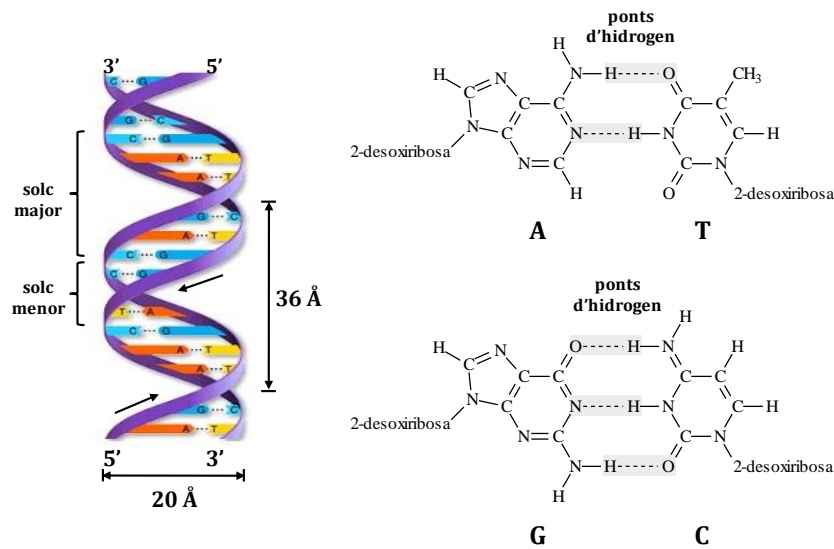


Figura 4.4: A l'esquerra, esquema de l'estructura de la doble hèlix que es forma quan té lloc la hibridació de dues cadenes complementàries d'ADN. A la dreta, en detall l'aparellament de les bases nitrogenades complementàries (Adenina (A)-Timina (T) i Guanina (G)-Citosina(C)).

La doble hèlix de l'ADN és estabilitzada per enllaços d'hidrogen que es formen entre les bases nitrogenades unides a les dues cadenes. Els dos tipus de parells de bases formen nombres diferents d'enllaços d'hidrogen; els parells AT en formen dos, i els parells GC en formen tres (Figura 4.4). L'ADN amb un elevat contingut GC és més estable que l'ADN amb un contingut GC baix, però a diferència del que es sol creure, això no es deu a l'enllaç d'hidrogen addicional que té un parell de bases GC sinó a la contribució de les accions d'apilament (els enllaços d'hidrogen només forneixen l'especificitat del parell, no l'estabilitat). Per consegüent, tant el percentatge de parells de bases GC com la llargada total d'una doble hèlix d'ADN determinen la força de l'associació entre les dues cadenes d'ADN. Al laboratori es pot mesurar la força d'aquesta interacció determinant la temperatura necessària per trencar els enllaços d'hidrogen, coneguda com la temperatura de fusió (T_m). Com que els enllaços d'hidrogen no són covalents, poden trencar-se i refer-se amb relativa facilitat. Per tant, les dues cadenes d'ADN d'una doble hèlix poden ser separades per una força mecànica o bé per una temperatura elevada. El procés de separació de les dues cadenes s'anomena desnaturalització de l'ADN.

4.2 Resultats i Discussió

4.2.1 Preparació i avaluació d'immunoreactius fluorescents per la determinació d'AAS

Basant-nos en estudis realitzats en el context de la tesi doctoral del Dr. Salvador, i als mostrats anteriorment en el capítol 3 d'aquesta tesi doctoral, es varen seleccionar els immunoreactius adients per a la determinació de ST, B, MB i THG. En concret, els antisèrums, As147 específic per ST, As138 específic per B, As143 específic per MB i As170 específic per THG, ja que juntament amb els antígens de tapissat corresponents, 8-BSA, 13-BSA, 14-BSA i hG-BSA, respectivament, havien donat lloc a ELISAs en format indirecte amb bons límits de detecció⁹⁷, com ja s'ha comentat en el capítol anterior.

Per tal de marcar els anticossos amb fluoròfors orgànics, abans es va realitzar una purificació dels antisèrums. Cal recordar que en el sèrum, a més de les IgGs específiques contra les diferents hormones anabolitzants, hi podem trobar altres proteïnes, com per exemple, albúmines, que es troben en una proporció molt elevada en relació a la concentració d'IgGs total en sèrum, i que a més, en general només un 10% de les IgGs totals són específiques. Així doncs, la purificació es feu mitjançant la precipitació de les IgGs amb una solució saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 40% (v/v) seguint procediments ja descrits¹⁸⁷ (vegeu Annex 2), que donà lloc a una fracció més pura dels antisèrums que anomenarem Ac147, Ac138, Ac143 i Ac170. En tots els casos s'obtingueren entre uns 8-12 mg de proteïna per mL d'As emprat.

4.2.1.1 Conjugació d'anticossos a fluoresceïna

El fluoròfor orgànic que es va escollir per dur a terme la conjugació dels anticossos fou la fluoresceïna, entre d'altres raons que s'exposen més endavant, degut al fet que és fàcilment accessible comercialment amb diferents funcionalitats químiques. En aquest cas, era necessari que la molècula fluorescent estigués funcionalitzada amb algun grup que pogués reaccionar amb les amines de les lisines accessibles dels anticossos, així que es va decidir utilitzar l'isotiocianat de fluoresceïna (*fluorescein isothiocyanate*, FITC) (vegeu Figura 4.5). El bioconjugat que es forma amb la proteïna, conté la funció tiocarbamat de fluoresceïna (FTC), que sol tenir un rendiment quàntic inferior, entre un 30-60% respecte al de la fluoresceïna¹⁸⁸. La forma dianiònica, que es troba present en els medis aquosos alcalins que es solen utilitzar en els immunoassaigs, presenta unes excel·lents propietats espectroscòpiques, a més, el dianió és hidrofílic i per tant no afecta a la solubilitat en aigua de cap dels immunoreactius al qual s'uneix. Altres avantatges de l'ús de la fluoresceïna en fluoroimmunoassaigs, són el seu elevat rendiment quàntic, molt pròxim a la unitat i

la seva estabilitat química¹⁸⁸. Malgrat tot, els conjugats de fluoresceïna són fotolàbils i la seva fluorescència depèn del pH, obtenint la màxima emissió en la zona de pH bàsics¹⁸⁹.

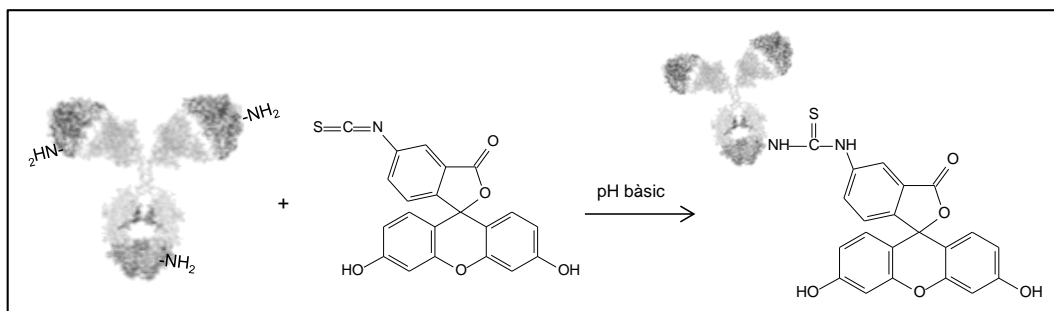


Figura 4.5: Esquema de la reacció de conjugació dels anticossos a l'isotiocianat de fluoresceïna (FITC), a pH 9.6.

Així doncs, per dur a terme les conjugacions es varen dissoldre els anticossos (Ac147, Ac138, Ac143 i Ac170) en tampó carbonat/bicarbonat 0.25 M a pH 9.6 i per separat es va preparar una solució de FITC en DMF anhidre¹⁹⁰. A continuació s'addicionà la quantitat adequada de la solució de FITC sobre la solució d'anticòs per tal de tenir 60 µg de FITC per mg d'Ac, equivalent a una relació molar Ac:FITC de 1:25. La mescla es deixà en agitació magnètica durant tres hores a temperatura ambient i tapada de la llum per evitar possibles degradacions de la fluoresceïna. Finalment els conjugats es varen purificar per diàlisi, es liofilitzaren i s'emmagatzemaren a -20 °C.

Per dur a terme la caracterització dels nous conjugats, Ac147-FITC, Ac138-FITC, Ac143-FITC i Ac170-FITC, es van realitzar els espectres d'absorció i d'emissió d'aquestes espècies (vegeu figura 4.6) i es van comparar amb els de l'anti-IgG-FITC comercial, que es mostra més endavant en aquest mateix capítol (figura 4.8), per tal de demostrar que havia tingut lloc la unió de la fluoresceïna als anticossos. Com es pot observar en la Figura 4.6, en tots els casos els bioconjugats mostraren els pic d'absorció i d'emissió característics de la fluoresceïna i en la mateixa posició que el conjugat comercial (vegeu figura 4.8), quedant demostrat que la conjugació havia tingut lloc amb èxit per a tots els anticossos. Els diferents valors d'intensitat obtinguts pels diferents conjugats, com s'explicarà a continuació, era degut al diferent grau de conjugació assolit per a cadascun d'ells.

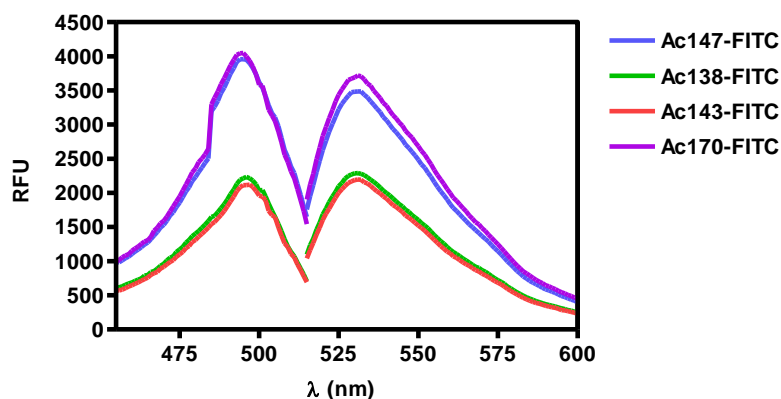


Figura 4.6: Espectres d'absorció-emissió dels diferents conjugats Ac-FITC (1 µg/mL, 100 µL in PBS).

Per determinar el grau de conjugació dels diferents bioconjugats, calia calcular la densitat de fluoròfors que hi havia per molècula d'Ac. Vegeu el procediment detallat en l'Annex 2. Breument, es va realitzar una recta de calibratge de FITC en tampó carbonat/bicarbonat 0.05 M a pH 9.6, de 0 a 100 µM, en una microplaca de poliestirè transparent no tractada. La lectura de les absorbàncies es feu a 494 nm en un espectrofotòmetre, ja que correspon amb el màxim d'absorció de la fluoresceïna i dels conjugats. Els conjugats es varen diluir en el mateix tampó que la FITC, i els valors obtinguts s'interpolaren en la recta de calibratge (vegeu figura 4.7). Així doncs, utilitzant la següent fórmula,

$$\delta = [\text{FITC}]/[\text{Ac-FITC}]$$

on δ és la densitat de fluoròfors, [FITC] és el valor de concentració (en µM) obtingut al interpolar les absorbàncies dels conjugats a la recta de FITC i [Ac-FITC] és la concentració dels conjugats (6.66 µM per a tots), es va calcular el grau de conjugació per a cada anticòs. Tenint en compte que els valors d'absorbància interpolats en la recta de FITC foren de 38.71 µM per a l'Ac147-FITC, 40,23 µM per a l'Ac170-FITC, 30.82 µM per a l'Ac138-FITC i 32,45 µM per a l'Ac143-FITC, es varen obtenir les següents densitats de fluoròfors, 5.81, 6.04, 4.62 i 4.87, respectivament. Així doncs, va tornar a quedar demostrat que en tots els casos la conjugació havia funcionat, però a més a més, els resultats obtinguts corroboraven els obtinguts en els espectres d'absorció i d'emissió dels conjugats, ja que els conjugats Ac147-FITC i Ac170-FITC amb unes 6 molècules de FITC per anticòs, presentaven uns màxims d'absorció i d'emissió més intensos que els altres dos conjugats, l'Ac138-FITC i l'Ac143-FITC, que amb 5 molècules de fluoròfor per anticòs, presentaven una intensitat menor en ambdós pics.

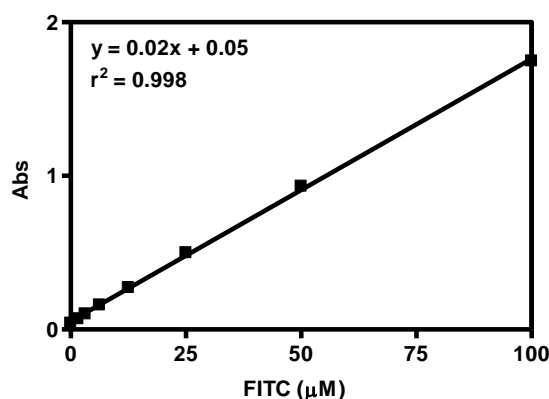


Figura 4.7: Recta de calibratge de FITC en tampó carbonat (100 µL/pou).

Fonts bibliogràfiques, indiquen que un excés en la conjugació d'anticossos amb molècules de FITC, pot produir una pèrdua en la seva capacitat d'unió degut a la possible unió de les molècules de fluoròfor als grups amino propers als punts d'afinitat de l'anticòs. S'ha trobat que més de 3 molècules de fluoresceïna per anticòs produeixen una disminució de l'avidesa dels anticossos pel seus corresponents antígens, perdent fins a un 75% de la seva capacitat original, un anticòs amb una relació molar fluoròfor/proteïna (F/P) de 17.4¹⁹¹. Així doncs, tot i que en el nostre cas en totes les conjugacions s'obtingueren graus de conjugació superiors a 3, es va decidir continuar endavant per comprovar si aquesta afirmació ens afectava, ja que la seva resposta era suficient per poder treballar.

4.2.1.2 Desenvolupament de FLISAs per a la detecció d'AAS

L'activitat dels anticossos marcats amb FITC es va avaluar mitjançant el desenvolupament de FLISAs en format indirecte per a la detecció de les corresponents hormones, ST, B, MB i THG. Inicialment, es va decidir utilitzar una *detecció indirecte* fent ús d'un anticòs secundari marcat amb FITC (anti-IgG-FITC) d'origen comercial, per tal d'optimitzar els diferents paràmetres per realitzar l'immunoassaig fluorescent. Seguidament, un cop establert el protocol de l'assaig, es va abordar la *detecció directa* utilitzant els anticossos específics marcats amb FITC.

Detecció indirecta

Pel desenvolupament d'aquest assaig es va utilitzar el bioconjugat anti-IgG-FITC comercial amb una relació molar fluoròfor/proteïna (F/P) de 3-5. Per començar es va fer un estudi dels espectres d'absorció i d'emissió de l'anti-IgG-FITC, per trobar la longitud d'ona d'excitació i la longitud d'ona d'emissió, a les que s'havia de treballar per tal d'obtenir el màxim senyal fluorescent que ens permetés l'instrument. Per a la realització d'aquest estudi s'utilitzà una placa blanca de poliestirè sense tractar (és a dir, sense la capacitat per adsorbir molècules amb grups polars en la seva superfície) per evitar la possible adsorció de les biomolècules. Es va fer l'estudi tant en PBS com en PBST, ja que a més de trobar les condicions de lectura a les que fer la lectura, també es va voler

observar si hi havia alguna diferència en la intensitat del senyal obtingut degut a la presència d'un detergent com el Tween 20 en el tampó de mesura.

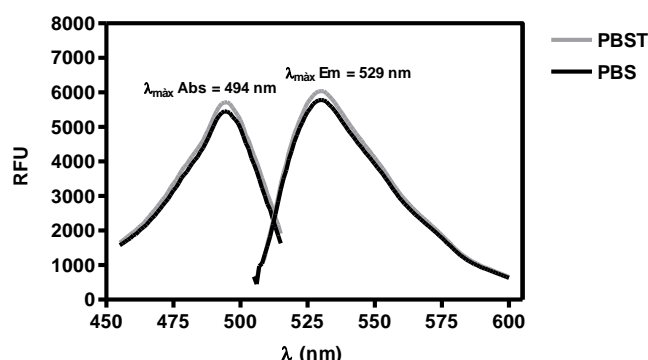


Figura 4.8: Espectre d'absorció-emissió de l'anti-IgG-FITC (2.75 µg/mL, 100 µL/pou).

Els resultats que es mostren en la figura 4.8, indicaren que es podia treballar amb qualsevol dels dos tampons, ja que no variava ni la posició ni la intensitat del senyal; essent el màxim d'absorció a 494 nm i el màxim d'emissió a 529 nm, en ambdós casos. Així doncs, es va decidir realitzar els posteriors assaigs en PBST, ja que està àmpliament descrit que l'ús de Tween 20 ajuda a evitar les interaccions de tipus no específic de proteïnes¹⁹².

Assaigs 2D no competitiu

La determinació de les concentracions dels AT i dels respectius As es va fer mesurant la unió de diferents dilucions de l'As (As147, As138, As143 i As170) a una microplaca tapissada amb diferents concentracions de l'AT corresponent (8-SBA, 13-BSA, 14-BSA i hG-BSA). Aquests experiments es van realitzar utilitzant microplaques per fluorescència blanques amb capacitat per adsorbir proteïnes a la seva superfície (Nunc, Maxisorp™). A continuació, s'addicionà a tota la microplaca la mateixa concentració d'anti-IgG-FITC, la qual s'uneix a la fracció constant de les IgGs (figura 4.9). Seguidament s'addicionà una solució de glicerina en tampó carbonat durant 5 minuts, s'eliminà i finalment es mesurà la fluorescència. Aquest últim pas, prèviament descrit en la literatura per Mastichiadis i col·laboradors^{177, 191}, ajuda a eliminar la pèrdua de fluorescència deguda a possibles interaccions entre les molècules de fluoròfor, i a més proporciona un pH bàsic a on la fluoresceïna emet un major senyal.

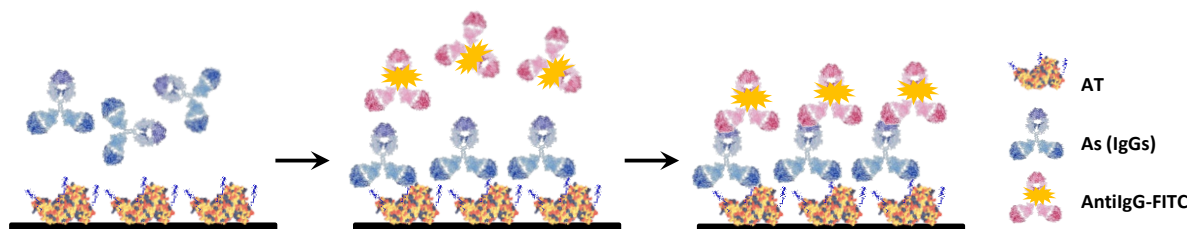


Figura 4.9: Esquema representatiu del funcionament d'un FLISA no competitiu amb detecció indirecta.

Aquest disseny experimental permet obtenir informació de l'afinitat d'un As envers un AT. En representar la fluorescència o unitats relatives de fluorescència (RFU) mesurades en funció de la concentració d'AT, tal com es mostra en la Figura 4.10, s'obtingueren una col·lecció de corbes que corresponien als diferents factors de dilució aplicats als As.

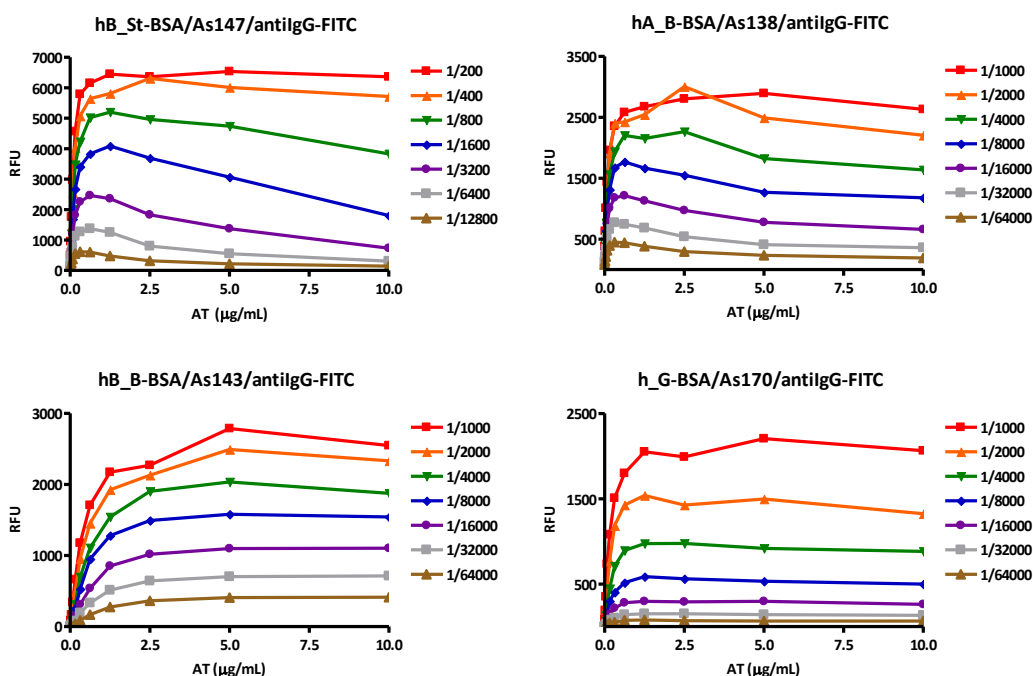


Figura 4.10: Resultats obtinguts en els experiments FLISA no competitiu amb detecció indirecte. Totes les corbes obtingudes arriben a un punt de saturació. Els blancs han estat restats.

S'escolliren com a concentracions òptimes d'AT i As aquelles que, sense arribar al punt de saturació de la corba, donaren una fluorescència entre 800 i 1200 unitats, restant-li el blanc. A la taula 4.2 es recullen els factors de dilució escollits per a cada combinació AT/As, així com la fluorescència que donaren en l'assaig.

Taula 4.2: Condicions escollides dels assaigs no competitiu.

AT/As	[AT] ^a	[As]	[Anti-IgG-FITC] ^b	RFU ^c
8-BSA/As147	0.15625	1/6400	1/600	1105
13-BSA/As138	0.15625	1/16000	1/600	1010
14-BSA/As143	1.25	1/8000	1/600	1260
hG-BSA/As170	0.3125	1/2000	1/600	1180

^a Les concentracions es donen en µg mL⁻¹.

^b Les dilucions estan fetes a partir de l'estoc comercial que és de 1.1 mg/mL.

^c Unitats relatives de fluorescència obtingudes amb les concentracions d'immunoreactius escollides.

Assaigs competitius

La capacitat dels As per reconèixer els respectius analits es va avaluar mitjançant FLISAs competitiu indirectes. És a dir, immobilitzant l'AT a la microplaca, tal i com s'havia fet anteriorment, i fent competir l'analit a diferents concentracions amb l'AT, per la unió amb l'anticòs. A continuació, s'addicionà l'anti-IgG-FITC que s'uneix a les IgGs que han quedat immobilitzades en la placa a través de la interacció antígen-anticòs i després d'addicionar la solució de glicerina durant 5 minuts i eliminar-la, es mesurà el senyal fluorescent. Les concentracions d'AT i d'As utilitzades en aquest assaig foren les trobades en l'apartat anterior (vegeu taula 4.2). En presència de l'analit es produeix una inhibició de la unió de l'As per l'AT; com a conseqüència, hi ha una menor quantitat d'anti-IgG-FITC unida a la microplaca, que es tradueix amb una disminució de la fluorescència, que és inversament proporcional a la concentració d'analit. En representar els valors mesurats de fluorescència en funció del logaritme de la concentració d'analit s'obté una corba de tipus sigmoïdal que s'ajusta a una equació de quatre paràmetres, amb la fórmula,

$$y = A + \frac{B - A}{1 + \left(\frac{C}{x}\right)^D}$$

on A és la fluorescència mínima, B és la fluorescència màxima, C és la concentració obtinguda a la meitat de la fluorescència màxima (IC₅₀), i D és el pendent de la recta tangent al punt mig de la corba sigmoïdal.

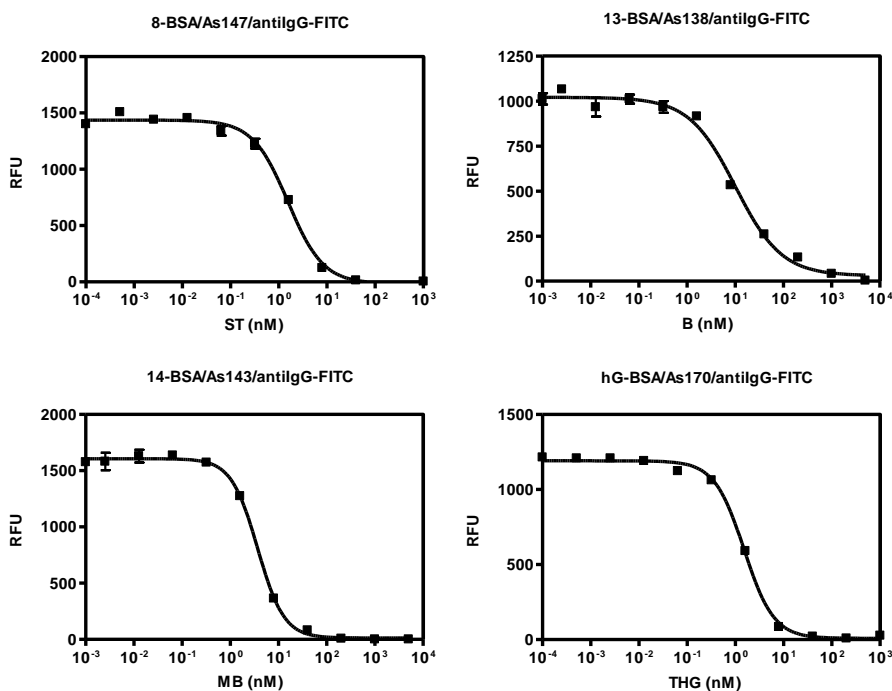


Figura 4.11: Corbes de calibratge obtingudes amb per a la detecció d'estanozolol (ST), boldenona (B), metilboldenona (MB) i tetrahydrogestrinona (THG) en FLISA amb detecció indirecte. Els blancs han estat restats. Els punts corresponen a la mitja i la desviació estàndar de les mesures de 3 pouets d'una sola placa.

Com es pot observar en la Figura 4.11, en tots els casos l'analit era capaç de desplaçar l'equilibri, arribant a concentracions elevades a impedir completament la unió antigen-anticòs. A la taula 4.3 es mostren els següents paràmetres dels assaigs: $RFU_{m\grave{a}x}$, $RFU_{m\grave{i}n}$, pendent, IC_{50} , LOD i r^2 , els quals s'han extret de l'esmentada equació d'ajust.

Taula 4.3: Paràmetres que defineixen els FLISA competitiu amb detecció indirecte obtinguts. Mitja dels resultats obtinguts en 3 pouets d'una sola placa.

Analit	ST	B	MB	THG
<i>AT/As</i>	<i>8-BSA/As147</i>	<i>13-BSA/As138</i>	<i>14-BSA/As143</i>	<i>hG-BSA/As170</i>
RFU_{màx}	1436	1021	1606	1191
RFU_{mín}	-15.97	29.97	12.52	8.221
Pendent	-1.189	-0.9058	-1.588	-1.409
IC₅₀ ($\mu\text{g L}^{-1}$)^a	0.46 ± 0.05	2.78 ± 0.06	1.09 ± 0.02	0.46 ± 0.03
LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)^a	0.05 ± 0.02	0.14 ± 0.05	0.25 ± 0.02	0.09 ± 0.01
r²	0.994	0.988	0.995	0.997

^aLa IC_{50} i el LOD són aquella concentració d'analit necessària per inhibir un assaig immunofluorescent competitiu i obtenir el 50 i 90% de la fluorescència màxima.

Com es pot observar en la taula 4.3, s'obtingueren quatre FLISAs amb límits de detecció inferiors a $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ i $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, que són els mínim de detectabilitat exigint a les tècniques analítiques per a la detecció d'aquestes substàncies segons la UE i la WADA, respectivament. En comparació amb els assaigs ELISA desenvolupats anteriorment amb aquest mateixos immunoreactius (vegeu Taula 4.6)⁹⁷, s'ha mantingut pràcticament la mateixa detectabilitat per a tots els analits, essent molt bona en tots els casos, però a més, ha estat possible disminuir el temps d'anàlisi, passant d'1h 30 min a 1h, al utilitzar l'anti-IgG-FITC per realitzar la detecció fluorescent.

Detecció directa

Tenint en compte els bons resultats obtinguts emprant el bioconjugat fluorescent comercial, es va procedir al desenvolupament de FLISAs amb detecció directa, utilitzant els anticossos fluorescents preparats tal com s'ha descrit anteriorment. En base a la caracterització d'aquests immunoreactius que s'havia fet prèviament (vegeu apartat 4.2.1.1), s'escolliren les següents longituds d'ona d'excitació i d'emissió: 494 i 529 nm, respectivament.

Assaigs 2D no competitiu

Per tal d'escollir les concentracions adients, es varen realitzar els assaigs 2D no competitiu amb cadascun dels nous conjugats fluorescents, Ac147-FITC, Ac138-FITC, Ac143-FITC i Ac170-FITC, amb els mateixos AT utilitzats anteriorment en la detecció indirecta, tal i com es mostra a la figura 4.12.

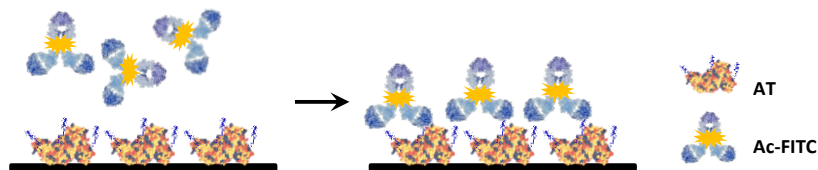


Figura 4.12: Esquema representatiu del funcionament d'un FLISA no competitiu amb detecció directa.

En representar la fluorescència mesurada en funció de la concentració d'AT, s'obtingueren una sèrie de corbes corresponents als diferents factors de dilució dels Ac-FITC (Figura 4.13), de les quals s'escolliren les concentracions d'Ac-FITC i AT (vegeu Taula 4.4) per a realitzar els assaigs d'inhibició amb els analits corresponents.

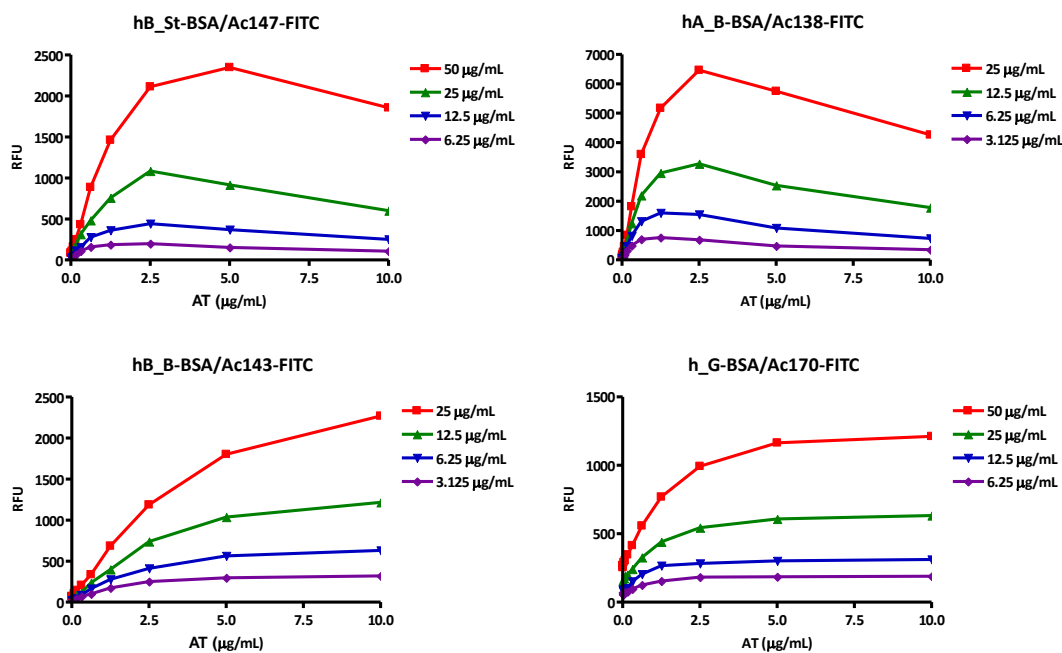


Figura 4.13: Resultats obtinguts dels experiments FLISA no competitius amb detecció directa. Totes les corbes obtingudes arriben a un punt de saturació. Els blancs ha estat restats.

Taula 4.4: Condicions escollides dels assaigs no competitius.

AT/Ac-FITC	[AT] ^a	[Ac-FITC] ^b	RFU ^c
8-BSA/Ac147-FITC	1.25	25	737.5
13-BSA/Ac138-FITC	0.3125	6.25	830
14-BSA/Ac143-FITC	5	12.5	1000
hG-BSA/Ac170-FITC	2.5	50	982.5

^{a,b}Les concentracions estan donades en µg mL⁻¹.

^cUnitats relatives de fluorescència obtingudes amb les concentracions d'immunoreactius escollides.

Comparant aquestes corbes amb les de la Figura 4.10 ja es pot endevinar que l'avidesa dels anticossos havia variat, essent necessari emprar concentracions més elevades tant d'AT com d'Ac-FITC per obtenir els mateixos valors de fluorescència màxima que amb la detecció indirecta. Això

podria ser degut a una certa desnaturalització o canvi conformacional de l'anticòs durant el procés de la bioconjugació.

Assaigs competitiu

Per a la realització dels assaigs competitiu es varen tapissar les microplaques amb els diferents AT a les concentracions prèviament escollides mitjançant els assaigs 2D no competitiu, i després es varen afegir els conjugats Ac-FITC amb el corresponent analit a diferents concentracions, simultàniament. Finalment s'afegí la solució de glicerina durant 5 minuts, s'eliminà i es mesurà el senyal en el fluorímetre, utilitzant com a longituds d'ona d'excitació i d'emissió, 494 i 529 nm, respectivament. Es van representar els valors obtinguts de fluorescència en front el logaritme de la concentració per a cada un dels analits, i les corbes sigmoïdals que s'obtingueren s'ajustaren a l'equació de quatre paràmetres, mostrada anteriorment.

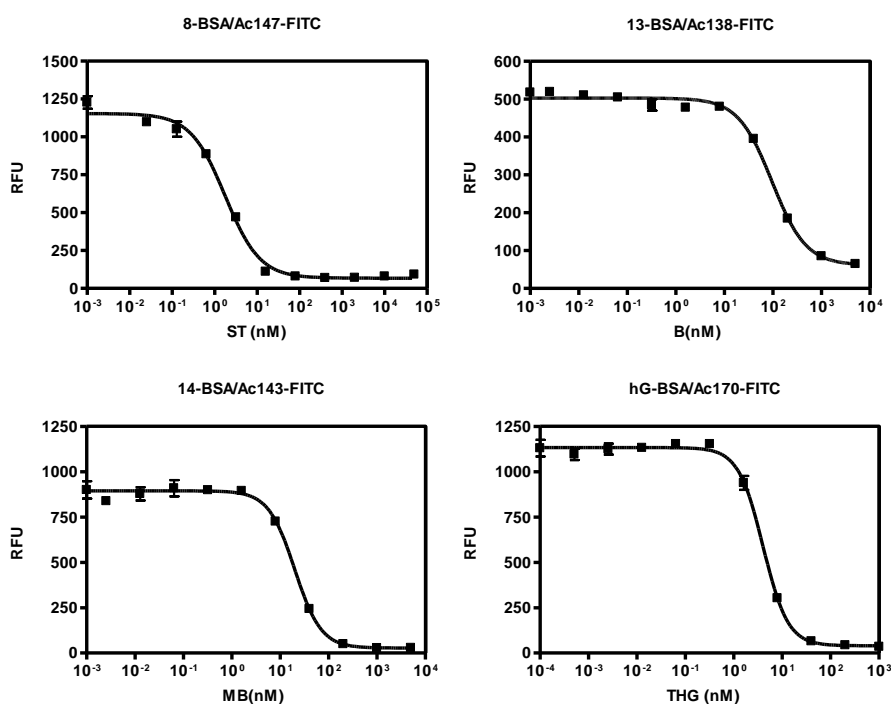


Figura 4.14: Corbes d'inhibició per a la detecció d'estanozolol (ST), boldenona (B), metilboldenona (MB) i tetrahydrogestronona (THG) en FLISA amb detecció directa. A la Taula 4.5 es presenten els paràmetres característics d'aquestes corbes. Els punts corresponen a la mitja i la desviació estàndard de les mesures de 3 pouets d'una sola placa.

Com es pot observar en la Figura 4.14, tots els anticòssos tot i haver passat per un procés de conjugació, conservaven la capacitat de reconèixer el respectiu analit. A la Taula 4.5 es mostren els paràmetres que caracteritzen aquests assaigs. Tal com es pot observar, els assaigs per ST, MB i THG, continuaven complint els requeriments de detectabilitat de la UE i de la WADA, mentre que l'assaig de B, proporcionava un límit de detecció més elevat de $3.2 \mu\text{g L}^{-1}$, essent superior al MRPL establert per la UE.

Taula 4.5: Paràmetres que defineixen els FLISA competitiu amb detecció directa obtinguts. Mitja dels resultats obtinguts en 3 pouets d'una sola placa.

Analit	ST	B	MB	THG
<i>AT/As</i>	<i>8-BSA/Ac147-FITC</i>	<i>13-BSA/Ac138-FITC</i>	<i>14-BSA/Ac143-FITC</i>	<i>hG-BSA/Ac170-FITC</i>
RFU_{màx}	1154	502.8	894.3	1133
RFU_{mín}	67.27	61.43	27.58	40.05
Pendent	-1.063	-1.242	-1.597	-1.696
IC₅₀ (µg L⁻¹)^a	0.51 ± 0.02	25.43 ± 1.2	5.85 ± 0.09	1.24 ± 0.03
LOD (µg L⁻¹)^a	0.03 ± 0.01	3.23 ± 0.03	1.35 ± 0.02	0.31 ± 0.01
r²	0.987	0.992	0.996	0.997

^aLa IC₅₀ i el LOD són aquella concentració d'analit necessària per inhibir un assaig immunofluorescent competitiu i obtenir el 50 i 90% de la fluorescència màxima.

Si bé és cert que amb la detecció indirecte es mantenia força la detectabilitat dels diferents assaigs en comparació amb els respectius ELISAs, en el cas de la detecció directa, al emprar els anticossos específics que havien passat per un procés de conjugació, diàlisi i liofilització, els resultats obtinguts mostraren en algun cas, per exemple en l'assaig de B, que havia disminuït el reconeixement de l'analit per part de l'Ac138-FITC, donant lloc a un assaig amb una detectabilitat inferior a la requerida. Un dels principals motius podria ser que alguna de les molècules de fluoresceïna s'hagués unit a l'anticòs a través de les zones de reconeixement. Tot i així, val a dir que els assaigs que s'obtingueren amb detecció directa presentaven una bona relació senyal/soroll i que el temps d'anàlisi s'havia reduït molt, ja que en tan sols 30 minuts es podia detectar la presència o no de qualsevol d'aquests analits.

Taula 4.6: Paràmetres que defineixen els ELISAs competitiu de les diferents parelles AT/As⁹⁷.

Analit	ST	B	MB	THG
<i>AT/As</i>	<i>8-BSA/As147</i>	<i>13-BSA/As138</i>	<i>14-BSA/As143</i>	<i>hG-BSA/As170</i>
A_{màx}	1.04	1.45	1.77	0.88
A_{mín}	0.02	0.05	0.01	0.03
Pendent	-1.07	-0.65	-0.80	-0.96
IC₅₀ (µg L⁻¹)^a	0.16 ± 0.02	5.90 ± 0.03	0.25 ± 0.03	0.14 ± 0.02
LOD (µg L⁻¹)^a	0.02 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.015 ± 0.02	0.04 ± 0.02
r²	0.991	1.00	0.997	0.994

^aLa IC₅₀ i el LOD són aquella concentració d'analit necessària per inhibir un assaig immunoenzimàtic competitiu i obtenir el 50 i 90% de l'absorbància màxima.

Si comparem els resultats obtinguts, entre els FLISAs amb detecció indirecta (anti-IgG-FITC) i directa (Ac-FITC), amb els respectius ELISAs (vegeu Taula 4.6), en general observem una pèrdua en la detectabilitat en tots els assaigs. A la Figura 4.15 es mostra una comparativa dels valors de IC_{50} assolits en cada un dels formats i pels diferents analits. Es pot observar que l'assaig de ST és el més estable de tots, ja que manté força la detectabilitat en els tres formats d'assaig. Però pel que fa a l'assaig de B, la detectabilitat es molt similar en el FLISA indirecte però empitjora significativament en el FLISA directa. Finalment, tan l'assaig de MB com el de THG, empitjoren la detectabilitat en el FLISA indirecte i encara més significativament quan s'utilitza la detecció directa.

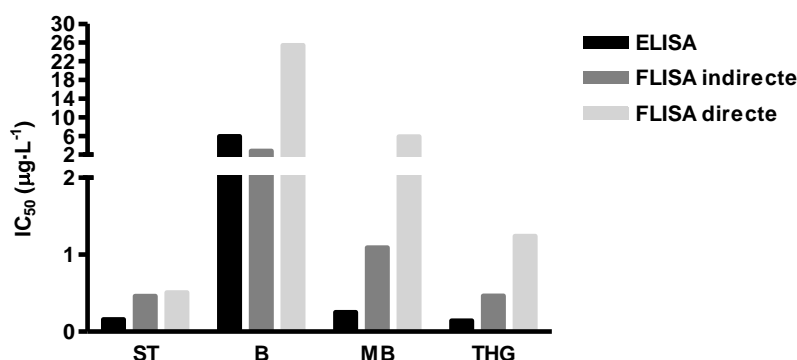


Figura 4.15: Gràfic on es mostra la comparativa entre els valors d' IC_{50} obtingudes per a la detecció d'estanozolol (ST), boldenona (B), metilboldenona (MB) i tetrahydrogestrinona (THG), mitjançant ELISA, FLISA indirecte (emprant l'anti-IgG-FITC comercial) i FLISA directe (emprant els conjugats Ac-FITC preparats en el laboratori).

Una possible explicació a l'empitjorament de les detectabilitats dels assaigs en els diferents formats, seria el fet que la concentració d'anticossos específics utilitzada en cada un dels diferents formats d'assaigs, augmenta al passar dels ELISA als FLISA indirectes, però sobretot augmenta al passar dels FLISA indirectes als FLISA directes. Si tenim en compte que en general en un antisèrum trobem uns 10 mg mL^{-1} d'IgGs, podem emprar aquests valors per calcular les concentracions d'IgGs emprades en els ELISAs i en els FLISAs indirectes (vegeu Taula 4.7). Com podem veure en la Taula 4.7, les concentracions d'anticossos específics emprades quan hi ha una etapa posterior en la que es fa ús d'un anticòs secundari, són en general més baixes en comparació amb les concentracions emprades en els FLISAs directes, en els que no hi ha cap etapa posterior d'amplificació del senyal. En els ELISAs la concentració d'anticòs emprada era menor en comparació als FLISA indirectes, gràcies a la capacitat d'amplificació de l'enzim unit a l'anti-IgG-HRP, però val a dir que en els FLISA indirectes tot i emprar una anti-IgG-FITC sense capacitat d'amplificar el senyal, les concentracions d'anticòs primari emprades també eren força baixes. Mentre que, quan l'anticòs específic era el que donava el senyal final com passa en els FLISA directes, la concentració d'anticòs necessària per tenir una relació senyal/soroll suficientment bona era força elevada, curiosament un ordre de magnitud superior, i per tant, més analit era necessari per desplaçar tot l'anticòs afegit.

Taula 4.7: Concentracions dels anticossos específics utilitzades en els diferents formats d'assaig.

Format	As147 ^a	As138 ^a	As143 ^a	As170 ^a
ELISA ^b	0.2	0.15	0.3	0.3
FLISA indirecte ^b	1.5	0.625	1.25	5
FLISA directe	25	6.25	12.5	50

^a Totes les concentracions estan en $\mu\text{g mL}^{-1}$.

^b Concentracions obtingudes considerant les dilucions emprades en l'assaig i tenint en compte que en un As hi ha generalment 10 mg mL^{-1} d'IgGs.

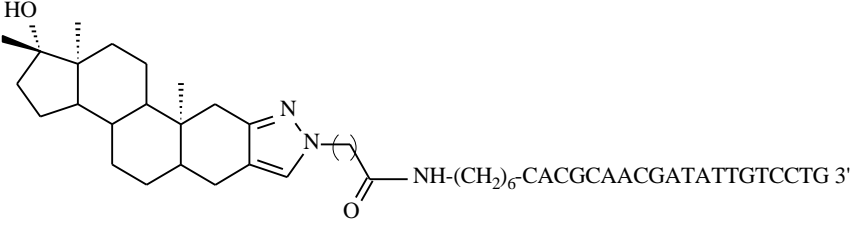
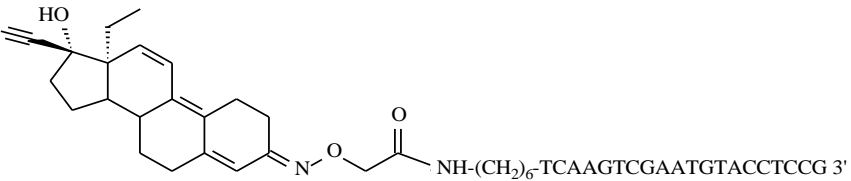
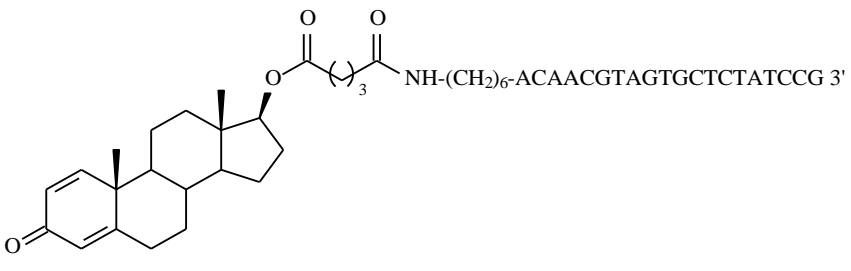
Una altra possible explicació a la pitjor detectabilitat assolida en els FLISA directes respecte als respectius FLISA indirectes, podria venir donada pel fet que durant el marcatge dels anticossos primaris, algunes molècules de fluoròfor s'hagin unit a les zones de reconeixement dels anticossos, reduint de tal forma la seva capacitat de reconèixer l'analit corresponent. La detectabilitat dels FLISAs directes podria millorar marcant els anticossos específics amb un altre fluoròfor que no patís fotoblanqueig com la fluoresceïna, o també marcant-los amb nanopartícules fluorescents, ja que una sola partícula conté moltes molècules de fluoròfors i per tant l'emissió és superior. Ambdós casos, permetrien poder reduir el nombre de fluoròfors units per proteïna. Tot i que, de cara al desenvolupament d'assaigs fluorescents multiplexats podria ser útil introduir l'ús dels quantum dots.

4.2.2 Preparació de sondes haptè-oligonucleòtid

Per a la preparació de les sondes haptè-oligonucleòtid, en primer lloc calia dissenyar 3 parelles d'oligonucleòtids complementàries (N_1 , N_2 i N_3 , *up* and *down*) (vegeu les seqüències en la Taula 4.8). Tots els oligonucleòtids tenien un contingut G/C (bases puríniques/bases pirimidíniques) del 50%, per tal de que tots els dúplexs tinguessin similars propietats d'hibridació; per exemple, la mateixa temperatura de fusió (T_m). Els oligonucleòtids *down*, essent aquells que serien immobilitzats en la superfície de diagnòstic universal, foren sintetitzats amb un grup tiol a l'extrem 5', mentre que els oligonucleòtids *up*, essent aquells que serien emprats per preparar les sondes haptè-oligonucleòtid, foren sintetitzats amb un grup amino a l'extrem 5'.

Els haptens escollits per a la preparació de les sondes haptè-oligonucleòtid eren el 8 (ST), hG (THG) i 13 (B), els quals havien estat prèviament escollits per la possibilitat d'utilitzar-los en combinació amb el còctel d'As format pels As147 (ST), As170 (THG) i As138 (B) pel desenvolupament d'un sistema multiplexat (vegeu el capítol 3). Els 3 haptens esteroïdals contenien en el braç espaciador un àcid carboxílic (vegeu Taula 3.3), que un cop activat va ser emprat per a la unió covalent als diferents oligonucleòtids *up* a través dels grups amino lliures en la posició 5'.

Taula 4.8: Estructures de les sondes haptè-oligonucleòtid sintetitzades i de les seqüències dels oligonucleòtids complementaris emprats per a la funcionalització de les superfícies¹⁹³.

Nom	Seqüència/Estructura
N_{1down} -SH	5' HS-(CH ₂) ₆ -CAGGACAATATCGTTGCGTG 3'
8- N_{1up}	
N_{2down} -SH	5' HS-(CH ₂) ₆ -CGGAGGTACATTCGACTTGA 3'
hG- N_{2up}	
N_{3down} -SH	5' HS-(CH ₂) ₆ -CGGATAGAGCACTACGTTGT 3'
13- N_{3up}	

Per a la preparació de les sondes haptè-oligonucleòtid es van utilitzar dues estratègies sintètiques: per una banda la síntesi es feu en fase sòlida, utilitzant hexafluorofosfat de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidin-fosfoni (PyBOP) per activar l'àcid carboxílic de l'haptè i N,N-diisopropiletamina (DIPEA), i per l'altra, la síntesi es feu en solució, activant l'àcid carboxílic de l'haptè emprant N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) i N-hidroxisuccinimida (NHS). Els bioconjugats 8- N_{1up} i hG- N_{2up} , es varen sintetitzar amb els oligonucleòtids encara units a la fase sòlida, podent així realitzar la reacció en un medi totalment orgànic en el que els haptens són més solubles, mentre que el bioconjugat 13- N_{3up} , es va haver de sintetitzar amb l'oligonucleòtid en solució després d'haver estat alliberat de la fase sòlida emprant un medi bàsic concentrat a elevada temperatura, ja que en

aquestes condicions el grup èster de l'haptè 13 (vegeu Taula 3.3) s'hauria pogut hidrolitzar. Finalment, seguint els procediments experimentals descrits en l'article adjunt¹⁹³, fou possible la obtenció dels bioconjugats 8-N_{1up} i hG-N_{2up} amb uns rendiments d'entre 40-52%, essent ambdós conjugats caracteritzats per espectrometria de masses MALDI-TOF, i obtenint pel 8-N_{1up} una massa experimental de 6672 m/z (massa calculada 6668) i pel hG-N_{2up} una massa experimental de 6614 m/z (massa calculada 6619). El bioconjugat 13-N_{3up}, s'obtingué amb un rendiment màxim del 45% emprant un 30x d'excés d'haptè activat respecte d'oligonucleòtid en solució en tampó borat. Aquest conjugat també fou caracteritzat per espectrometria de masses MALDI-TOF, obtenint una massa experimental de 6400 m/z, mentre que la massa calculada era de 6639 m/z. Aquesta diferència fou atribuïda a la fragmentació que l'haptè pot sofrir en l'èster degut a l'elevada potència de la font d'ionització emprada en MALDI. Aquesta hipòtesi fou corroborada al analitzar el conjugat mitjançant espectrometria de masses utilitzant una font d'ionització dèbil com l'electrosprai, obtenint una massa experimental de 6639 m/z, igual a la calculada.

Per comprovar que la conjugació dels haptens a les cadenes d'oligonucleòtids no afectava a la formació dels dúplexs corresponents, es feren les corbes de desnaturalització de les tres parelles d'oligonucleòtids, amb i sense els haptens units als oligonucleòtids *up*. En la taula S1 de la informació de suport de l'article 3 adjunt, es pot veure com les T_m dels dúplexs amb i sense els haptens, són pràcticament les mateixes per a totes les parelles d'oligonucleòtids.

D'igual forma es va comprovar que la unió dels diferents oligonucleòtids als haptens no afectés el reconeixement d'aquests per part dels antisèrums respectius. En aquest cas, l'avaluació es feu en un *microarray* d'haptens format sobre superfícies de vidre, després d'immobilitzar els oligonucleòtids *down* e hibridar-los amb les sondes haptè-oligonucleòtid sintetitzades. A continuació, s'afegiren els corresponents antisèrums i es deixaren incubar, i finalment la detecció del complex haptè-anticòs es feu emprant un anticòs secundari fluorescent¹⁹⁴. Com es veurà més en detall en el capítol 5, la presència dels oligonucleòtids no afectava al reconeixement dels anticòssos pels respectius haptens, obtenint per als diferents analits valors de detectabilitat (IC₅₀ i LOD) similars emprant les sondes haptè-oligonucleòtid que amb els corresponents AT.

Paral·lelament, es va avaluar la biofuncionalitat de les sondes haptè-oligonucleòtid sintetitzades mitjançant un sensor SPRi. En primer lloc, emprant diferents superfícies d'or per als diferents sistemes (ST, THG i B), es va estudiar la hibridació de cada conjugat haptè-oligonucleòtid amb l'oligonucleòtid complementari prèviament immobilitzat sobre les superfícies d'or a través del grup tiol, N_{1down}/8-N_{1up} (ST), N_{2down}/hG-N_{2up} (THG) i N_{3down}/13-N_{3up} (B), i el posterior reconeixement dels diferents haptens un cop immobilitzats en el sensor per part dels respectius antisèrums, As147 (ST), As170 (THG) i As138 (B), emprant com a control negatiu un sèrum pre-immune (CTR-NEG). En aquest cas no era necessari la utilització de marcadors o anticòssos

secundaris, ja que la pròpia unió de l'anticòs primari a l'haptè, fa canviar l'índex de refracció de la fase adjacent a l'or, la qual cosa és detectada pel transductor. Com es pot observar en els sensogrames de les figures 2 i 3 de l'article adjunt, la hibridació entre les diferents cadenes tenia lloc de forma selectiva, i el reconeixement dels diferents conjugats haptè-oligonucleòtid tenia lloc de forma específica per part dels respectius antisèrums, ja que en els tres casos es mesurà un canvi en l'índex de refracció al afegir l'antisèrum corresponent i no al emprar el control negatiu. A més a més, es va demostrar que era possible la regeneració de les superfícies amb una simple etapa de deshibridació en medi bàsic, obtenint al final les superfícies d'or amb les cadenes complementàries immobilitzades $N_{1-3}down$ a punt per a ser emprades una altra vegada. Aquestes superfícies foren reutilitzades tres vegades per a cada sistema (vegeu com a exemple el sensograma complet per a la THG en la Figura 4.16), obtenint en el cas del ST i la THG exactament el mateix senyal específic al tornar a hibridar el corresponent haptè-oligonucleòtid i afegir el respectiu antisèrum, mentre que en el cas del sistema de B, tot i obtenir un senyal clarament específic al afegir l'antisèrum després de dues etapes de regeneració, aquest no era igual al que s'havia obtingut en el primer cicle. Aquesta pèrdua en el senyal fou atribuïda a un possible pèrdua en la capacitat d'unió dels oligonucleòtids complementaris o de l'antisèrum, així com a la baixa relació senyal/soroll que s'havia obtingut per aquest sistema en comparació amb els altres dos. Pel que fa a les diferències en les pendents i en les intensitats màximes dels sensogrames obtinguts en el reconeixement dels diferents antisèrums pels corresponents haptè-oligonucleòtid, aquestes foren atribuïdes a la diferent avidesa que cada antisèrum presentava pel respectiu bioconjugat.

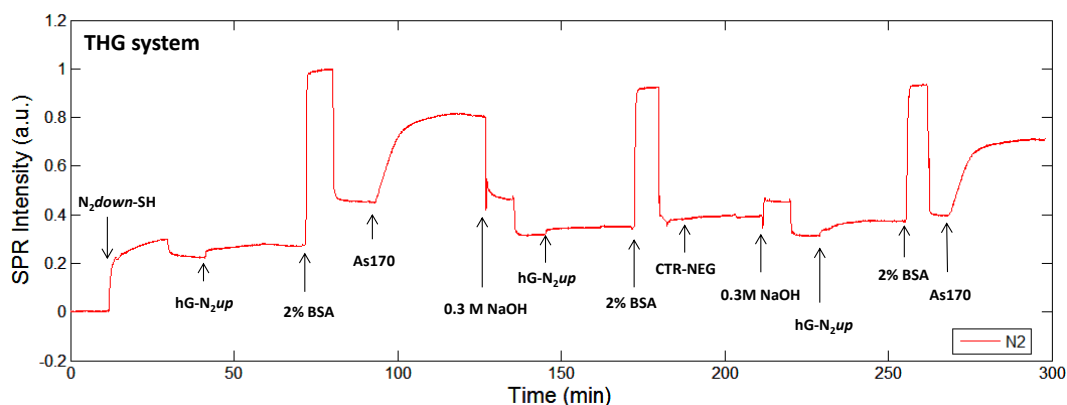


Figura 4.16: Exemple d'un sensograma complet obtingut emprant els bioreactius per a la detecció de THG.

Finalment, es volgué demostrar l'aplicabilitat de l'estratègia DDI pel desenvolupament d'immunosensors de SPR multiplexats emprant les sondes haptè-oligonucleòtid prèviament sintetitzades per a la detecció d'AAS. Com a prova de concepte, es varen emprar substrats comercials que contenien 16 *spots* d'or en els quals es varen biofuncionalitzar fora del sistema SPR amb els diferents oligonucleòtids $N_{1-3}down$, a través dels grups tiol, per triplicat. A continuació es col·locà el xip a l'interior de l'instrument de SPR i s'afegiren en primer lloc una mescla amb totes les sondes haptè-oligonucleòtid, 8- N_{1up} (ST), hG- N_{2up} (THG) i 13- N_{3up} (B), i a continuació el

còctel d'As (As147, As170 i As138). Com es pot observar en la figura 4 de l'article adjunt, es va obtenir de forma simultània el canvi degut a la hibridació de cada una de les parelles d'oligonucleòtids, així com el posterior reconeixement per part dels antisèrums específics, mesurant els *spots* corresponents. Amb aquest treball quedava demostrat que era possible l'ús de l'estratègia DDI per a la immobilització de diferents haptens de forma selectiva i simultània sobre un xip de SPR prèviament funcionalitzat amb els oligonucleòtids complementaris corresponents, que permetria en un futur la detecció simultània de qualsevol compost sempre i quan es sintetitza prèviament el corresponent bioconjugat haptè-oligonucleòtid. La detecció podria tenir lloc emprant una codificació espacial en un sensor de SPR amb multicanals o un SPRi amb diferents *spots*, com en aquest cas, o emprant nanopartícules d'or per biofuncionalitzar els immunoreactius i detectant el canvi del LSPR d'aquestes nanopartícules al tenir lloc els diferents processos de reconeixement molecular.

4.2.3 Publicació relacionada

4.2.3.1 Article 3: *Synthesis of steroid-oligonucleotide conjugates for a DNA site-encoded SPR immunosensor.* N. Tort, J.P. Salvador, A. Avinyó, R. Eritja, J. Comelles, E. Martínez, J. Samitier and M.P. Marco. *Bioconjugate Chemistry*, 2012, 23 (11), pp 2183-2191.

Resum de l'article: En aquest article es mostren dues estratègies diferents per a la unió d'haptens, en aquest cas concret per a la detecció d'hormones anabolitzants, a cadenes d'oligonucleòtids; per una banda utilitzant la síntesi en fase sòlida i per l'altra, realitzant la síntesi en solució. Emprant ambdós procediments, àmpliament descrits en l'article, ha estat possible finalment obtenir 3 bioconjugats haptè-oligonucleòtid (8-N_{1up}, hG-N_{2up} i 13-N_{3up}) d'elevat potencial pel seu posterior ús en nous dispositius d'anàlisi immunoquímica per a la detecció d'estanozolol, tetrahydrogestrinona i boldenona, respectivament. Mitjançant l'ús d'un sensor òptic basat en la ressonància del plasmó superficial per imatge (SPR_i) s'ha demostrat la doble funcionalitat d'aquests bioreactius; per una banda, la hibridació amb les cadenes d'oligonucleòtids complementàries respectives, i per l'altra, el reconeixement específic per part dels respectius antisèrums. Aquests bioconjugats obren la porta a una nova metodologia d'immobilització de bioreactius sobre superfícies sensores per dur a terme anàlisis multiplexats de forma ràpida i selectiva.

Synthesis of Steroid–Oligonucleotide Conjugates for a DNA Site-Encoded SPR Immunosensor

Nuria Tort,^{†,‡} J.-Pablo Salvador,^{†,‡} Anna Aviñó,^{‡,‡,‡,‡} Ramón Eritja,^{*,‡,‡,‡,‡,‡} Jordi Comelles,^{§,‡} Elena Martínez,^{§,‡} Josep Samitier,^{§,||,‡} and M.-Pilar Marco^{†,‡}

[†]Applied Molecular Receptors Group (AMRg) and [‡]Nucleic Acids Chemistry Group. Chemical and Biomolecular Nanotechnology Department. IQAC–CSIC. Jordi Girona, 18-26, 08034-Barcelona, Spain

[§]Nanobioengineering Group, Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC), Baldiri Reixac, 10-12, 08028 Barcelona, Spain

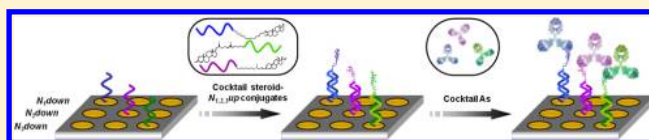
^{||}Department of Electronics, University of Barcelona, Martí i Franquès, 1, 08028 Barcelona, Spain

[‡]CIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN)

[#]Institute for Research in Biomedicine, Baldiri Reixac 19, E-08028 Barcelona, Spain

Supporting Information

ABSTRACT: The excellent self-assembling properties of DNA and the excellent specificity of the antibodies to detect analytes of small molecular weight under competitive conditions have been combined in this study. Three oligonucleotide sequences (N_{1up} , N_{2up} , and N_{3up}) have been covalently attached to three steroidal haptens (8, hG, and 13) of three anabolic-androgenic steroids (AAS), stanozolol (ST), tetrahydrogestrinone (THG), and boldenone (B), respectively. The synthesis of steroid–oligonucleotide conjugates has been performed by the reaction of oligonucleotides carrying amino groups with carboxyl acid derivatives of steroidal haptens. Due to the chemical nature of the steroid derivatives, two methods for coupling the haptens and the ssDNA have been studied: a solid-phase coupling strategy and a solution-phase coupling strategy. Specific antibodies against ST, THG, and B have been used in this study to assess the possibility of using the self-assembling properties of the DNA to prepare biofunctional SPR gold chips based on the immobilization of haptens, by hybridization with the complementary oligonucleotide strands possessing SH groups previously immobilized. The capture of the steroid–oligonucleotide conjugates and subsequent binding of the specific antibodies can be monitored on the sensogram due to variations produced on the refractive index on top of the gold chip. The resulting steroid–oligonucleotide conjugates retain the hybridization and specific binding properties of oligonucleotides and haptens as demonstrated by thermal denaturation experiments and surface plasmon resonance (SPR).



INTRODUCTION

The food safety, biomedical research, and environmental monitoring areas require methods of screening with the ability to detect, rapidly and sensitively, trace amount of small targets (<1000 Da). As an example, anabolic androgenic steroids (AAS) are completely prohibited substances by the WADA (World Antidoping Agency)¹ and the European Community,² for their respective use to improve athletic performance and to increase meat production in the agro-alimentary field, due to the associated adverse health effects. Immunosensors based on the surface plasmon resonance (SPR) principle provide a rapid and convenient analytical alternative for monitoring (bio)-chemical substances in a label-free way.^{3–9} Several strategies have been used to anchor the immunoreagents onto gold chips to develop SPR biosensors to detect small molecules under competitive immunochemical configurations. In indirect formats, usually a protein functionalized with the hapten is immobilized on the surface of the transducer;^{10–12} however, alternative methods to avoid the use of a carrier protein have been described. For example, an oligo(ethyleneglycol) (OEG) linker was used on a SPR biosensor to detect 2,4,6-trinitrotoluene (TNT)¹³ and testosterone.¹⁴ In direct detection

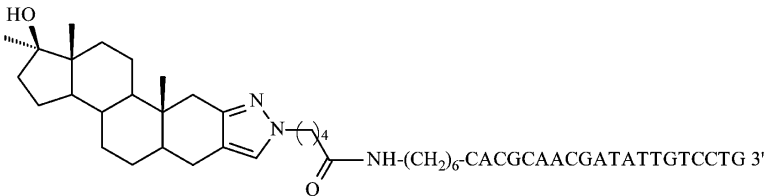
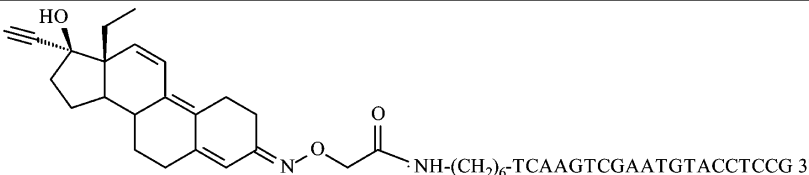
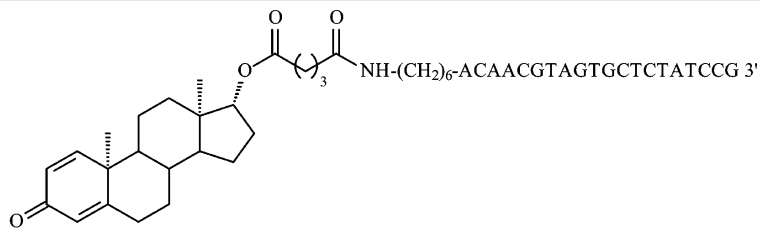
formats, the antibody can be immobilized directly through a self-assembled layer (SAM) of heterobifunctional linkers possessing a thiol group, although alternative methods to appropriately orientate the antibody molecule have also been described. Thus, the immobilization of antibodies by affinity interaction has been reported with a layer of protein A previously immobilized on the gold substrate.¹⁵ Moreover, the use of DNA–protein conjugates has also been reported on nanoscale immunosensors microstructured biochips.¹⁶ Hence, a protein G–DNA conjugate has been employed to ensure controlled immobilization of antibodies to intended areas of a chip surface or to particles.¹⁷ The DNA-directed immobilization (DDI) strategy provides a chemically mild process for the simultaneous binding of multiple proteins to a solid support using DNA surfaces as immobilization matrices. It consists of tagging biomolecules with oligonucleotide chains that are complementary to ssDNA previously linked on the surface. An additional advantage of this strategy is the possibility of

Received: March 21, 2012

Revised: September 26, 2012

Published: October 29, 2012

Table 1. Oligonucleotide Sequences and Chemical Structures of the Steroidal Haptens Used in This Study

Name	Sequence
N_1 down-SH	5' HS-(CH ₂) ₆ -CAGGACAATATCGTTGCGTG 3'
8- N_1 up	
N_2 down-SH	5' HS-(CH ₂) ₆ -CGGAGGTACATTGACTTGA 3'
hG- N_2 up	
N_3 down-SH	5' HS-(CH ₂) ₆ -CGGATAGAGCACTACGTTGT 3'
13- N_3 up	

producing regenerable sensor surfaces due to the reversible nature of the DNA hybridization reaction. This strategy has been used to immobilize antibodies covalently linked to ssDNA onto a SPR surface where the complementary strands have been previously immobilized, to detect three fertility hormones in a direct competitive format.^{18,19} However, this approach has been rarely used to immobilize haptens on a SPR gold chip. Previously, we demonstrated the possibility of using DDI to create hapten microarrays for fluorescent detection.²⁰ This time, our objective has been to demonstrate the biofunctionality of steroid–oligonucleotide bioconjugates synthesized and characterized to use them on a SPR biosensor and to assess the possibility of developing multiplexed SPR immunosensors for small organic molecules by directly immobilizing the haptens on the gold chip through a DDI approach.^{12,22–27}

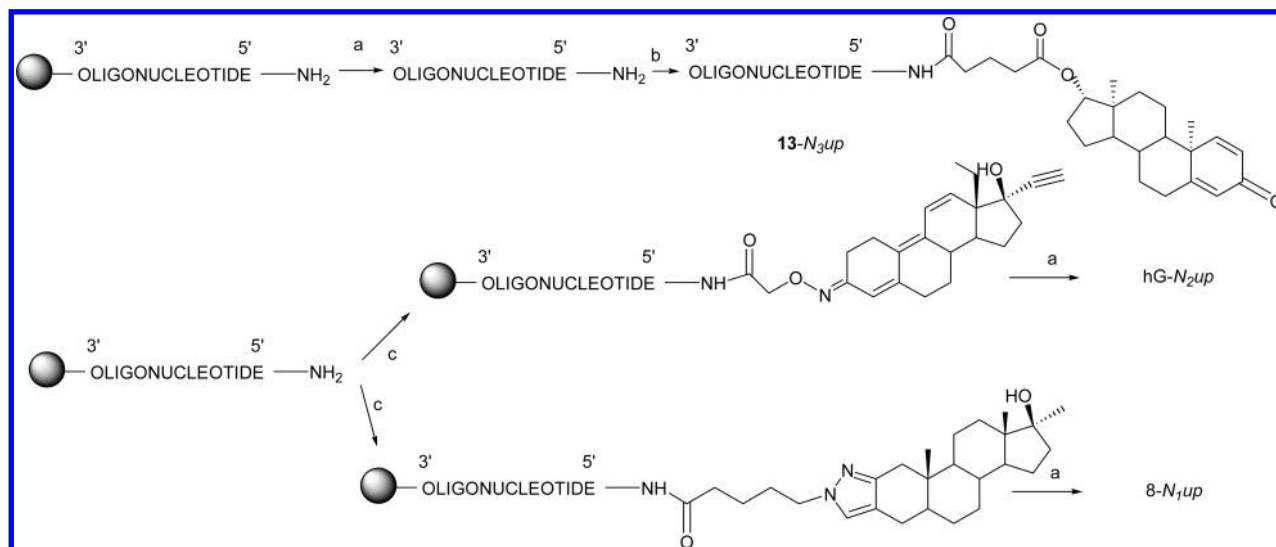
EXPERIMENTAL PROCEDURES

Chemicals, Reagents, and Buffers. *General.* Phosphoramidites and ancillary reagents used during oligonucleotide synthesis were from Applied Biosystems (PE Biosystems Hispania S.A., Spain), Link Technologies (Link Technologies Ltd., Scotland), and Glen Research (Glen Research Inc., USA). The rest of the chemicals were purchased from Aldrich, Sigma, or Fluka (Sigma-Aldrich Química S.A., Spain). NAP-10

columns (Sephadex G-25) were purchased from Pharmacia Biotech. The preparation of the stanozolol (ST), tetrahydrogestrinone (THG), and boldenone (B) haptens (8, hG, and 13, respectively) and the production of the antisera (As147, As170, and As138, respectively) has been described previously.^{28–30} *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimide 99% (DCC) was purchased from Aldrich and the *N*-hydroxysuccinimide (NHS) from Fluka. Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate (PyBOP) was from Bachem (Bachem, Switzerland). Long-chain alkylamine controlled pore glass (LCAA-CPG) was from CPG (CPG Inc., New Jersey, USA).

Instrumentation. Oligonucleotide sequences were synthesized on an Applied Biosystems DNA synthesizer model 3400 (Applied Biosystems, USA). Mass spectra (matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight, MALDI-TOF) were provided by the mass spectrometry service of the University of Barcelona. UV–vis spectra were recorded on a Shimadzu UV-2101PC spectrophotometer. HPLC (SHIMADZU-9A) with manual injector volume of 150 μ L, bomb LC-9A, and detector SPD-M6A UV–vis.

Commercial SPR chips with bare gold surface, SPRchip and spotReady (GWC Technologies, USA) substrates, were used for all the experiments. Imaging SPR measurements were collected with a GWC Technologies SPR Imager II instrument (GWC Technologies, USA). Measurements were performed at

Scheme 1. Synthesis of Steroid–Oligonucleotide Conjugates^a

^a(a) ammonia treatment, (b) hapten coupling using DCC and NHS, and (c) hapten coupling using PyBOP and DIPEA.

a fixed angle of incidence collecting the changes on the reflected light intensity through imaging the SPR chip with a CCD camera. The spotReady chips contain an array of gold spots where positive and negative controls can be included and measured simultaneously. Individual chips were index-matched to the prism and fitted with a 20 μ L flow cell connected to a peristaltic pump from Ismatec (Glattbrugg, Switzerland). A total volume of 0.5 mL was needed to completely fill the tubing and flow cell with buffer or analyte. The SPR images were collected and analyzed using V⁺2 software (Digital Optics, New Zealand).

Synthesis and Purification of Oligonucleotides and Steroid–Oligonucleotide Conjugates. Three pairs of oligonucleotide complementary sequences were designed (see Table 1). Three oligonucleotides were prepared with an amino group at the 5'-end (N_1up , N_2up , and N_3up) and the three complementary sequences contained a thiol group at 5'-end (N_1down , N_2down , and N_3down). Oligonucleotide sequences carrying an amino and thiol group at the 5'-end were assembled on a 1 μ mol scale. The benzoyl (Bz) group was used for the protection of the amino group of C and A, and the isobutyryl (ibu) group for the protection of G. The phosphoramidite derivative of 6-aminohexanol carrying the monomethoxytrityl (MMT) group (Glen Research and Link Technologies)³¹ was used for the introduction of the amino group at the 5'-end. The thiol group at the 5'-end was introduced using the phosphoramidite derivative of 6-hydroxyhexyldisulfide protected with the dimethoxytrityl (DMT) group (5'-thiol modifier C6 S–S CE phosphoramidite, Link Technologies, Inc., Scotland). Coupling yields were >98%. After the assembly of the sequences, the resulting solid supports (except for N_1up and N_2up) were treated with concentrated ammonia for 6 h at 50 °C. Oligonucleotides carrying thiol groups were deprotected with concentrated ammonia carrying 0.1 M dithiothreitol (DTT). The resulting $N_{1-3}down-SH$ oligonucleotides were stored in presence of DTT to prevent the disulfide formation. Prior to immobilization, thiol-oligonucleotides were desalted with Sephadex G-25 (NAP-10 columns, GE Healthcare) eluted with water to remove the excess of DTT.

The corresponding $N_{1-3}up-NH_2$ oligonucleotides have been conjugated with the steroids (8, hG, and 13, respectively). For the preparation of these conjugates, we have used two different approaches: (1) the active ester method in aqueous solution (solution-phase strategy), which consists of the activation of the acid of the steroidal haptens using DCC and NHS, and (2) the solid-phase strategy, using PyBOP as activating agent and diisopropylethylamine (DIPEA).

1. Synthesis of Oligonucleotides Carrying Steroids Using the Solution-Phase Coupling Protocol (Scheme 1). The resulting solid support obtained after the assembly of the oligonucleotide sequence ($N_{3up}-NH_2$), and removal of the last MMT group, was treated with concentrated ammonia for 6 h at 50 °C. The mixture was filtered and the ammonia solution concentrated to dryness. The residue was passed over a Dowex 50 \times 4 (Na^+ form) column to exchange ammonium for sodium ions. The resulting amino-oligonucleotide was dissolved in 0.2 mL of water and mixed with 0.1 mL of an aqueous buffer. We tried three different aqueous buffers: (1) 1 M sodium carbonate, pH 9.0; (2) 50 mM Tris pH 8.5; and (3) 0.2 M sodium borate pH 8.6. In a separate container, the steroidal hapten with the carboxylic acid group (13, 10 molar excess) was dissolved in 0.1 mL of DMF and mixed with NHS (25 molar excess) and DCC (50 molar excess). The mixture was left with magnetic stirring for 3 h at room temperature, until the solution became opaque due to the precipitation of the urea. Then, we centrifuged (10 000 rpm for 15 min) to remove the precipitate and the supernatant was added to the aqueous solution of the amino-oligonucleotide. The reaction mixture was kept at 37 °C with magnetic stirring overnight. The mixture was concentrated to dryness, and the residue was dissolved in water and passed through a NAP-10 column. Finally, the oligonucleotide fractions were analyzed by reverse-phase HPLC-UV. HPLC solutions were solvent A, 5% ACN in 100 mM triethylammonium acetate (TEAA) pH 6.5, and solvent B, 70% ACN in 100 mM triethylammonium acetate pH 6.5. Column: PRP-1 (Hamilton), 350 \times 8 mm. Flow rate: 3 mL/min. A 20 min lineal gradient from 5% to 35% ACN was used. The desired oligonucleotide conjugate carrying the steroid eluted at around 11 min, while the unreacted amino-oligonucleotide eluted at

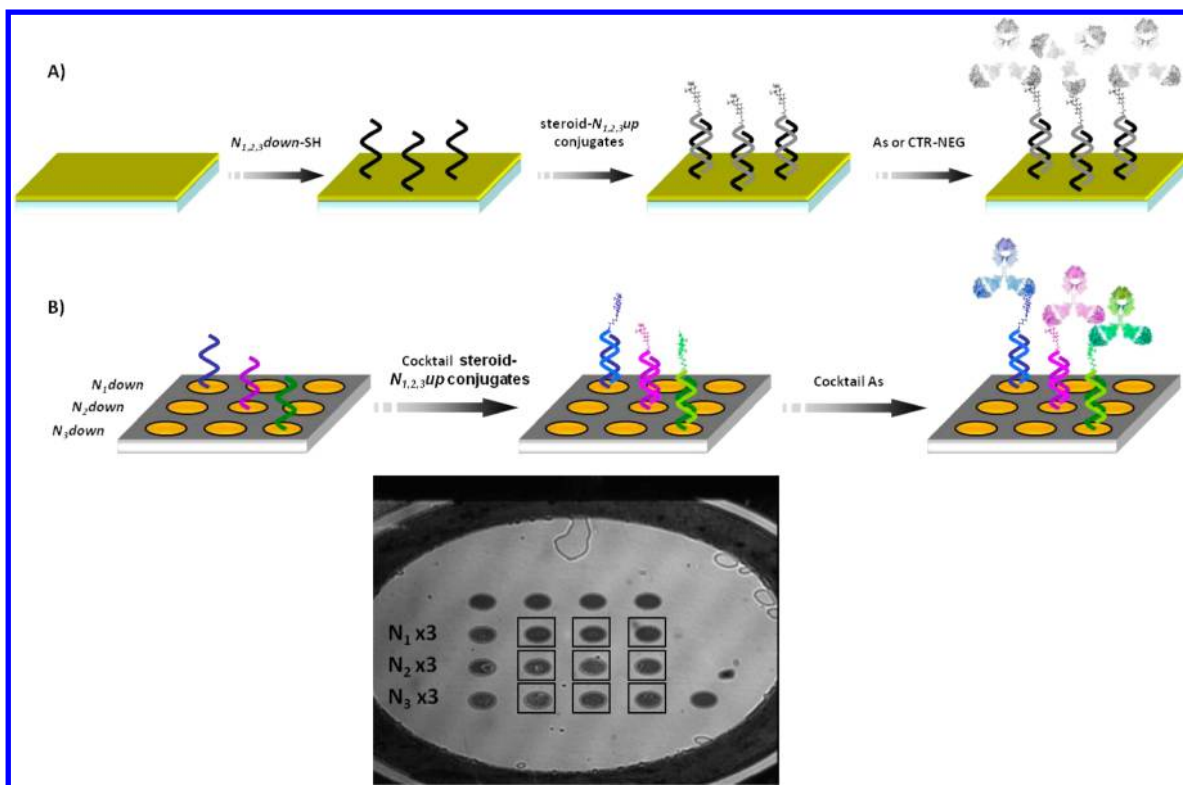


Figure 1. Schematic representation of the experimental procedure employed to assess the steroid–oligonucleotide bioconjugate biofunctionality by SPR. ssDNA biofunctionalized chips are used to immobilize the haptens through hybridization with the corresponding steroid–oligonucleotide bioconjugates. Subsequently, biofunctionality is assessed by exposing the chips to specific antibodies. (A) Evaluation of the biofunctionality of each steroid–oligonucleotide conjugate (8- N_1up , hG- N_2up , and 13- N_3up) using the individual SPR procedure. (B) Evaluation of the DNA site-encoded applicability of these conjugates for the development of a multiplexed SPR immunosensor.

around 2–5 min. The desired product was characterized by UV-spectra and mass spectrometry (MALDI-TOF), with a global yield for 13- N_3up of 20% (carbonate buffer) to 30% (Tris, borate buffers). MALDI-TOF m/z (negative mode) 13- N_3up , calc 6639, found 6400 (M-239) corresponding to the fragmentation of the ester linkage of the hapten during the acquisition of MALDI spectra. Electrospray m/z (negative mode) 13- N_3up , calc 6639, found 6639. Increasing the molar excess of active ester from 10 \times to 30 \times excess allows the conversion of the amino-oligonucleotide to the desired conjugate to 45%.

2. Synthesis of Oligonucleotides Carrying Steroids Using the Solid-Phase Coupling Protocol. The oligonucleotide sequences carrying an amino group at the 5'-end were prepared as described above ($N_{1,2}up-NH_2$). The resulting solid supports were treated with 3% trichloroacetic acid/ CH_2Cl_2 to eliminate the MMT group, washed with ACN, and reacted with the carboxylic acid derivatives of the steroids as follows. A mixture containing 10 molar excess of the hapten (hG or 8), 20 molar excess of N,N -diisopropylethylamine (DIEA), and 10 molar excess of PyBOP was prepared in dry DMF (0.2 mL). The mixture was left for 10 min at room temperature and added to the support. After 30 min at room temperature, the mixture was filtered and washed with DMF and ACN. The support was dried, and concentrated ammonia (1 mL) was added. The ammonia solution was left for 6 h at 50 °C. The mixture was filtered and the ammonia solution was concentrated to dryness. The fractions containing oligonucleotide were analyzed by HPLC-UV as described above. The desired steroid–oligonucleotide conjugates eluted at around 11 min, and were obtained

with global yields of 52% for 8- N_1up and 40% for hG- N_2up . Finally, the conjugates were characterized by UV and mass spectrometry (MALDI-TOF). MALDI-TOF m/z (negative mode) 8- N_1up , calc 6668, found 6672; hG- N_2up , calc 6619, found 6614. In this last compound, we also observed a second peak at 6333 m/z corresponding to the hapten fragmentation at the oxime bond.

DNA Site-Encoded SPR Immunosensor. General Considerations. All the SPR experiments began with a buffer baseline (10 mM PBS with 100 mM NaCl, assay buffer), and the same buffer was used to wash between each step and to prepare all the solutions of the bioreagents. All the solutions were flowed at a rate of 3 $\mu L \cdot s^{-1}$. Solutions carrying the thiolated oligonucleotides ($N_{1,2,3}down-SH$) and the steroid–oligonucleotide conjugates (8- N_1up , hG- N_2up , and 13- N_3up) were prepared at 150 $\mu g \cdot mL^{-1}$ and 60 $\mu g \cdot mL^{-1}$, respectively, in the assay buffer. Nonspecific adsorption of proteins was avoided by using a blocking solution of 2% of bovine serum albumine (BSA). Antisera for ST (As147), THG (As170), and B (As138) and for negative controls (CTR-NEG, preimmune serum) were diluted 250 times in the assay buffer.

Individual SPR Procedure. (Figure 1A) Biofunctionalization of the SPRchip was accomplished by flowing a solution of the thiolated oligonucleotides down ($N_{1,2,3}down-SH$) for 15 min. A solution containing the corresponding steroid–oligonucleotide conjugate (8- N_1up /hG- N_2up /13- N_3up) in the assay buffer was flowed to the cell for about 20 min, until a steady-state was reached. Afterward, the chip was washed (10 min), and the blocking solution was passed (15 min). After a new washing step, the solution of the specific antisera (As147/As170/As138,

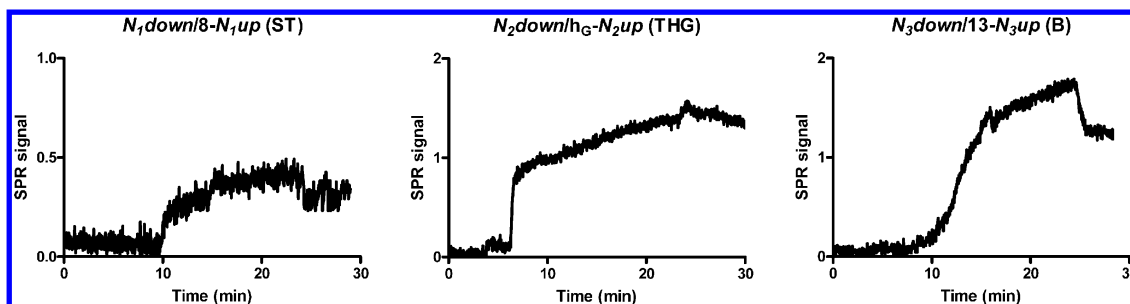


Figure 2. SPR sensograms recorded on the hybridization step between the steroid–oligonucleotide conjugates and the oligonucleotides *down* previously immobilized on the chip surface.

1/250 dilution) was flowed for about 20 min until the signal reached the maximum, and then washed again with the assay buffer. At the end of the cycle, the chips were regenerated by flowing a solution of 0.3 M NaOH for about 15 min. The regeneration step provided gold chips with the N_x down-SH oligonucleotides immobilized. Absence of nonspecific binding was assessed by passing a solution of a preimmune serum.

Multiplexed SPR Procedure. (Figure 1B) For this experiment, a spotReady substrate with 16 gold spots per chip, with a spot diameter of 1 mm, was used, and the solutions of N_x down-SH oligonucleotides ($150 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in the assay buffer) were deposited ($0.5 \mu\text{L}/\text{spot}$) per triplicate for 1 h at room temperature. Then, with the chip inside the SPR setup, a solution containing a mixture of the three steroid–oligonucleotide conjugates ($8\text{-}N_1\text{up}/\text{hG}\text{-}N_2\text{up}/13\text{-}N_3\text{up}$) was flowed to the cell for about 20 min, until a steady state was reached. Afterward, the chip was washed (10 min), and the blocking solution was passed (10 min). After a new washing step, a solution with a mixture of the three specific antisera (As147/As170/As138, called cocktail As), was flowed for about 25 min until the signal reached the maximum, and then washed again with buffer. The existence of no cross-hybridization between the different oligonucleotides pairs and the affinity of each antibody for the different steroid–oligonucleotide conjugates had been previously studied.²⁰

RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis and Purification of Steroid–Oligonucleotide Conjugates. A set of three complementary pairs of ssDNA (N_1 , N_2 , and N_3 , *up* and *down*) were synthesized. These sequences have 50% G/C content (purines/pyrimidines) and have the same composition but different sequences. In this way, it is expected that the three resulting duplexes will have similar hybridization properties. The sequences should display high hybridization efficiency for maximum hapten density at the surface after immobilization. The specificity of the hybridization of these sequences has been previously studied in our group in a microarray multiplexed competitive format,²⁰ and the results indicated hardly any cross-hybridization between the three sequences.

Once a complete set of oligonucleotides sequences were chosen, the steroid–oligonucleotide conjugates were prepared. The synthesis of oligonucleotides carrying steroids such as cholesterol,^{32,33} hydroxyprogesterone,³⁴ dexamethasone,³⁵ digoxigenin,³⁶ cholic,³⁷ lithocholic,³⁸ and bile acids³⁹ have been described in order to obtain hydrophobic derivatives of oligonucleotides for antisense, triplex, and RNA interference studies.⁴⁰ Most of these compounds are synthesized by conjugation of carboxylic acid derivatives to oligonucleotide

carrying amino groups, although the direct incorporation to oligonucleotides using the corresponding phosphoramidites have also been described for compounds that can be prepared in large amounts.^{32–34} In our case, the amount of carboxylic acid derivatives available was low, so postsynthetic methods were selected. Thus, ST, THG, and B steroid–oligonucleotide conjugates were prepared through the formation of amide bonds (see Table 1). The steroidal haptens used in these conjugations have been previously used to develop enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) to detect AAS in real samples.^{28–30}

The conjugation of boldenone hapten¹³ to amino-oligonucleotide $N_3\text{up}$ was performed with the unprotected amino-oligonucleotide in aqueous solution. The hapten 13 has an ester group, which in basic medium could be hydrolyzed. For this reason, conjugation was not possible before ammonia deprotection. Therefore, we used the solution-phase coupling to obtain the desired conjugate $13\text{-}N_3\text{up}$ (B) in 20–30% yield (Figure S2, Supporting Information). The NHS-ester of 13 was prepared by reaction of the carboxylate moiety with NHS using DCC.⁴¹ Increasing the molar excess of active ester from 10× to 30× excess allows the conversion of the amino-oligonucleotide to the desired conjugate to 45% (Figure S2, Supporting Information). The mass obtained for this conjugated was 6400 m/z , while the mass expected was 6639 m/z . We attribute this difference to the fact that during MALDI-TOF analysis fragmentation can occur as a result of heating (laser ionization) in the acidic environment (the matrix) and then what we could observe is the oligonucleotide with the steroid attached hydrolyzed at the ester point. This was confirmed by using electrospray MS analysis. The softer ionization conditions provided the expected mass ($13\text{-}N_3\text{up}$, calc 6639, found 6639).

On the other hand, it had been also reported that solid-phase synthesis may be advantageous to the standard synthesis in solution,⁴² since it allows forming the amide bond in organic solvent in which the steroidal haptens have better solubility. Thus, the conjugates $8\text{-}N_1\text{up}$ (ST) and $\text{hG}\text{-}N_2\text{up}$ (THG) (Table 1) were obtained in higher yields (52–40%), demonstrating that the conjugation reaction is clearly advantageous using the solid-phase coupling protocol. Both conjugates were characterized with MALDI-TOF mass spectrometry ($8\text{-}N_1\text{up}$, calc 6668, found 6672; $\text{hG}\text{-}N_2\text{up}$, calc 6619, found 6614).

In order to assess the influence of the steroids in the duplex structure, denaturation curves were analyzed. Table S1 (Supporting Information) shows the melting temperatures of duplexes carrying the steroids stanozolol,⁸ tetrahydrogestrinone (hG), and boldenone.¹³ As expected, the presence of the steroid at the 5'-end of the duplex has very little effect on the stability of the duplex.

The recognition of the oligonucleotide–steroid conjugates by specific antibodies was analyzed by immobilization of the duplex DNA carrying steroids on glass surfaces followed by incubation with the specific antisera and the visualization of the antigen–antibody interaction with a fluorescently labeled antirabbit secondary antibody as described previously.²⁰ The presence of the oligonucleotides chain does not affect to the recognition of antigen antibody, as can be observed in the detectability parameters (LOD and IC₅₀) in Table S2 in the Supporting Information.

Evaluation by SPR of the Biofunctionality of the Steroid–Oligonucleotide Conjugates. *Hybridization.* The specificity of the hybridization step was assessed by SPR by flowing the solutions of the steroid-*N*_{1–3}*up* conjugates into a cell containing the *N*_{1–3}*down* functionalized chips and recording the SPR signal (see Figure 2). The DNA double helix is stabilized by hydrogen bonds between the bases of the two strands. The strength of the double-stranded formation depends on (a) the number of matching bases in a sequence, (b) the number and loci of mismatches, and (c) the base composition. The prevailing DNA architecture, the double helix, has well-stacked nearly parallel bases with overlapping π -electron systems. Such π -electron systems may be good candidates for long-distance and one-dimensional (linear) charge transport.⁴³ Yoo et al.^{44,45} demonstrated differences in conductivity due to variation in the base pair sequence. Poly(dG).Poly(dC) showed a conductivity of 40 S/cm, whereas that for Poly(dA).Poly(dT) was about 0.1 S/cm. This fact could be an explanation to the different behavior in the hybridization between the three hapten–oligonucleotide conjugates, because as it can be observed in Figure 2, the *N*₁*down*/*N*₁*up*-8 pair has a lower change in the SPR signal than the *N*₂*down*/*N*₂*up*-hG and *N*₃*down*/*N*₃*up*-13 pairs. In Table 1, the sequence of the oligonucleotide *N*₁*down* at the 5'-end has CAG, whereas the sequences *N*₂*down* and *N*₃*down* have CGG. Therefore, changes in the conductometric properties of the double helix could affect the refractive index and influence in the SPR signal.^{46,47}

Immunochemical Recognition. Three specific antisera (As147, As170, and As138, 1/250 dilution) and a nonspecific serum (CTR-NEG) were used to test whether, after the conjugation of the steroids with the oligonucleotides chains, the antibodies could still recognize their corresponding steroidal haptens. The features of these antibodies have been previously described.^{28–30} Results presented in Figure 3 and Figure S1 (Supporting Information) show the change in the SPR signal recorded as a result of three consecutive cycles in different chips for each system (ST, THG, and B). The first cycle shows the specific antibody binding to each steroid–oligonucleotide conjugate (steroid-*N*_{1–3}*up*) hybridized on the surface of the sensor. On each graph, the absence of nonspecific signal can also be observed when the CTR-NEG serum was injected, after regenerating the surface. Similarly, subsequent injection of the specific antiserum on systems ST and THG allows recovering the same signal again. In the case of the B system, the signal of the third cycle is lower than the signal obtained in the first cycle, but both first and third cycles are clearly much higher than the nonspecific (CTR-NEG) second cycle. The difference between the first and third cycles for the B system (*N*₃*down*-*N*₃*up*-13/As138) could be attributed to the low S/N ratio obtained or to a small loss of the binding response. The differences observed in the maximum of the signal and in the slope of the binding step, among the three systems *N*₁, *N*₂, and

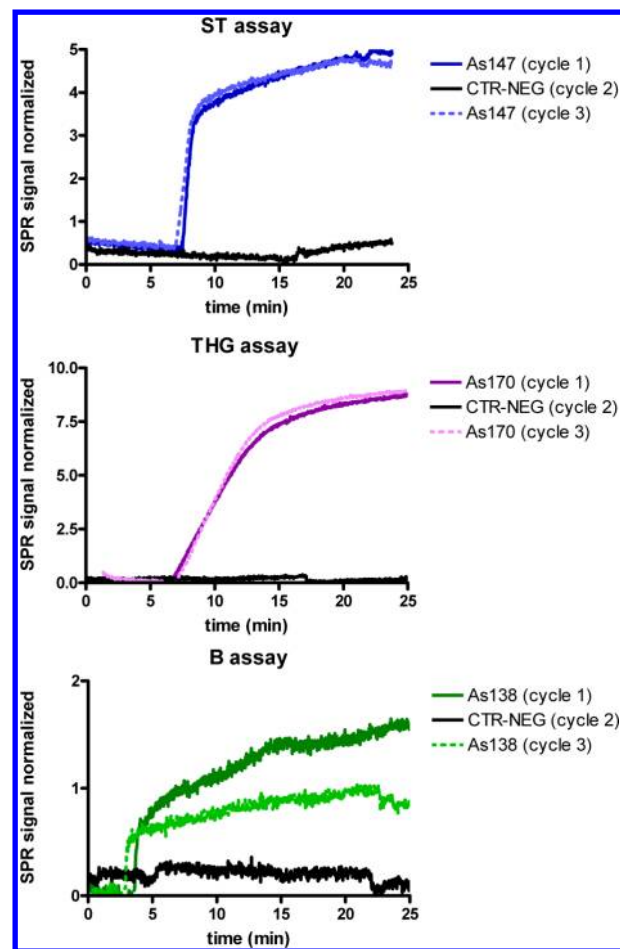


Figure 3. SPR sensograms recorded on the antibody binding step: ST (top), THG (middle), and B (bottom). Each graph shows the response of three consecutive cycles, after regeneration of the surface at the end of each cycle: (a) first cycle, specific antibody; (b) second cycle, preimmune serum; (c) third cycle, specific antibody.

*N*₃ (see Figure 3) are due to the distinct antisera affinity for the corresponding steroid–oligonucleotide conjugates. Another remarkable fact is the complete regeneration of the surface with a simple washing step with diluted NaOH solution, which offers the possibility that the chips can be reused.

Finally, as a proof of concept, the possibility of developing a multiplexed SPR immunosensor was demonstrated. In this experiment, the DNA-directed immobilization of a cocktail of steroid–oligonucleotide conjugates was used to detect the three AAS simultaneously, under competitive conditions (see Figure 4). The DNA biofunctionalized chip was prepared using a spotReady substrate with 16 gold spots per chip in which the oligonucleotides *N*₁*down*-SH, *N*₂*down*-SH, and *N*₃*down*-SH were deposited per triplicate spots. Then, with the chip placed inside the SPR setup, the assay was performed as described in the Experimental Procedures by flowing a solution containing a mixture of the three steroid–oligonucleotide conjugates (8-*N*₁*up*/hG-*N*₂*up*/13-*N*₃*up*) (Figure 4 left), followed by the cocktail As (Figure 4 right). As can be observed, the change in the refractive index produced in the hybridization step and as result of the antibody binding is recorded as an SPR signal on each respective spot demonstrating the possibility of using DDI to prepare hapten-biofunctionalized SPR chips responding simultaneously to the presence of the corresponding specific antibodies.

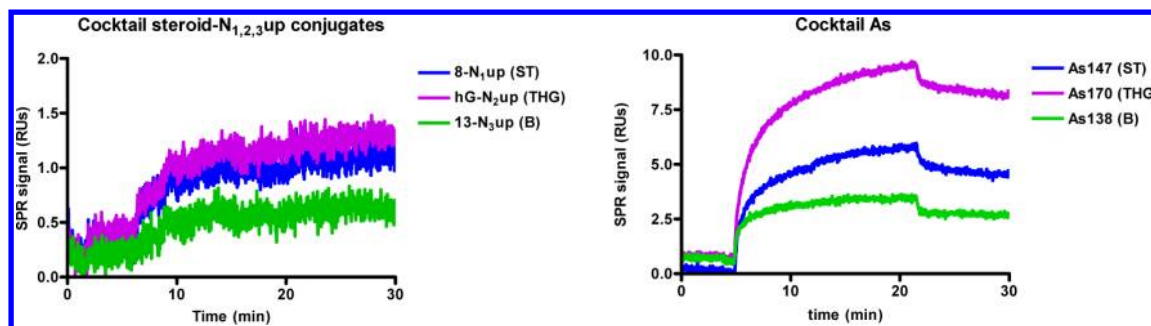


Figure 4. Sensograms recorded in the DNA-directed SPR immunosensor: on the left, the specific hybridization of the steroid–oligonucleotide conjugates with their complementary strands previously immobilized on the gold chip; on the right, the immunochemical recognition of each specific antibody for the corresponding steroid.

CONCLUSIONS

Immunochemical methods show great potential for detection of small targets for a large number of applications. In spite of the powerful analytical tools that are being developed, one of the important issues is the efficient immobilization of analytes to the sensing surfaces. The present work demonstrates the potential of oligonucleotide–steroid conjugates for DNA-directed immobilization of haptens on sensor surfaces. To this end, we have demonstrated that three different steroids can be conjugated to oligonucleotides using the same steroid derivatives used for the obtention of protein-conjugates needed for immunization. Moreover, the results show that coupling of the hapten to the oligonucleotides preserves the antibody recognition properties allowing the construction of a biosensor for the specific detection of steroids. The presence of the steroid does not affect the hybridization properties of the oligonucleotides. The immobilization of the conjugates to the gold sensing surface is performed by immobilization of the complementary strand carrying a thiol group followed by hybridization. The DNA-directed immobilization strategy presents the advantage of the possibility of reusing the same sensor chip for multiple measurements after an easy dehybridization step. Moreover, consecutive measurement cycles addressed to detect other molecules could be performed on the same DNA-chip, by just binding distinct haptens, proteins, or antibodies, to the complementary oligonucleotide strands. The strategy presented here shows a valuable approach for small organic molecule detection on biosensors. The coupling of the hapten to the oligonucleotide has been demonstrated to preserve the antibody recognition properties allowing the construction of a biosensor for the specific detection of estereoids. For these reasons, the use of the DNA-direct immobilization strategy opens the way to get a multiplexed imaging SPR immunosensor by easily immobilizing distinct haptens on different spots of the ssDNA biofunctionalized chip. This methodology opens the possibility to detect a large number of analytes simultaneously using a DNA site-encoded chip in multichannel SPR devices^{12,22} and SPR-imaging biosensors,^{23–27} or in the future, using encoded nanoparticles biofunctionalized with the specific antibodies for multiplex-localized surface plasmon resonance (LSPR) sensing. Finally, the methodology described for the preparation of the steroid–oligonucleotide conjugates may be useful for the generation of potential nucleic acid drugs.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Examples of complete SPR sensograms obtained for each system, stanozolol (ST, 8), tetrahydrogestrinone (THG, hG), and boldenone (B, 13). HPLC analysis and mass spectra of oligonucleotide conjugate 13-N₃up. Melting temperatures of duplexes carrying steroids and analysis of the recognition of the conjugates with specific antisera. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone 34-934039942; E-mail recgma@cid.csic.es.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Ministry of Science and Innovation, MICINN (MAT2011-29335-C03-01 and CTQ2010-20541-C03-01), CCEE (FUNMOL, FP7-NMP-213382-2), Generalitat de Catalunya (2009/SGR/1343, 2009/SGR/208), and CIBER-BBN. CIBER-BBN is an initiative funded by the VI National R&D&i Plan 2008–2011, Iniciativa Ingenio 2010, Consolider Program, CIBER Actions, and financed by the Instituto de Salud Carlos III with assistance from the European Regional Development Fund. Núria Tort has a FI_B fellowship from the AGAUR (Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca) of the (Generalitat de Catalunya) Government of Catalonia.

REFERENCES

- (1) WADA (2010) The 2010 prohibited list. http://www.wada-ama.org/documents/world_anti-doping_program/wadp-prohibited-list/wada_prohibited_list_2010_en.pdf.
- (2) EEC (1996) Directive 96/23/EC. *Off. J. Eur. Commun. L* 125, 3.
- (3) Mullett, W. M., Lai, E. P. C., and Yeung, J. M. (2000) Surface plasmon resonance-based immunoassays. *Methods* 22, 77–91.
- (4) Shankaran, D. R., Gobi, K. V., and Miura, N. (2007) Recent advancements in surface plasmon resonance immunosensors for detection of small molecules of biomedical, food and environmental interest. *Sens. Actuators, B* 121, 158–177.
- (5) Hoa, X. D., Kirk, A. G., and Tabrizian, M. (2007) Towards integrated and sensitive surface plasmon resonance biosensors: A review of recent progress. *Biosens. Bioelectron.* 23, 151–160.
- (6) Ricci, F., Volpe, G., Micheli, L., and Palleschi, G. (2007) A review on novel developments and applications of immunosensors in food analysis. *Anal. Chim. Acta* 605, 111–129.

- (7) Campbell, C. T., and Kim, G. (2007) SPR microscopy and its applications to high-throughput analyses of biomolecular binding events and their kinetics. *Biomaterials* 28, 2380–2392.
- (8) Cooper, M. (2003) Label-free screening of bio-molecular interactions. *Anal. Bioanal. Chem.* 377, 834–842.
- (9) Boozer, C., Kim, G., Cong, S., Guan, H., and Londergan, T. (2006) Looking towards label-free biomolecular interaction analysis in a high-throughput format: a review of new surface plasmon resonance technologies. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17, 400–405.
- (10) Yuan, J., Oliver, R., Aguilar, M.-L., and Wu, Y. (2008) Surface plasmon resonance assay for chloramphenicol. *Anal. Chem.* 80, 8329–8333.
- (11) Yuan, J., Oliver, R., Li, J., Lee, J., Aguilar, M., and Wu, Y. (2007) Sensitivity enhancement of SPR assay of progesterone based on mixed self-assembled monolayers using nanogold particles. *Biosens. Bioelectron.* 23, 144–148.
- (12) Fernández, F., Hegnerová, K., Piliarik, M., Sanchez-Baeza, F., Homola, J., and Marco, M. P. (2010) A label-free and portable multichannel surface plasmon resonance immunosensor for on site analysis of antibiotics in milk samples. *Biosens. Bioelectron.* 26, 1231–1238.
- (13) Mizuta, Y., Onodera, T., Singh, P., Matsumoto, K., Miura, N., and Toko, K. (2008) Development of an oligo(ethylene glycol)-based SPR immunosensor for TNT detection. *Biosens. Bioelectron.* 24, 191–197.
- (14) Mitchell, J. S., and Lowe, T. E. (2009) Ultrasensitive detection of testosterone using conjugate linker technology in a nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance biosensor. *Biosens. Bioelectron.* 24, 2177–2183.
- (15) Lee, W., Oh, B. K., Min Bae, Y., Paek, S. H., Hong Lee, W., and Choi, J. W. (2003) Fabrication of self-assembled protein A monolayer and its application as an immunosensor. *Biosens. Bioelectron.* 19, 185–192.
- (16) Niemeyer, C. M. (2002) The developments of semisynthetic DNA-protein conjugates. *Trends Biotechnol.* 20, 395–401.
- (17) Jung, Y., Lee, J. M., Jung, H., and Chung, B. H. (2007) Self-directed and self-oriented immobilization of antibody by protein G-DNA Conjugate. *Anal. Chem.* 79, 6534–6541.
- (18) Boozer, C., Ladd, J., Chen, S., and Jiang, S. (2006) DNA-Directed protein immobilization for simultaneous detection of multiple analytes by surface plasmon resonance biosensor. *Anal. Chem.* 78, 1515–1519.
- (19) Boozer, C., Ladd, J., Chen, S., Yu, Q., Homola, J., and Jiang, S. (2004) DNA directed protein immobilization on mixed ssDNA/oligo(ethyleneglycol) self-assembled monolayers for sensitive biosensors. *Anal. Chem.* 76, 6967–6972.
- (20) Tort, N., Salvador, J. P., Eritja, R., Poch, M., Martínez, E., Samitier, J., and Marco, M. P. (2009) Fluorescence site-encoded DNA addressable hapten microarray for anabolic androgenic steroids. *TrAC Trends Anal. Chem.* 28, 718–728.
- (21) Bier, F. F., Kleinjung, F., Ehrentreich-Förster, E., and Scheller, F. W. (1999) Changing functionality of surfaces by directed self-assembly using oligonucleotides—The oligo-tag. *BioTechniques* 27, 752–760.
- (22) Homola, J., Vaisocherová, H., Dostálek, J., and Piliarik, M. (2005) Multi-analyte surface plasmon resonance biosensing. *Methods* 37, 26–36.
- (23) Kanda, V., Kariuki, J. K., Harrison, D. J., and McDermott, M. T. (2004) Label-free reading of microarray-based immunoassays with surface plasmon resonance imaging. *Anal. Chem.* 76, 7257–7262.
- (24) Ladd, J., Taylor, A. D., Piliarik, M., Homola, J., and Jiang, S. (2008) Hybrid surface platform for the simultaneous detection of proteins and DNAs using a surface plasmon resonance imaging sensor. *Anal. Chem.* 80, 4231–4236.
- (25) Rebe Raz, S., Bremer, M. G. E. G., Haasnoot, W., and Norde, W. (2009) Label-free and multiplex detection of antibiotic residues in milk using imaging surface plasmon resonance-based immunosensor. *Anal. Chem.* 81, 7743–7749.
- (26) Kanoh, N., Kyo, M., Inamori, K., Ando, A., Asami, A., Nakao, A., and Osada, H. (2006) SPR Imaging of photo-cross-linked small-molecule arrays on gold. *Anal. Chem.* 78, 2226–2230.
- (27) Lee, H. J., Nedelkov, D., and Corn, R. M. (2006) Surface plasmon resonance imaging measurements of antibody arrays for the multiplexed detection of low molecular weight protein biomarkers. *Anal. Chem.* 78, 6504–6510.
- (28) Salvador, J.-P., Sanchez-Baeza, F., and Marco, M.-P. (2007) Preparation of antibodies for the designer steroid tetrahydrogestrinone and development of an enzyme-linked immunosorbent assay for human urine analysis. *Anal. Chem.* 79, 3734–3740.
- (29) Salvador, J. P., Sánchez-Baeza, F., and Marco, M. P. (2008) Simultaneous immunochemical detection of stanozolol and the main human metabolite, 3'-hydroxy-stanozolol, in urine and serum samples. *Anal. Biochem.* 376, 221–228.
- (30) Kramer, K., Hubauer, A., Lausterer, R., Salvador, J. P., and Marco, M. P. (2007) Production of antibodies for the quantitative detection of the anabolically active Androgens 17 β -boldenone and methylboldenone. *Anal. Lett.* 40, 1461–1472.
- (31) Connolly, B. A. (1987) The synthesis of oligonucleotides containing a primary amino group at the 5'-terminus. *Nucleic Acids Res.* 15, 3131–3139.
- (32) LeDoan, T., Eto, F., Tenu, J. P., Letourneux, Y., and Agrawal, S. (1999) Cell binding, uptake and cytosolic partition of HIV anti-gag phosphodiester oligonucleotides 3'-linked to cholesterol derivatives in macrophages. *Bioorg. Med. Chem.* 7, 2263–2269.
- (33) Letsinger, R. L., and Chaturvedi, S. (1998) Tailored hydrophobic cavities in oligonucleotide-steroid conjugates. *Bioconjugate Chem.* 9, 826–830.
- (34) Ketola, J., Hurskainen, P., and Hovinen, J. (2009) Derivatization of 11-hydroxyprogesterone using phosphoramidite chemistry. *Bioconjugate Chem.* 20, 625–628.
- (35) Acedo, M., Tarrason, G., Piulats, J., Mann, M., Wilm, M., and Eritja, R. (1995) Preparation of oligonucleotide-dexamethasone conjugates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 5, 1577–1580.
- (36) Escarceller, M., Rodríguez-Frias, F., Jardi, R., San Segundo, B., and Eritja, R. (1992) Detection of hepatitis B virus DNA in human serum samples: Use of digoxigenin-labeled oligonucleotides as modified primers for the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 206, 36–42.
- (37) Bhatia, D., Yue-Ming, L., and Ganesh, K. N. (1999) Steroid-DNA conjugates: improved triplex formation with 5-amido-(7-deoxycholeic acid)-dU incorporated oligonucleotides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9, 1789–94.
- (38) Rump, E. T., de Vruhe, R. L. A., Sliedregt, L. A. J. M., Biessen, E. A. L., van Berkel, T. J. C., and Bijsterbosch, M. K. (1998) Preparation of conjugates of oligodeoxynucleotides and lipid structures and their interaction with low-density lipoprotein. *Bioconjugate Chem.* 9, 341–349.
- (39) Starke, D., Lischka, K., Pagels, P., Uhlmann, E., Kramer, W., Wess, G., and Petzinger, E. (2001) Bile acid-oligodeoxynucleotide conjugates: synthesis and liver excretion in rats. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11, 945–949.
- (40) de Fougerolles, A., Vornlocher, H. P., Maraganore, J., and Lieberman, J. (2007) Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discovery* 6, 443–453.
- (41) Thompson, S. (2003) Small-molecule-protein conjugation procedures. In *Molecular Diagnosis of Infectious Diseases*, Decker, J., Reische, U., Eds.; pp 255–265, Chapter 17, Springer Protocols Vol 94, Humana Press, Springer Science, Heidelberg.
- (42) Merrifield, B. (1986) Solid phase synthesis. *Science* 232, 341–347.
- (43) Odom, D. T., Dill, E. A., and Barton, J. K. (2000) Robust charge transport in DNA double crossover assemblies. *Chem. Biol.* 7, 475–481.
- (44) Yoo, K. H., Ha, D. H., Lee, J. O., Park, J. W., Kim, J., Kim, J. J., Lee, H. Y., Kawai, T., and Choi, H. Y. (2001) Electrical conduction through poly(dA)-poly(dT) and poly(dG)-poly(dC) DNA molecules. *Phys. Rev. Lett.* 87, 198102.

(45) Taniguchi, M., and Kawai, T. (2005) Electron-molecular-vibration coupling for small polarons in DNAs. *Phys. Rev. E* 72, 061909.

(46) Georgiadis, R., Peterlinz, K. A., Rahn, J. R., Peterson, A. W., and Grassi, J. H. (2000) Surface plasmon resonance spectroscopy as a probe of in-plane polymerization in monolayer organic conducting films. *Langmuir* 16, 6759–6762.

(47) Kang, X., Cheng, G., and Dong, S. (2001) A novel electrochemical SPR biosensor. *Electrochem. Commun.* 3, 489–493.

Synthesis of steroid-oligonucleotide conjugates for a DNA site-encoded SPR immunosensor

Nuria Tort^{1,5}, J.-Pablo Salvador^{5,1}, Anna Aviñó^{2,5,6}, Ramón Eritja^{2,5,6,}, Jordi Comelles^{4,5}, Elena Martínez^{4,5}, Josep Samitier^{3,4,5}, M.-Pilar Marco^{1,5}*

¹ Applied Molecular Receptors Group (AMRg) and ² Nucleic Acids Chemistry Group. Chemical and Biomolecular Nanotechnology Department. IQAC-CSIC.

Jordi Girona, 18-26, 08034-Barcelona, Spain

³ Nanobioengineering Group, Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC),

Baldiri Reixac, 10-12, 08028 Barcelona, Spain

⁴ Department of Electronics, University of Barcelona,

Martí i Franquès, 1, 08028 Barcelona, Spain

⁵ CIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN)

⁶ Institute for Research in Biomedicine, Baldiri Reixac 19, E-08028 Barcelona

SUPPORTING INFORMATION:

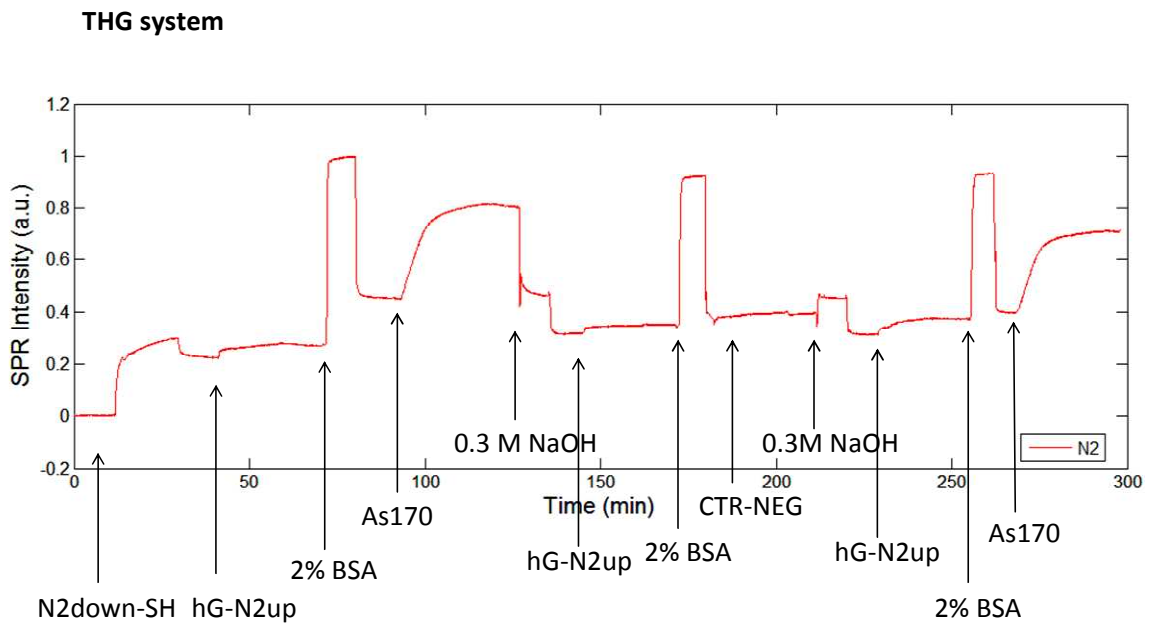
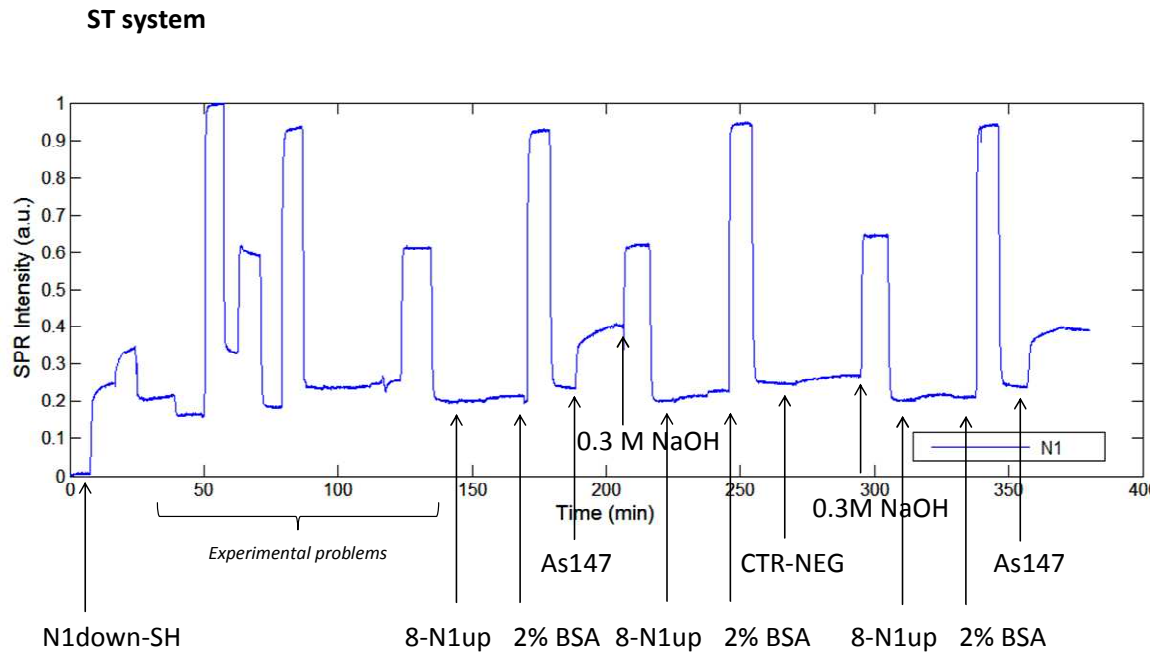
Pages 2-3. Figure S1. Examples of complete SPR sensograms obtained for each system, stanozolol (ST, 8), tetrahydrogestrinone (THG, hG) and boldenone (B, 13)

Pages 3-5: Figure S2. HPLC analysis and mass spectra of oligonucleotide conjugate 13-N_{3up}

Page 6: Melting temperatures of duplexes carrying steroids.

Page 7: Analysis of the recognition of the conjugates with specific antisera

Figure S1. Examples of complete SPR sensograms obtained for each system, stanozolol (ST, 8), tetrahydrogestrinone (THG, hG) and boldenone (B, 13).



B system

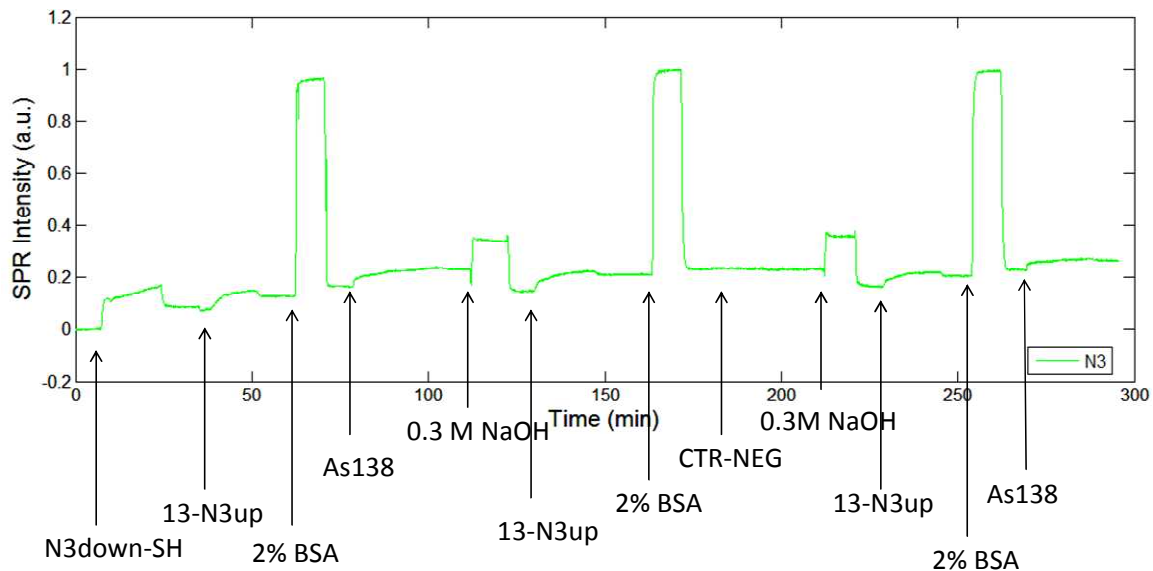
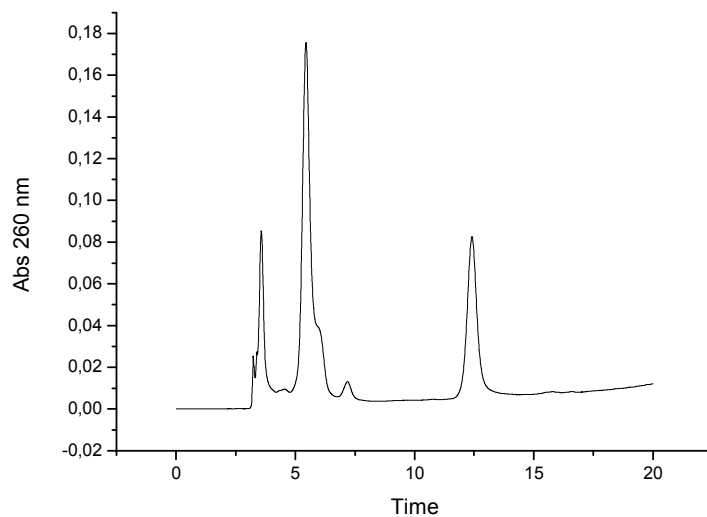
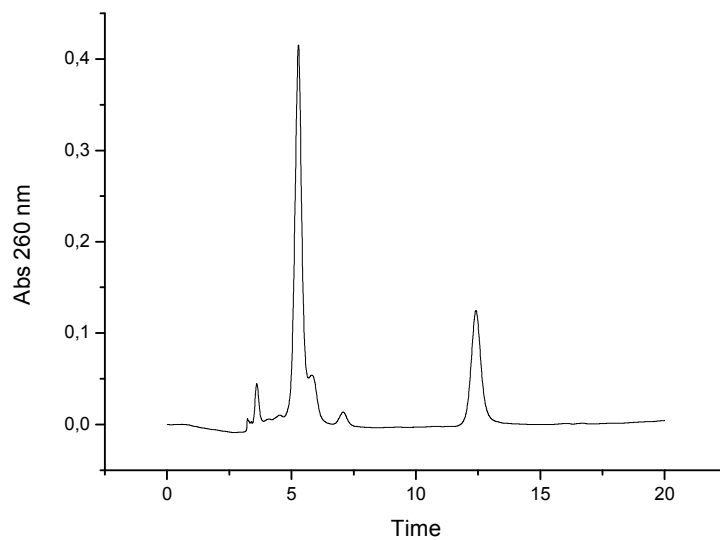


Figure S2. HPLC analysis of oligonucleotide conjugate 13- N_3up .

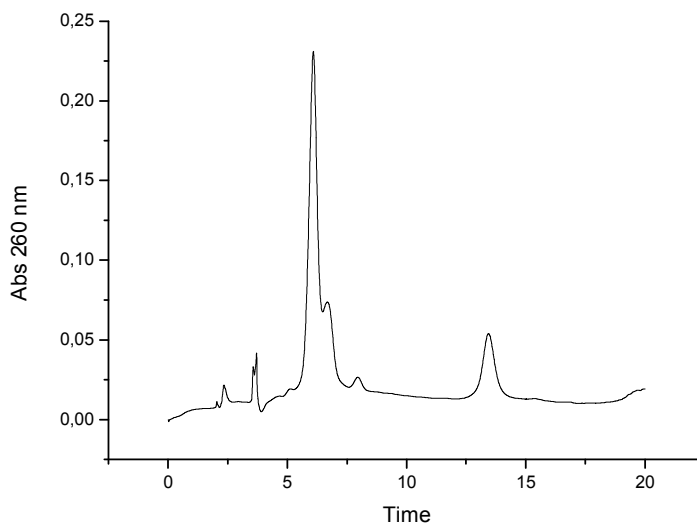
A) Reaction mixture resulting from the reaction of NH_2-N_3up and 10 eq of the active ester of 13 in Tris buffer after overnight treatment at room temperature. The peak at retention time 5-6 min corresponds to unreacted NH_2-N_3up . The peak at retention time 12-14 min corresponds to the expected conjugate 13- N_3up .



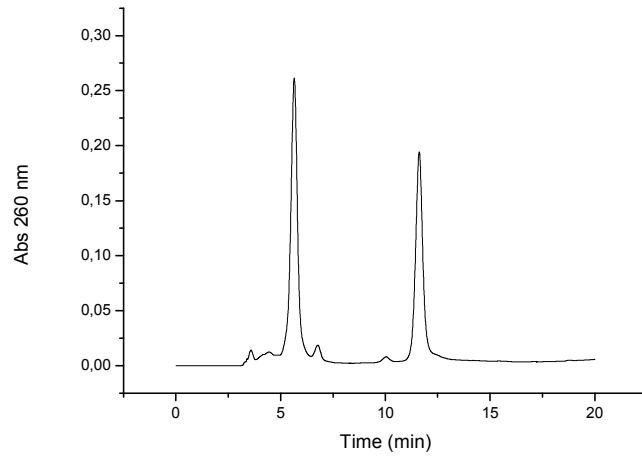
B) Reaction mixture resulting from the reaction of $\text{NH}_2\text{-N}_3\text{up}$ and 10 eq of the active ester of 13 in borate buffer after overnight treatment at room temperature.



C) Reaction mixture resulting from the reaction of $\text{NH}_2\text{-N}_3\text{up}$ and 10 eq of the active ester of 13 in carbonate buffer after overnight treatment at room temperature.



D) Reaction mixture resulting from the reaction of $\text{NH}_2\text{-N}_3\text{up}$ and 30 eq of the active ester of 13 in borate buffer after overnight treatment at room temperature.



E) Electrospray deconvoluted mass spectra of oligonucleotide conjugate 13- N_3up .

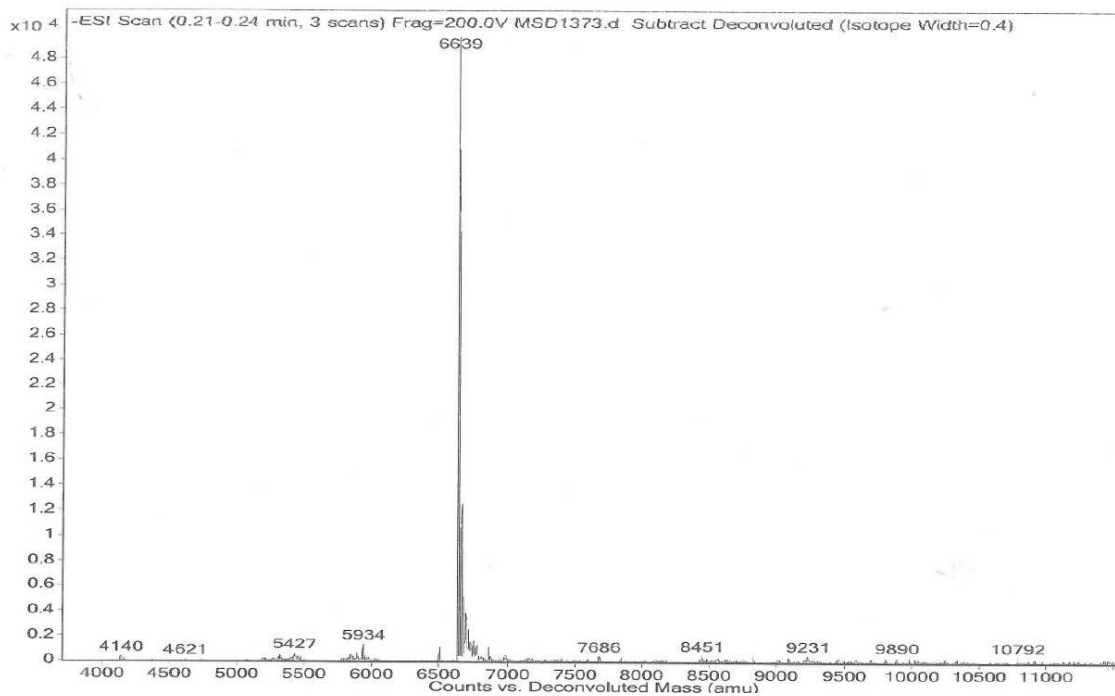


Table S1. Melting temperatures of duplexes carrying steroids.

DUPLEX	T _m (°C)	ΔT _m (°C)
<i>N₁down / N₁up</i>	68.3	--
<i>N₁down / 8-N₁up</i>	67.0	-1.3
<i>N₂down / N₂up</i>	65.6	--
<i>N₂down / hG-N₂up</i>	65.8	+0.2
<i>N₃down / N₃up</i>	64.5	--
<i>N₃down / 13-N₃up</i>	65.6	+1.1

Conditions: 50 mM NaCl, 0.1 M phosphate buffer pH 7.0. ΔT_m is the difference between the melting temperatures of modified duplex minus the melting temperatures of the corresponding unmodified duplex

Denaturation studies. Oligonucleotide duplexes (Table S1) were dissolved in 0.1 M sodium phosphate buffer, 50 mM NaCl (pH=7.0). The samples were heated at 90 °C for 5 min, allowed to cool slowly to room temperature to induce annealing and then kept overnight in a refrigerator (4 °C). The melting curves were recorded by heating the samples with a temperature controller from 10 to 80 °C at a constant rate of 1 °C/min when monitoring the absorbance at 260 nm. The absorption spectra and melting experiments (absorbance vs. temperature) were recorded in 1 cm path-length cells. Melting curves were performed at 3-4 μM duplex concentration. The T_m values were calculated with the *Meltwin 3.2* software.

Table S2. Analytical parameters for the detection of ST, THG and B in ELISA¹, FLISA and microarray² format.

	ST			THG			B		
	ELISA	FLISA	Microarray	ELISA	FLISA	Microarray	ELISA	FLISA	Microarray
IC₅₀ /mg·L⁻¹	0.16	0.46	1.72	0.14	0.46	1.14	5.90	2.77	7.37
LOD /mg·L⁻¹	0.02	0.05	0.32	0.04	0.08	0.14	0.23	0.14	0.48
Slope	-1.07	-1.19	-1.35	-0.96	-1.41	-1.28	-0.80	-0.90	-0.77
Max_{signal}	1.04 ^a	1436 ^b	9292 ^b	0.88 ^a	1191 ^b	9160 ^b	1.45 ^a	1021 ^b	5446 ^b
Min_{signal}	0.02 ^a	-15 ^b	926 ^b	0.03 ^a	8 ^b	1123 ^b	0.01 ^a	29 ^b	261 ^b

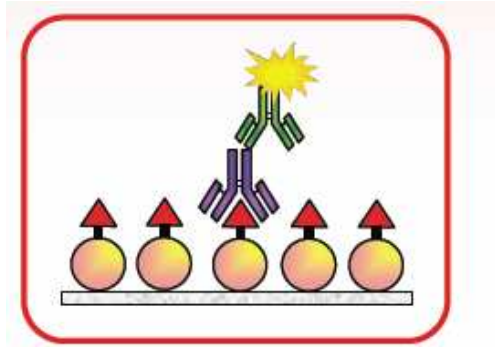
^a, absorbance units

^b, relative fluorescences units

(1) Tort, N.; Salvador, J. P.; Marco, M. P. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2012**, 403, 1361.

(2) Tort, N.; Salvador, J.-P.; Eritja, R.; Poch, M.; Martínez, E.; Samitier, J.; Marco, M.-P. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2009**, 28, 718.

Fluorescence linked immunosorbent assay (FLISA) for AAS.



Experimental part. The concentrations of all of the immunoreagents are summarized in Table S3. Microtiter plates were coated with the hapteneized protein conjugate (AT) at the appropriate concentration in coating buffer (100 μ L/well) overnight at 4 °C. The following day, the plates were washed four times with PBST. The different standard solutions or samples were diluted in PBST and added to the microtiter plates (50 μ L/well), followed by the corresponding solution of the antiserum in PBST (50 μ L/well), and incubated for 30 min at RT. The plates were washed again as before, and a solution of anti-IgG-FITC (20 μ g/mL in PBST) was added (100 μ L/well) and incubated for 30 min more at RT. After a new washing step, a solution of 30% of glicerine in carbonate buffer was added (100 μ L/well) and incubated 5 min at room temperature. The microplate were washed again and the fluorescence were read at 494 nm of excitation and 529 nm of emission. The standard curves were fitted to a four-parameter equation according to the following formula: $Y = \frac{A - B}{1 + (x/C)^D} + B$, where A is the maximal fluorescence signal, B is the minimum fluorescence signal, C is the concentration that yields an absorbance that is 50 % of the maximum fluorescence signal (i.e., it is the IC₅₀), and D is the slope at the inflection point of the sigmoid curve. The limit of detection (LOD) is defined as the concentration that produces 90 % of the maximum fluorescence signal (IC₉₀).

Table S3: Immunoreagents concentration for FLISA.

AT/As	[AT]^a	[As]	[AntilgG-FITC]
8-BSA/As147	0.15625	1/6400	
13-BSA/As138	0.15625	1/16000	20 ^a
hG-BSA/As170	0.3125	1/2000	

a) Concentration in $\mu\text{g/mL}$.

4.3 Resum de les aportacions principals del capítol

- S'han preparat bioconjugats Ac-fluoresceïna dels quatre anticossos específics (Ac147, Ac170, Ac138 i Ac143) per a la detecció de 4 hormones anabolitzants diferents (estanozolol, tetrahydrogestrinona, boldenona i metilboldenona, respectivament), a través de la unió de l'isotiocianat de fluoresceïna als grups amino de les lisines presents en els anticossos, prèviament purificats. Els bioconjugats han demostrat mantindre la seva biofuncionalitat, tot i que en alguns casos l'avidesa envers l'analít s'ha vist lleugerament afectada, tal i com s'ha posat de manifest al desenvolupar els corresponents FLISAs directes. La relació molar fluoròfor/proteïna (F/P) ha estat d'entre 5-6 seguint el protocol de conjugació presentat en aquesta tesi, essent molt semblant al valor 3-5 del bioconjugat anti-IgG-FITC comercial.
- S'han desenvolupat immunoassaigs fluorescents tipus FLISA, en primer lloc amb detecció indirecta, fent ús d'un anticòs secundari marcat amb fluoresceïna (anti-IgG-FITC), i seguidament amb detecció directa, fent ús dels conjugats Ac-FITC preparats durant el transcurs d'aquesta tesi. Com s'ha pogut observar, la detectabilitat obtinguda amb els FLISAs indirectes és molt similar a l'obtinguda amb els respectius ELISAs individuals, però aquesta es veu empitjorada en els FLISAs directes. Segurament aquest empitjorament es deu al fet d'haver hagut d'utilitzar concentracions molt més elevades dels conjugats Ac-FITC, o bé a la possible modificació de les zones de reconeixement de l'anticòs amb alguna molècula de fluoròfor. Per altra banda, la pendent obtinguda en els assaigs fluorescents, és a dir la sensibilitat, sempre ha estat superior a la dels respectius ELISAs.
- S'han preparat tres conjugats haptè-oligonucleòtid emprant dues metodologies, la síntesi en fase sòlida i la síntesi convencional en solució. Els resultats obtinguts, en termes de rendiment, han estat millors en la síntesi en fase sòlida. Aquesta millora en els resultats l'atribuïm al fet que la conjugació en fase sòlida té lloc en dissolvent orgànic 100%, condició en la que els haptens esteroidals al tractar-se de compostos hidrofòbics són més solubles.
- L'avaluació de la biofuncionalitat d'aquests bioconjugats s'ha realitzat en un sensor SPR *imaging*. Per una banda, s'ha demostrat la capacitat de cada un dels conjugats haptè-oligonucleòtid, per separat, d'hibridar-se amb les seves cadenes complementàries prèviament immobilitzades en el chip de SPR. I a continuació, s'ha demostrat que els antisèrums específics per a cada un dels diferents haptens eren capaços de detectar el conjugat haptè-oligonucleòtid respectiu. Per altra banda, també s'ha demostrat que les superfícies biofuncionalitzades mitjançant aquesta estratègia poden ser regenerades i tornar a ser utilitzades en subseqüents cicles de mesura. En aquest treball, la hibridació en una

segona o tercera etapa s'ha fet sempre amb la mateixa sonda haptè-oligonucleòtid, però la mateixa plataforma podria ser emprada mitjançant la hibridació d'altres sondes per a la detecció d'altres compostos.

- S'ha demostrat el potencial ús d'aquests bioconjugats pel desenvolupament d'immunosensors SPR multiplexats per a la detecció de substàncies de baix pes molecular. La immobilització simultània dels diferents haptens ha estat possible mitjançant un simple pas d'hibridació amb les cadenes d'oligonucleòtids complementàries prèviament immobilitzades (estratègia DDI), a través del qual els haptens queden perfectament ordenats i exposats en la superfície sensora sobre zones predefinides.
- Els resultats demostren que l'estratègia de fer servir bioconjugats haptè-oligonucleòtid, enlloc de conjugats oligonucleòtid-proteïna haptentitzada, ha permès obtenir superfícies biofuncionals reproduïbles i estables. Per altra banda, la unió dels anticossos a aquestes superfícies, on només hi ha immobilitzades cadenes d'oligonucleòtids i haptens, provoca grans canvis en l'índex de refracció de la solució pròxima a la interfase, ja que els anticossos es troben més pròxims a la superfície del transductor SPR. Malgrat que l'aproximació d'immobilitzar haptens per a la detecció immunoquímica de substàncies de baix pes molecular mitjançant la hibridació de cadenes complementàries va ser descrita l'any 1999 per Frank Bier⁹⁵, concretament per haptens de l'àcid 2,4-diclorofenoxiacetic i de l'atrazina, aquesta és la primera vegada que s'ha aplicat per a la detecció simultània de tres haptens i en un sensor SPR *imaging*. La combinació de l'ús d'aquesta estratègia amb aquest tipus de sensors òptics, podria en un futur, permetre la detecció de milers de compostos diferents simultàniament, en el cas de tenir prèviament preparats els respectius conjugats haptè-oligonucleòtid.

Així doncs, amb el coneixement desenvolupat fins aquest moment, i de cara a la utilització d'aquest bioreactius per a la obtenció de la plataforma universal que es descriurà en el següent capítol, podem assegurar que: a) les sondes haptè-oligonucleòtid sintetitzades permeten immobilitzar de forma simultània i selectiva els haptens per la detecció de ST, B i THG en zones pre-definides d'una superfície, a on prèviament es troben immobilitzades les corresponents cadenes complementàries. Tot i que serà en el següent capítol, a on addicionalment es demostrarà la possibilitat d'utilitzar aquest *microarray* d'haptens per a la determinació i quantificació d'AAS; i, b) en el cas que la detecció i quantificació es vulgui assolir mitjançant l'ús d'immunoreactius marcats amb compostos fluorescents, la opció de realitzar una detecció indirecta amb una anti-IgG marcada seria més adient que la de marcar els anticossos específics, ja que permet assolir una millor detectabilitat i a més permet un estalvi pel que fa a la quantitat d'immunoreactius emprada.

5. DESENVOLUPAMENT D'UN MICROARRAY D'HAPTENS

5.1 Precedents i objectius del capítol

Amb les sondes haptè-oligonucleòtid preparades i caracteritzades, tant químicament com biofuncionalment, i amb els anticossos marcats amb fluoròfors avaluats, es va poder abordar un dels objectius claus d'aquesta tesi, que era demostrar la possibilitat d'utilitzar l'estratègia DDI per desenvolupar sistemes multiplexats i caracteritzar les seves propietats analítiques. En el capítol anterior, l'estratègia DDI només s'havia emprat en un sensor *SPR* per demostrar la biofuncionalitat dels conjugats haptè-oligonucleòtid sintetitzats així com per demostrar la capacitat de regeneració que ofereix aquest mètode d'immobilització, però no per a la detecció de les hormones anabolitzants. Així doncs, en aquest capítol es descriu el desenvolupament d'una plataforma multianalit universal amb detecció fluorescent per a la detecció d'AAS.

L'estratègia emprada ha consistit en fer ús de les reaccions d'hibridació, altament específiques, de cadenes d'oligonucleòtids complementàries. Així doncs, els haptens (M1, M2, M3) enllaçats a diferents cadenes d'oligonucleòtids (A'-M1, B'-M2, C'-M3), s'han immobilitzat a través de la hibridació amb les cadenes complementàries (A, B, C) que restaven immobilitzades en la plataforma de detecció de forma espaiada i ordenada (Figura 5.1). Posteriorment, la mesura s'ha realitzat en condicions competitives en format indirecte, i els anticossos específics units als respectius haptens, han estat detectats fent ús d'un anticòs secundari de tipus anti-IgG lligat a rodamina. S'escollí una detecció indirecta amb rodamina, en lloc de fer servir els anticossos primaris marcats amb fluoresceïna, perquè no es disposava del làser en el escàner per detectar la fluoresceïna, però també per obtenir millors límits de detecció al amplificar el senyal amb un

anticòs secundari, permetent diluir més els immunoreactius emprats, com ja s'ha demostrat anteriorment (vegeu apartat 4.2.1.2).

Per assolir l'objectiu marcat, s'han abordat els següents objectius específics:

- a) Posta a punt tota la metodologia necessària per a la preparació de *microarrays* d'ADN,
- b) Confirmar la viabilitat de l'estratègia d'immobilitzar haptens sobre superfícies sòlides a través de la hibridació de cadenes d'oligonucleòtids complementàries, ara fent servir una superfície de vidre, i
- c) Establir una metodologia analítica per la multidetecció i quantificació d'hormones anabolitzants partint d'un *microarray* d'ADN, com a plataforma universal, amb detecció immunoquímica de tipus fluorescent.

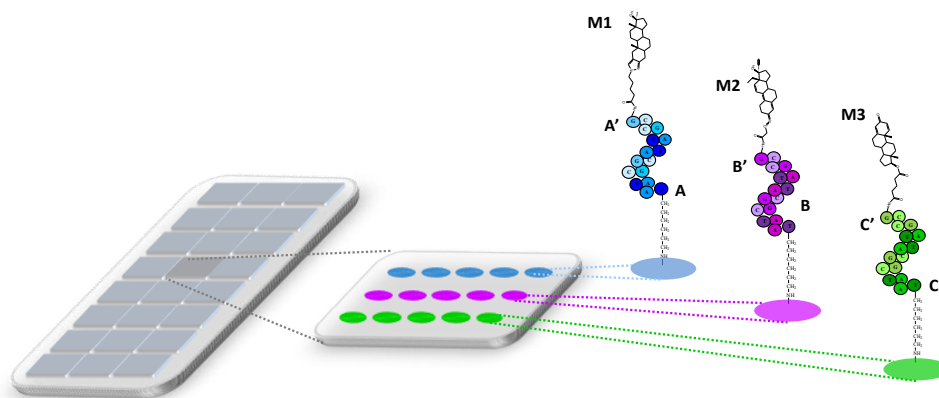


Figura 5.1: Esquema representatiu de la plataforma de multidetecció.

5.1.1 Mètodes de preparació de microarrays d'ADN

Existeixen una gran varietat d'estratègies per tal de dipositar cadenes d'oligonucleòtids sobre superfícies sòlides, però les més emprades tant per cases comercials com per laboratoris d'investigació són les que es mostren a continuació.

5.1.1.1 Síntesi en la superfície

Mitjançant aquesta tècnica els *microarrays* d'oligonucleòtids es generen *in situ* sobre la superfície desitjada. L'empresa Affimetrix utilitza aquest mètode que consisteix en irradiar amb llum UV diferents zones de la superfície, prèviament derivatitzades amb grups protectors fotosensibles, mitjançant el moviment d'unes màscares preparades mitjançant tècniques fotolitogràfiques. Després d'eliminar el grups protectors fotolàbils els nucleòsids reaccionen eficientment a través del seu extrem 3' en la superfície. Per fer possible la síntesi d'oligòmers, l'extrem 5' de cada base afegida s'ha de protegir amb un altre grup protector fotosensible. La desprotecció i unió de

nucleòsids es repeteix fins que s'obté una matriu amb les seqüències d'oligonucleòtids desitjades. D'igual forma, la casa comercial NimbleGen, sintetitza microarrays d'oligonucleòtids utilitzant un sistema basat en l'ús de miralls per tal de dirigir la llum UV, sense la necessitat de mascarees fotolitogràfiques.

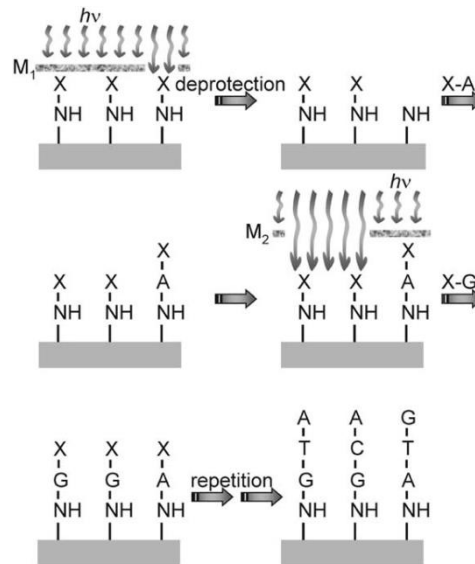


Figura 5.2: Mètode fotolitogràfic per preparar un microarray d'ADN fent la síntesi de les cadenes d'oligonucleòtids directament sobre la superfície¹⁹⁵.

5.1.1.2 Deposició de cadenes d'oligonucleòtids modificades

Aquest mètode consisteix en dipositar petites quantitats de les cadenes d'oligonucleòtids desitjades, prèviament sintetitzades i derivatitzades, amb l'ajut d'un dispensador de nanogotes (spotter) sobre la superfície sòlida d'interès activada. Un dels avantatges que representa aquest mètode respecte la síntesi *on site*, és que es pot purificar la mostra que es pretén dipositar prèviament; a part de que en la síntesi *on site*, la longitud de la cadena que es pot sintetitzar depèn de l'eficiència de cada etapa d'unió dels diferents nucleòsids. La gran disponibilitat d'oligonucleòtids comercials modificats amb diferents grups funcionals, així com, la simplicitat en el procediment i l'equipament involucrat fa que aquesta metodologia sigui més accessible¹⁹⁶.

Hi ha dos tipus de tècniques que s'utilitzen per dipositar les cadenes d'oligonucleòtids: impressió per contacte (*contact printing*) o impressió sense contacte (*non-contact printing*); els aparells que dispensen la solució per contacte, es basen en introduir capil·lars o agulles en la solució d'interès i dispensar una certa quantitat de solució (50 pL–100 nL) al contactar la punta amb la superfície sòlida, donant lloc a *spots* de 100–300 μm , mentre que els altres aparells, que es basen en la tecnologia *ink-jet*, dispensen gotes de menys de 1 nL però sense arribar a tocar la superfície, evitant així possibles problemes de contaminacions creuades; aquests últims, solen donar lloc a *spots* de menys de 100 μm ¹⁹⁵.

5.1.1.3 Captura en funció del comportament electrònic

Aquesta tecnologia, desenvolupada per Nanogen, es basa en dirigir les cadenes d'oligonucleòtids en funció del camp elèctric que s'aplica a diferents elèctrodes de treball que es troben distribuïts en un *array*. Com que els oligonucleòtids estan carregats negativament, l'aplicació d'un potencial positiu en determinades zones de l'*array* afavoreix la seva migració i acumulació en dites zones. Nanogen utilitza elèctrodes d'or tapissats amb estreptavidina per unir cadenes d'oligonucleòtids biotinitades després de l'acumulació electrònica. Un cop immobilitzades l'elevada afinitat de la unió biotina-estreptavidina fa que aquesta unió sigui pràcticament irreversible^{195, 197}.

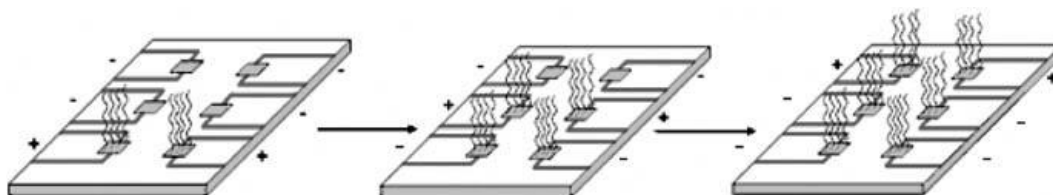


Figura 5.3: Esquema on es mostra l'acumulació de cadenes d'oligonucleòtids, carregades negativament, sobre elèctrodes de treball als quals s'ha aplicat un potencial positiu¹⁹⁶.

5.1.2 Mètodes d'immobilització d'oligonucleòtids sobre superfícies sòlides

Les superfícies de vidre són les més emprades per al desenvolupament de *microarrays* d'ADN degut a la seva elevada resistència química i física. Químicament, el vidre és inert, és capaç de suportar elevades temperatures i no canvia les seves propietats al entrar en contacte amb l'aigua. Físicament, té una baixa fluorescència intrínseca i una elevada transmissió. Però a més a més, és fàcil d'aconseguir, la superfície sol ser força llisa amb poques rugositats, és rígid, transparent i no és porós, permetent així tenir una cinètica en la reacció d'hibridació més favorable. Tot i així, també s'utilitzen superfícies de silicona, polimèriques (polímers com el poli-(dimetilsiloxà) (PDMS), el poli-(metil-metacrilat) (PMMA) o el poli-carbonat (PC) immobilitzats sobre superfícies de vidre), superfícies d'or, *etc.*¹⁹⁸. Com més hidrofòbica és la superfície, més petita és la mida dels *spots* formats ja que la mostra dispensada sol ser hidrofílica.

Per tal d'obtenir un microarray d'ADN, en primer lloc, és necessari derivatitzar el material de suport escollit, en aquest cas el vidre, introduint grups funcionals sobre la superfície. Existeix una gran varietat d'agents silanitzants que per un costat queden units de forma covalent al vidre i per l'altra aporten grups funcionals susceptibles a units a altres molècules (vegeu alguns exemples en la Figura 5.4).

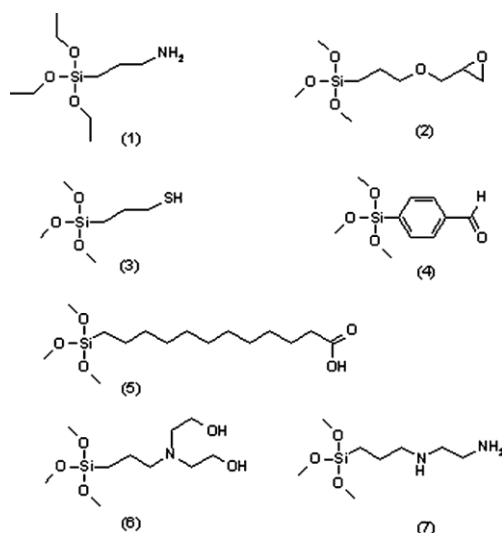


Figura 5.4: Alguns dels silans més emprats per a la modificació de superfícies de vidre: (1) 3-aminopropiltriètoxissilà, (2) glicidopropiltrimetoxissilà, (3) 3-mercaptopropil-trietoxissilà, (4) 4-trimetoxissilil-benzaldehid, (5) trietoxissilà undecanoic àcid, (6) bis (hidroxietil) aminopropiltriètoxissilà, (7) 3-(2-aminoetilamino) propiltrimetoxissilà¹⁹⁶.

5.1.2.1 Unió per adsorció

L'adsorció és el mètode d'immobilització més simple ja que no requereix de cap modificació de les cadenes d'oligonucleòtids. Aquesta immobilització es basa en interaccions electrostàtiques que tenen lloc entre grups carregats negativament presents en les cadenes d'oligonucleòtids i càrregues positives introduïdes en la superfície.

Les superfícies de vidre funcionalitzades amb aminosilans o poli-L-lisina són les més emprades per a l'adsorció d'ADN, ja que aporten càrregues positives a la superfície que faciliten la interacció electrostàtica amb les càrregues negatives de l'enllaç fosfodièster de la cadena d'ADN¹⁹⁹⁻²⁰⁰. Les superfícies funcionalitzades amb poli-L-lisina, generalment d'elevat pes molecular (150-300 KDa), donen lloc a superfícies funcionalitzades amb una estructura tridimensional, fet que augmenta la quantitat d'ADN que s'immobilitza en la superfície en comparació amb les derivatitzades amb aminosilans, que donen lloc a estructures bidimensionals. Però, contràriament als enllaços covalents que formen els aminosilans amb els silanols del vidre, la poli-L-lisina s'uneix a la superfície per interaccions electrostàtiques, podent arribar a mostrar una estabilitat reduïda en condicions d'elevada força iònica⁷⁹.

5.1.2.2 Unió per afinitat

La interacció avidina-biotina és una de les unions més fortes de tipus no covalent que existeixen, amb una constant de dissociació de $K_D \approx 10^{-15}$ mol/L. L'avidina és una glicoproteïna tetramèrica que està formada per 4 polipèptids units per carbohidrats mitjançant enllaços glicosídics. Les quatre subunitats de la proteïna són idèntiques i cada una d'elles pot unir-se a una molècula de biotina. Tant l'estreptavidina, extreta de *Streptomyces avidinii*, com l'artificial neutravidina, no contenen enllaços glicosídics, però són també proteïnes tetramèriques i actuen igual que l'avidina¹⁹⁶.

L'adsorció d'avidina/estreptavidina/neutravidina sobre superfícies sòlides es basa en la formació de ponts d'hidrogen, interaccions electrostàtiques, enllaços de Van der Waals e interaccions hidrofòbiques. Així doncs, cadenes d'ADN biotinitilades poden ser dispensades sobre una superfície modificada i mitjançant un assaig d'afinitat unir-se al suport sòlid. Aquest mètode és força popular ja que una mateixa superfície pot ser emprada per a qualsevol set de cadenes d'ADN biotinitilades²⁰¹⁻²⁰². Tot i així, es tracta d'un mètode costós ja que es requereix d'elevades quantitats d'avidina per recobrir tota la superfície, i a més l'avidina és susceptible a ser desorbida en presència de solucions àcides i bàsiques d'elevada força iònica però també a elevades temperatures. L'estreptavidina amb un punt isoelectric (pI) de 5 és més usada que l'avidina, que té un pI de 10.5, per tal d'evitar interaccions inespecífiques amb altres proteïnes¹⁹⁷.

5.1.2.3 Unió per enllaç covalent

Un enllaç covalent és aquell que es forma quan un parell d'àtoms comparteixen com a mínim un parell d'electrons. L'energia de dissociació d'un enllaç covalent sol ser de 100 kcal/mol, essent l'enllaç més fort que existeix en bioquímica. Les modificacions més comuns i els mètodes d'unió d'oligonucleòtids sobre superfícies sòlides, mitjançant enllaços covalents, més emprats es troben recollits en la Figura 5.5. Les modificacions químiques de les superfícies són necessàries per tal de generar grups funcionals i poder realitzar la unió covalent posteriorment.

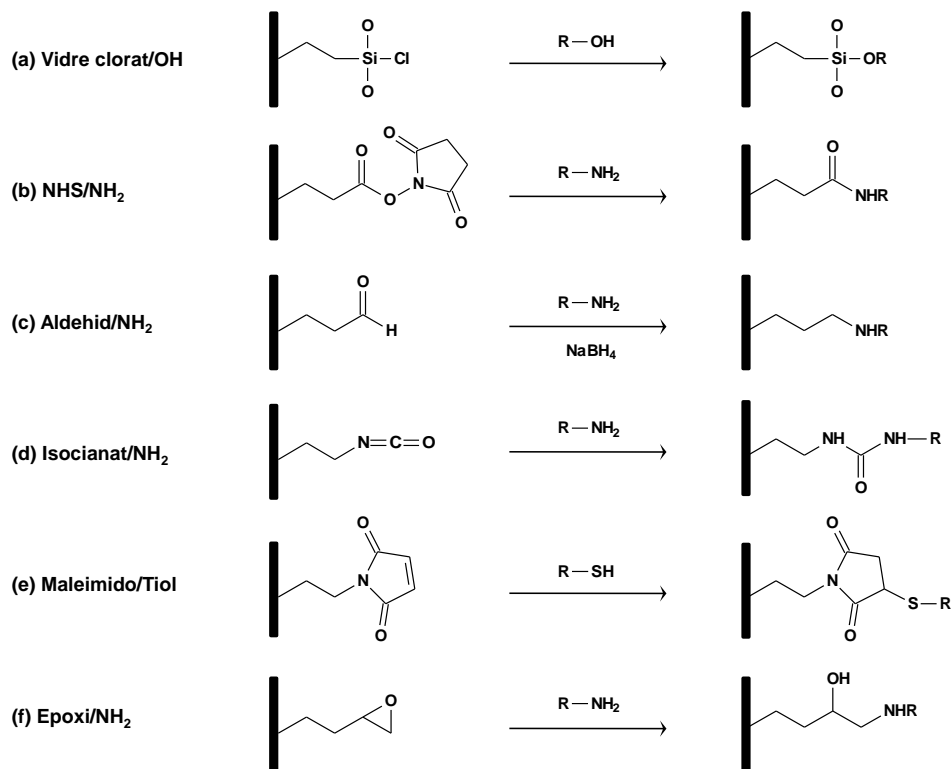


Figura 5.5: Principals químiques emprades per a la immobilització covalent de cadenes d'oligonucleòtids (R) sobre suports sòlids²⁰³.

El grup amino ha estat usat àmpliament per unir oligonucleòtids sobre superfícies de vidre a través de la reacció amb àcids carboxílics, aldehids, epòxids o a altres amines amb l'ajut de reactius homobifuncionals, com el 1,4-fenildiisotocianat. També oligonucleòtids fosforilats o carboxilats, prèviament activats, s'han unit sobre superfícies de vidre derivatitzades amb grups amino (vegeu Figura 5.6). Els oligonucleòtids derivatitzats amb un grup disulfur poden immobilitzar-se directament sobre superfícies de vidre derivatitzades amb mercaptosilans o sobre superfícies derivatitzades amb aminosilans amb l'ajut de reactius heterobifuncionals, com el sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexà-1-carboxilat. Per altra banda, cadenes d'oligonucleòtids tiolades poden immobilitzar-se o sobre superfícies d'or a través de la interacció SH/Au.

Una altra opció és la creació de dendrímers o estructures dendrítiques en la superfície, augmentant així el nombre de grups funcionals disponibles i per consegüent augmentant la densitat de cadenes d'oligonucleòtids finalment unides²⁰⁴. I finalment, també s'ha emprat la química *click*, fonamentalment la basada en la reacció de cicloadició 1,3-dipolar entre azides i acetilens per formar triazoles. Aquesta química s'ha emprat per exemple, per la immobilització d'àcids peptidonucleics (*peptide nucleic acid*, PNA) derivatitzats amb azidocoumarina sobre superfícies de vidre derivatitzades amb fenil acetilè, comprovant directament per fluorescència l'eficiència de la immobilització, al formar-se el derivat fluorescent triazolilcoumarin²⁰⁵.

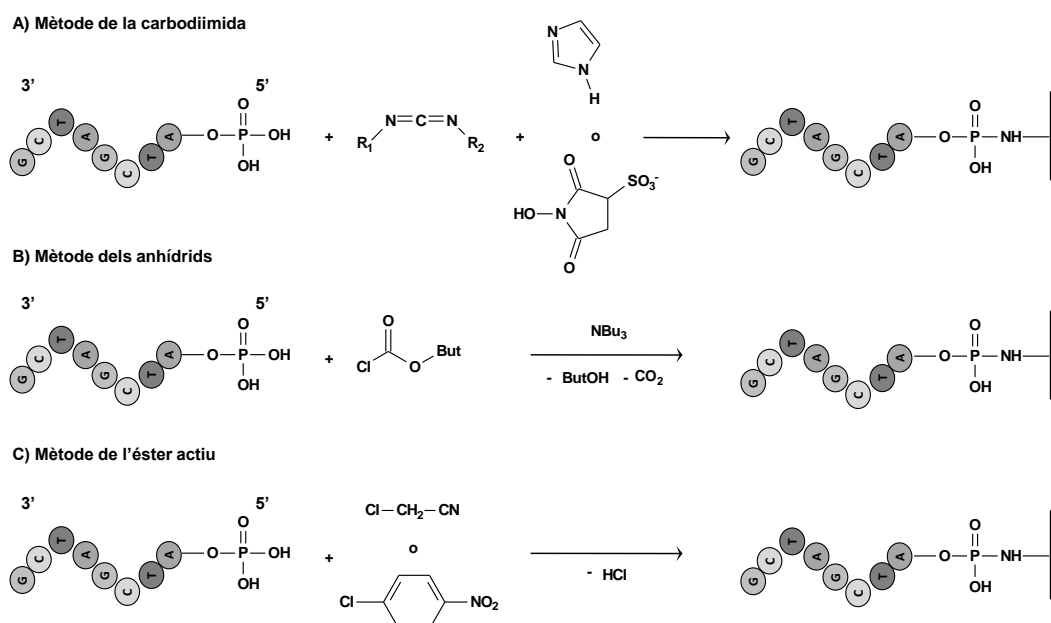


Figura 5.6: Mètodes d'activació de cadenes d'oligonucleòtids fosforilades i la seva unió covalent sobre superfícies sòlides funcionalitzades amb grups amino¹⁹⁶.

5.2 Resultats i Discussió

Pel desenvolupament de la plataforma es va decidir des del principi que el suport sòlid seria de vidre pel gran nombre d'avantatges que proporciona l'ús d'aquest material, com són l'elevada

resistència química i física, però també per la poca fluorescència intrínseca que presenta, tenint en compte que finalment la detecció seria fluorescent.

5.2.1 Resultats preliminars

En primer lloc calia escollir la química que s'utilitzaria per unir les cadenes d'oligonucleòtids sobre la superfície de vidre. Inicialment, es varen avaluar dos tipus d'unions diferents:

- a) mitjançant la unió covalent emprant cadenes d'oligonucleòtids funcionalitzades amb grups amino a l'extrem 5', al interaccionar amb els grups epòxids prèviament introduïts sobre la superfície del vidre al derivatitzar-lo amb 3-glicidoxipropiltrimetoxisilà (GPTS), o
- b) mitjançant la unió per adsorció de les cadenes d'oligonucleòtids sobre superfícies de vidre recobertes amb poli-L-lisina, mitjançant interaccions electrostàtiques.

En el primer cas, després d'un procés de rentat i d'activació de la superfície del vidre per generar grups hidroxil, les superfícies es van tractar amb una solució de 3-glicidoxipropiltrimetoxisilà (GPTS) en etanol. Pel que fa a les superfícies de poli-L-lisina, aquestes foren d'origen comercial. A continuació, en ambdós casos, es dipositaren els oligonucleòtids acabats amb un grup amino en l'extrem 5', tot i que aquesta funcionalitat química no era necessària en el cas de la unió per adsorció. L'addició dels oligonucleòtids es va realitzar mitjançant l'ús d'un aparell capaç de dispensar nanogotes (*spotter*) formant zones micromètriques actives (*spots*). Seguidament, les superfícies tractades amb GPTS es van tractar amb una solució 0.5M d'etanamina per tal de desactivar els grups epòxid que poguessin quedar actius en la superfície, mentre que les superfícies de poli-L-lisina, es van bloquejar amb una solució al 2% (w/v) de BSA.

L'avaluació d'aquestes dues superfícies es va realitzar únicament amb el sistema per a la detecció de ST, per tal d'escollir quin mètode d'immobilització utilitzaríem per a realitzar tot l'estudi. Així doncs, en primer lloc es va dipositar sobre la superfície activada la cadena d'oligonucleòtids inferior (N_{1down}), i després de bloquejar/inactivar la resta de la superfície com s'ha comentat anteriorment, es va afegir la solució del conjugat haptè-oligonucleòtid corresponent ($8-N_{1up}$), per tal que tingués lloc la hibridació entre les cadenes complementàries. Després d'una etapa de rentat, es va afegir l'antisèrum (As147) a diferents dilucions i finalment l'anti-IgG marcada amb l'isocianat de la tetrametilrodamina (TRITC, *tetramethyl rhodamine isothiocyanate*). El fluoròfor, com ja s'ha comentat anteriorment, es va seleccionar en base als requeriments de l'escàner emprat per la lectura dels microarrays, ja que es disposava d'un làser verd (543 nm). Per finalitzar, les superfícies es rentaren amb PBST, fent un últim rentat amb un tampó sense Tween 20, ja que es va comprovar que quan s'utilitzava aquest detergent en l'últim rentat, al assecar la superfície, aquesta no quedava prou neta el que es traduïa en un gran soroll de fons en el senyal fluorescent.

Els resultats obtinguts amb l'escàner de fluorescència (vegeu Figura 5.7), mostraren que les superfícies de poli-L-lisina proporcionaven *spots* amb una millor morfologia, així com amb una millor homogeneïtat del senyal dins dels *spots*. Com es pot veure a la Figura 5.7, en les superfícies de poli-L-lisina, els *spots* sempre tenien una mateixa morfologia, i tot i que en alguns casos i havia variabilitat, aquesta venia donada més pel rentat final que pel tipus d'immobilització. En canvi, en el cas de les imatges obtingudes amb la superfície epoxidada, s'observà una major variabilitat en tota la superfície, arribant en alguns casos a observar gotes mogudes, i per tant, a donar lloc a *spots* més amorfs. Segurament aquest fet era degut a que es tracta de superfícies més hidrofíliques. Per tant, es va decidir continuar amb les superfícies de poli-L-lisina, tot i que es important aclarir que més endavant es va poder comprovar, que controlant la humitat i la temperatura de la cambra on té lloc la dispensació e immobilització de les cadenes es possible obtenir *spots* perfectament homogenis i d'iguals dimensions amb les superfícies epoxidades, tal com es veurà més endavant en el capítol 6.

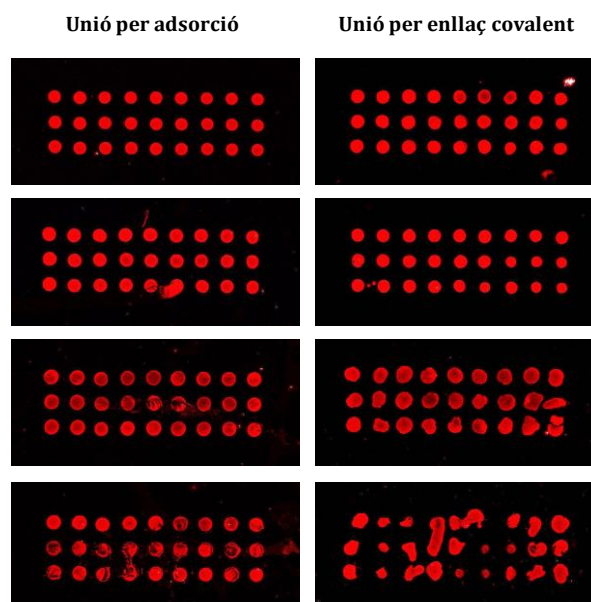


Figura 5.7: Imatges obtingudes amb l'escàner on s'observa els spots que s'obtenen en una superfície de poli-L-lisina comercial (esquerra) i els spots que s'obtenen amb una superfície funcionalitzada amb grups epòxid (dreta).

5.2.2 Detecció individual d'AAS en format *microarray* fluorescent

Seguidament, es va procedir a avaluar el funcionament de cada un dels sistemes per a cada un dels AAS (ST, THG i B) per separat, emprant superfícies derivatitzades amb la cadena d'oligonucleòtids de captura corresponent (N_{1down} (ST), N_{2down} (THG) o N_{3down} (B)) i seguidament afegint el seu respectiu conjugat haptè-oligonucleòtid ($8-N_{1up}$, $hG-N_{2up}$ o $13-N_{3up}$). Finalment, els immunoassaigs fluorescents es dugueren a terme fent servir l'antisèrum específic (As147, As170 o As138) i emprant un anticòs secundari marcat amb rodamina. La Taula 5.1 mostra els tampons utilitzats per preparar el *microarray* d'ADN i posteriorment convertir aquest en un *microarray* d'haptens. Els assaigs es van realitzar fent servir els mateixos tampons que en el cas

dels FLISAs (vegeu capítol 4). La selecció del tampó de dispensació de les cadenes d'oligonucleòtids (o tampó d'immobilització), del tampó d'hibridació i del tampó final de rentat es va fer-se en base a la bibliografia²⁰⁶ i després de moltes proves per tal d'optimitzar i millorar els resultats.

Taula 5.1: Paràmetres importants que s'han tingut en compte a l'hora de desenvolupar el *microarray*.

Mètode d'immobilització	Adsorció
Tampó d'immobilització	150 mM fosfat de sodi ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$) (pH 8.5)/0.01% SDS
Humitat i temperatura	60% d'humitat relativa i 20 °C
Bloqueig/Desactivació	2% (w/v) BSA en tampó fosfat salí (PBS)
Tampó d'hibridació	10 mM TRIS, 1 mM EDTA, 1 M NaCl (pH 7.2)
Rentat final	0.1 x SSC (15 mM NaCl + 1.5 mM citrat de sodi), 0.05% SDS (pH 7.5)

La Figura 5.8, mostra les imatges de l'escàner i les corbes de calibratge obtingudes per a les tres hormones anabolitzants, ST, THG i B, emprant les concentracions d'immunoreactius prèviament escollides mitjançant assajos 2D immunoquímics no competitius. Aquests resultats demostraren tant l'eficàcia de l'estratègia d'immobilització d'haptens a través de la hibridació de cadenes complementàries com el posterior reconeixement d'aquests per part dels antisèrums corresponents.

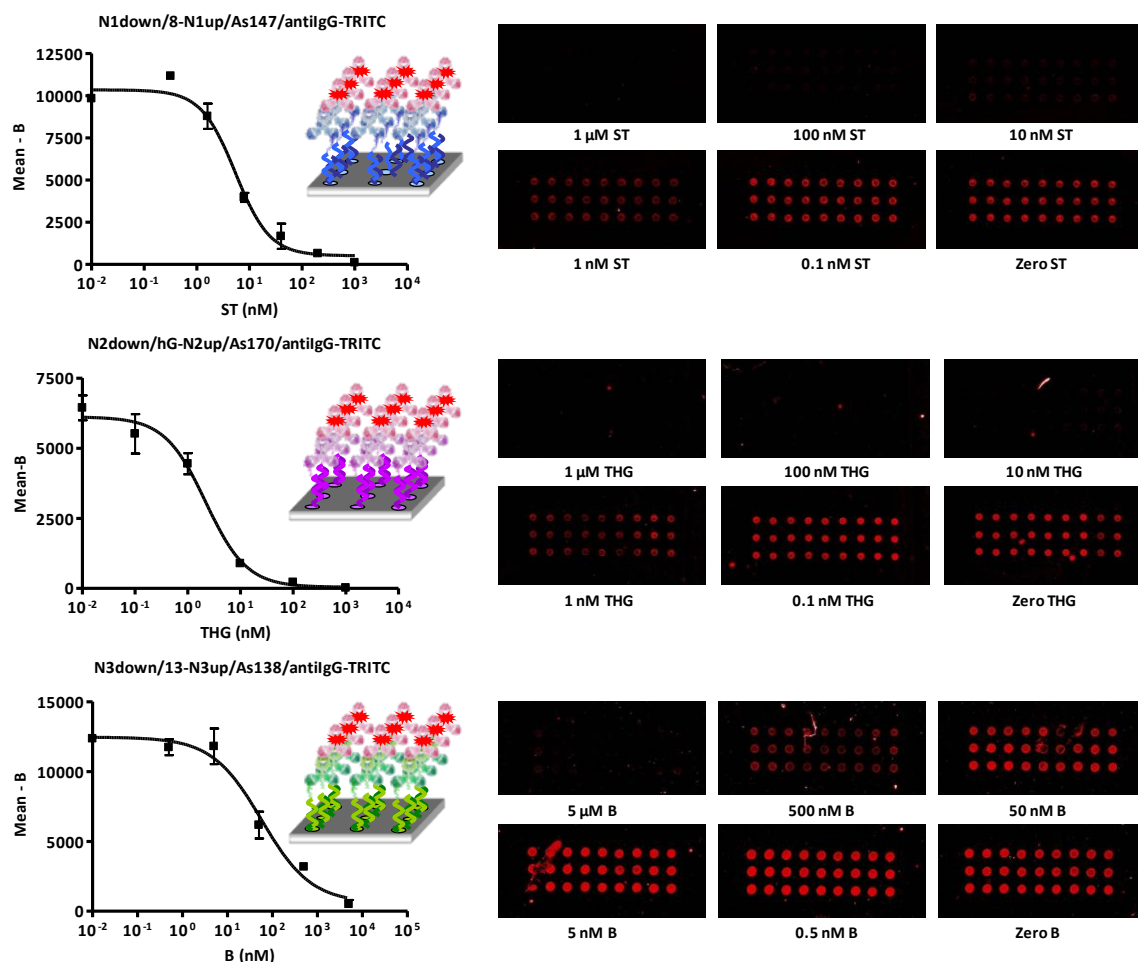


Figura 5.8: Corbes de calibratge per a la detecció de les tres hormones anabolitzants, estanozolol (ST), tetrahydrogestrinona (THG) i boldenona (B), de forma individual, utilitzant el *microarray*. La mida dels *spots* era de 100 micròmetres, aproximadament, en tots els casos.

Els resultats obtinguts mostraren valors de detectabilitat comparables als obtinguts en els ELISAs i els FLISAs respectius, essent els límits de detecció en tots els casos inferiors als MRPLs requerits per tal que la tècnica es consideri vàlida per a l'anàlisi d'aquestes substàncies (vegeu Taula 5.2).

Taula 5.2: Paràmetres que defineixen les corbes de calibratge per a la detecció d'aquests compostos utilitzant el *microarray* desenvolupat en aquesta tesi.

	<i>Estanazolol (ST)</i>	<i>Tetrahydrogestrinona (THG)</i>	<i>Boldenona (B)</i>
RFU max	10350	6118	12465
RFU min	515	42	594
Pendent	-1.32	-1.114	-0.787
IC₅₀ ($\mu\text{g L}^{-1}$)^a	1.66	0.63	16.44
LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)^a	0.13	0.05	1.13
r^2	0.977	0.954	0.957

^aLa IC₅₀ i el LOD són aquella concentració d'analit necessària per inhibir un assaig immunofluorescent competitiu i obtenir el 50 i el 90% de la fluorescència màxima.

5.2.3 Detecció multiplexada d'AAS en format *microarray* fluorescent

Després de veure que l'estratègia funcionava per a cada un dels analits per separat, es va prosseguir amb l'estudi, fent ús dels diferents bioreactius combinats, emprant un còctel de les sondes haptè-oligonucleòtid (H-OLG) i un còctel dels antisèrums (AS_cocktail), per tal d'assolir la detecció multiplexada d'AAS.

En primer lloc, es va demostrar que la hibridació entre les diferents sondes haptè-oligonucleòtid i les cadenes d'oligonucleòtids complementàries era selectiva. Per dur això a terme, es preparà una superfície de vidre amb 24 *microarrays*, cada un d'ells amb 5 x 3 *spots*, en els que s'immobilitzaren els oligonucleòtids inferiors ($N_{1-3down}$), cada un en una fila amb 5 *spots* replicats. Seguidament, s'afegiren les diferents sondes haptè-oligonucleòtid, però cadascuna en un *microarray* diferent (8- N_{1up} , hG- N_{2up} o 13- N_{3up}) i a continuació, un còctel amb els diferents antisèrums específics (As147, As170 i As138) que s'afegí en tots els *microarrays*. Com es pot veure en la Figura 3 de l'article 3, al afegir l'anti-IgG-TRITC, només s'observà senyal fluorescent en aquells *spots* on la cadena d'oligonucleòtids complementària a la corresponent sonda haptè-oligonucleòtid afegida, havia estat immobilitzada prèviament, quedant demostrada l'especificitat de l'etapa d'hibridació. A continuació, es va estudiar l'especificitat en l'etapa de reconeixement de les diferents sondes haptè-oligonucleòtid un cop immobilitzades en la superfície, per part dels corresponents antisèrums. En aquest cas, s'emprà una superfície de vidre amb la mateixa configuració de *microarrays* anteriorment esmentada. En primer lloc, s'afegí en diferents pouets un còctel amb els diferents conjugats H-OLG (cada pouet corresponia a un *microarray* diferent), a continuació, s'afegiren els diferents antisèrums per separat, cada un en un pouet diferent, i finalment s'addicionà l'anti-IgG-TRITC en tots els *microarrays*. Com es pot veure en la Figura 4 de l'article 3, per a cada antisèrum s'observà el màxim senyal fluorescent en aquells *spots* amb el respectiu conjugat haptè-oligonucleòtid immobilitzat, però també s'observà un fenomen de cooperativitat entre els assaigs ST i THG, com ja s'havia observat anteriorment en l'ELISA multianalit. L'As170 (THG) reconeixia el conjugat 8- N_{1up} (ST) i l'As147(ST) reconeixia el conjugat hG- N_{2up} (THG). Aquest fenomen desapareixia al treballar amb el AS_cocktail, segurament degut al fet que la presència de l'anticòs específic prevenia la unió dels altres anticossos.

A continuació, s'emprà el *microarray* d'haptens, obtingut un cop hibridat el còctel H-OLG sobre el *microarray* d'ADN, per a la detecció dels diferents analits, ST, THG i B, emprant el AS_cocktail i fent ús de l'anti-IgG-TRITC per obtenir el senyal fluorescent (vegeu l'esquema de l'assaig en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Així doncs, solucions estàndards a diferents concentracions dels 3 analits foren mesurats emprant el *microarray* i donaren lloc a les corbes de calibratge que es poden veure en la Figura 5.9.

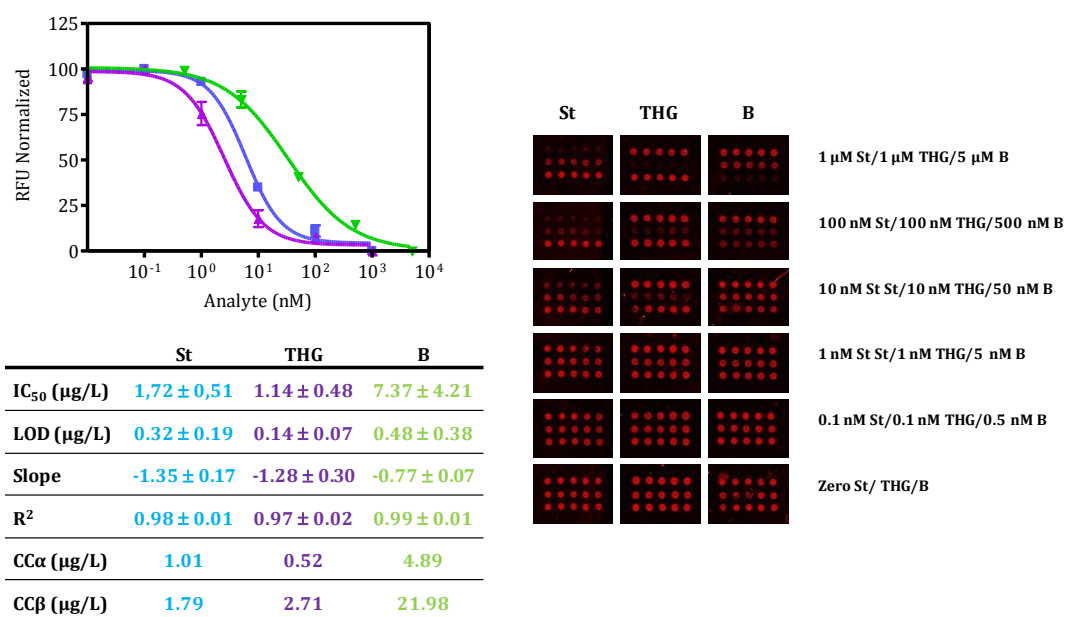


Figura 5.9: Corbes de calibratge obtingudes per a la detecció d'estanozolol (ST), tetrahydrogestrinona (THG) i boldenona (B), de forma simultània, fent ús del *microarray* d'haptens desenvolupat en aquesta tesi. Taula amb els paràmetres que defineixen les corbes e imatges obtingudes amb un escàner de fluorescència dels *spots* que defineixen cada un dels punts de les diferents corbes.

Com es pot veure en la taula de la Figura 5.9, els límits de detecció obtinguts pels tres analits estaven per sota dels 5 ng/mL establerts per la WADA¹²³ i dels 2 ng/mL establerts per la UE¹²⁴ com a MRPLs per aquests compostos. Els valors de detectabilitat obtinguts per a la detecció de la B eren pràcticament els mateixos que els obtinguts en l'assaig multianalit en format ELISA (vegeu Taula 3.4), mentre que per la detecció de ST i THG la detectabilitat de l'assaig havia empijorant, tot i que al tractar-se d'assaigs molt sensibles, continuaven complint amb els requeriments establerts per les organitzacions reguladores.

5.2.3.1 Estudi semi-quantitatiu

Per tal d'avaluar la capacitat d'emprar el *microarray* d'haptens desenvolupat com a mètode de cribratge, es van preparar mostres cegues en tampó fortificades amb els tres analits, ST, THG i B, a diferents concentracions. Els senyals obtinguts es van comparar amb els senyals obtinguts amb el zero d'analit (CTR-zero) i amb la mostra dopada a la concentració corresponent al MRPL (CTR-MRPL) establert per la WADA per a cada analit, que en el moment en què es va realitzar l'estudi era de 10 ng/mL, equivalent a 30.5 nM per ST, 32 nM per THG i 35 nM per B. Els resultats mostrats en la figura 8 de l'article 4 adjunt, posaren de manifest la capacitat del *microarray* d'haptens per diferenciar entre mostres que tenen una concentració d'analit superior al MRPL corresponent i mostres que tenen una concentració inferior, essent també possible diferenciar aquestes mostres del zero d'analit corresponent. Cal tenir present que els AAS són compostos prohibits, i per tant qualsevol mostra que tingui un senyal significativament diferent del zero

d'analit cal ser analitzada mitjançant un mètode de confirmació ja que es pot tractar d'una mostra no conforme.

5.2.3.2 Càlcul del límit de decisió ($CC\alpha$) i la capacitat de detecció ($CC\beta$)

Finalment, es van realitzar una sèrie d'experiments seguint els criteris descrits en la Decisió 2002/657/EC²⁰⁷ de la UE, per tal de determinar de manera acurada la detectabilitat del *microarray* d'haptens. La UE demana que es calculi la capacitat de detecció ($CC\beta$), fixant per a mètodes de cribratge un error β (fals conformes) $< 5\%$. En el cas d'analits prohibits, com els AAS, $CC\beta$ és la menor concentració que un mètode és capaç de detectar de forma fiable en mostres contaminades amb una certesa estadística de $1 - \beta$. Per tant, la $CC\beta$ ha de ser el més baixa possible or inferior als MRPL recomanats²⁰⁸.

El procediment emprat va consistir en mesurar 25 mostres negatives (PBST), 3 dies consecutius, per tal de mesurar en primer lloc el límit de decisió ($CC\alpha$), i a continuació la $CC\beta$. La $CC\alpha$ es va calcular emprant la següent equació, fixant un error $\alpha=1\%$,

$$CC\alpha = X(\text{zeros}) - 2.33\sigma(\text{zeros})$$

D'igual forma, la $CC\beta$ es va calcular emprant la següent equació,

$$CC\beta = CC\alpha(\text{senyal}) - 1.64\sigma(\text{zeros})$$

Seguint aquest procediment s'obtingueren els resultats mostrats en la figura 9 de l'article 4 adjunt, i fent ús de les formules mencionades anteriorment es calcularen els valors de $CC\alpha$ i de $CC\beta$ mostrats en la taula de la Figura 5.9. En el cas del ST compleix tant els requeriments de la WADA com els de la UE ja que té una $CC\beta$ de $1.79 \mu\text{g L}^{-1}$ essent inferior als dos valors de MRPL proposats per aquestes institucions. En el cas de la THG el valor de $CC\beta$ obtingut fou de $2.71 \mu\text{g L}^{-1}$, essent inferior al MRPL establert per la WADA de $5 \mu\text{g L}^{-1}$, però essent lleugerament superior al MRPL establert per l'UE de $2 \mu\text{g L}^{-1}$. Però finalment, la $CC\beta$ obtinguda per a la detecció de la B fou de $21.98 \mu\text{g L}^{-1}$, essent molt superior a ambdós valors de MRPLs. Aquest fet ens va sorprendre ja que ens estudis anteriors s'havia pogut diferenciar mostres d'inferior concentració respecte del zero corresponent sense cap problema i el límit de detecció obtingut mitjançant la corba de calibratge també era molt inferior. Però també, val a dir que l'assaig de B degut a la seva pendent inferior a la unitat sempre havia donat més problemes de reproduïbilitat que no els assaigs de ST i THG.

5.2.4 Publicació relacionada

5.2.4.1 Article 4: *Fluorescence site-encoded DNA addressable hapten microarray for anabolic androgenic steroids.* N. Tort, J.P. Salvador, R. Eritja, M. Poch, E. Martínez, J. Samitier and M.P. Marco. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 28, No. 6, 2009, 718-728.

Resum de l'article: S'ha desenvolupat un microarray d'haptens (8, hG i 13), per a la detecció d'hormones anabolitzants, mitjançant la seva prèvia unió covalent a cadenes d'oligonucleòtids (8- N_{1up} , hG- N_{2up} i 13- N_{3up}) i la seva posterior immobilització en la plataforma a través de la hibridació d'aquests conjugats oligo-haptè, simultàniament, amb les respectives cadenes d'oligonucleòtids complementàries (N_{1down} , N_{2down} and N_{3down}), prèviament immobilitzades en la plataforma. La detecció té lloc sota condicions de competència entre els diferents haptens immobilitzats en la superfície i els analits escollits (ST, THG i B) pels respectius anticossos específics (As147, As170 i As138) mesclats formant el "AS_cocktail". Per a la detecció s'ha utilitzat una anti-IgG marcada amb rodamina i per a la identificació dels diferents analits s'ha emprat una codificació espacial basada en la localització dels diferents oligonucleòtids (N_xdown , on $x=1,2$ i 3) en la superfície. Els resultats obtinguts en analitzar mostres cegues en tampó, mostren la capacitat que tindria la plataforma de detecció com a mètode de cribratge en futures competicions esportives. Podria ser útil per a l'anàlisi de mostres reals possiblement contaminades amb algun dels analits estudiats en aquest treball, ja que els límits de decisió (CC_α) i la capacitat de detecció (CC_β) assolits amb la plataforma, en general, compleixen els requeriments de detectabilitat exigits per les institucions.

Fluorescence site-encoded DNA addressable hapten microarray for anabolic androgenic steroids

Nuria Tort, J.-Pablo Salvador, Ramón Eritja, Marta Poch, Elena Martínez, Josep Samitier, M.-Pilar Marco

We report a new strategy for immunochemical screening of small organic molecules based on the use of a hapten microarray. Using DNA-directed immobilization strategies, we have been able to convert a DNA chip into a hapten microarray by taking advantage of all the benefits of the structural and electrostatic homogeneous properties of DNA. The hapten microarray uses hapten-oligonucleotide probes instead of proteins, avoiding the limitations of preparing stoichiometrically-defined protein-oligonucleotide bioconjugates.

As proof of concept, we show here the development of a microarray for analysis of anabolic androgenic steroids. The microchip is able to detect several illegal substances with sufficient detectability to be used as a screening method, according to the regulations of the World Anti-Doping Agency for sport and the European Commission for food safety.

The results that we show corroborate the universal possibilities of the DNA chip, and, in this case, they open the way to develop hapten microarrays for the immunochemical analysis of small organic molecules.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Anti-doping; DNA chip; DNA-directed immobilization (DDI); Fluorescence; Food safety; Hapten microarray; Immunochemical screening; Proof of concept; Small organic molecule; Steroid

Nuria Tort, J.-Pablo Salvador, M.-Pilar Marco,

Applied Molecular Receptors Group (AMRg), Chemical and Biomolecular Nanotechnology Department, IQAC-CSIC, Jorge Girona, 18-26, 08034 Barcelona, Spain

Ramón Eritja

Nucleic Acids Group (NAG), Chemical and Biomolecular Nanotechnology Department, IQAC-CSIC, Jorge Girona, 18-26, 08034-Barcelona, Spain

Marta Poch

Nanotechnology Platform, Barcelona Science Park, Baldiri Reixac, 10-12, 08028 Barcelona, Spain

Elena Martínez, Josep Samitier,

Nanobioengineering Group, Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC), Baldiri Reixac, 10-12, 08028 Barcelona, Spain

Josep Samitier

Department of Electronics, University of Barcelona, Martí i Franquès, 1, 08028 Barcelona, Spain

Nuria Tort, J.-Pablo Salvador*, M.-Pilar Marco, Ramón Eritja, Elena Martínez, Josep Samitier,

Networking Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine, CIBER-BBN, Barcelona, Spain

*Corresponding author.

Tel.: +34 93 4006100x413;

Fax: +34 93 2045904.;

E-mail: jpsqob@iiqab.csic.es

1. Introduction

Microarrays are defined as bidimensional molecular receptor arrays that allow simultaneous automation of assays to show recognition of specific biological markers. The use of this technology permits simultaneous detection of a large number of substances and is ideal for high-throughput analysis. Multiplexation, miniaturization and detectability are goals pursued by many researchers. Improvement in analytical efficiency and the consequent reduction of time and cost of analysis are some of the advantages of multiplexing. Technological advances in micro(nano)biotechnology have provided the possibility to develop multiplexing bioassays through two strategies:

- achieving spatial multiplexing (planar microarrays); or,
- using multiple quantitation tags (non-planar microarrays).

Planar microarrays, in which the identity of the target analyte is encoded by its location with a secondary reporter (i.e. fluorescent dye) providing quantitative data, comprise the most widely used approach. Relevant growing areas such as proteomics, genomics and pharmacogenomics are possible thanks to the availability of protein and DNA microarrays based on this principle. More information can be found in recent reviews and books dealing with this topic [1–4]. The technology behind the well-known Affymetrix GeneChip started in the late 1980s as result of advances in semiconductor-manufacturing techniques and combinatorial chemistry [5]. Today, these arrays are considered standard tools for analyzing complex genetic information. The main users in analyzing the relationship between genes and human health are companies working in pharmaceuticals, biotechnology, agrochemicals and diagnostics, in addition to academic, government and other non-profit research institutes.

Besides genomics, protein microarrays represent a big challenge in diagnostics. For example, microarrays can be very useful for drug development, allowing the analysis of the interactions of chemicals or important pharmacological targets with proteins. Protein arrays may have a strong impact on interaction-screening assays to determine the mode of action of therapeutically interesting drugs. However, protein-microarray technology is not as straightforward as DNA technology, due to the molecular variability and complex nature of proteins (e.g., different hydrophobicities, acidic or basic characters, and functionality). Unlike nucleic acids, which are relatively homogeneous in terms of structural and electrostatic properties, proteins can be extremely diverse regarding chemical structure and biological properties. Preventing protein denaturation and maintaining structural conformations are key issues in microarray technology (see [6] for a recent review on immobilization strategies). This is the reason for DNA microarrays being much more standardized.

An alternative to circumvent some of the limitations of protein-microarray technology is to use oligonucleotide probes with well-known sequences and their subsequent hybridization with their complementary oligonucleotides previously immobilized on the surface. This strategy, known as DNA-directed immobilization (DDI), has been used for spatial assembly of mixtures of molecular components (e.g., nanoparticles, proteins and polypeptides [7–13]). It not only provides greater immobilization efficiency than conventional adsorption techniques [8], but also allows reversible immobilization of biomolecules, allowing development of reusable microarrays and biosensor chips. In combination with antibodies, DDI may also provide a useful strategy to construct antibody microarrays, expanding the number of substances that can be analyzed, considering the wide variety of selectivities provided by the antibodies and their exceptional features as natural bioreceptors [14]. However, DDI

strategies to immobilize proteins would ideally require a 1:1 molar ratio for oligonucleotide:protein plus careful control of the site at which the oligonucleotide is attached. These are very difficult to achieve by the usual chemical-bioconjugation procedures. In this context, site-specific labeling strategies of recombinant proteins with DNA oligonucleotides and peptide nucleic acid (PNA) strands have been reported [6,15–19].

Small organic molecules are frequently analyzed under competitive immunochemical configurations on indirect formats by immobilizing a haptened protein on the surface of a microplate, a microchip or a transducer. Thus, using this format, protein microarrays have been reported for the immunochemical analysis of steroids in urine samples [20,21] or antibiotics [22,23]. However, these approaches also suffer from the drawbacks and the limitations of protein arrays mentioned above. In order to circumvent these drawbacks, we report an alternative strategy for small organic molecules, by combining DDI with haptens, instead of antibodies or haptened proteins. Hapten microarrays could be excellent screening platforms for the immunochemical analyses of small organic molecules (e.g., metabolites and drugs). Hapten-oligonucleotide probes can be prepared with well-defined stoichiometry and chemical structure to avoid the problems associated with immobilization of proteins.

There are no records of reports on applying the DDI approach to the multiplexed construction of hapten microarrays. Thus, in an attempt to exploit the strengths of DNA hybridization and microarray technology, the aim of this work was to develop a universal microarray platform for small organic molecule analysis, using DDI in combination with hapten-oligonucleotide conjugates and antibodies. Control of the stoichiometry and the conjugation site of these conjugates could be straightforward in comparison to those of DNA-protein constructs.

As proof of concept, we focused on the development of a microarray for determination of anabolic androgenic steroids (AASs). These substances are used illegally to improve athletic performance in sports and to increase meat production in the agro-alimentary field. AASs are completely prohibited by the World Anti-Doping Agency (WADA) [24,31] and the European Community (EC) through Directive 96/23/EC and Directive 2003/74/EC [25,26]. In order to control the use of these substances, WADA and EC have established regulations and requirements, which call for screening methods able to meet the requirements in order to ensure fair competition at athletic events and to improve the health status of the population, respectively.

2. Experimental

2.1. Reagents and immunoreagents

The immunoreagents for stanozolol (St), boldenone (B) and tetrahydrogestrinone (THG) used in this study have

been described before [27–29]. Other immunochemicals were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). The “As cocktail” is combination of the three antisera (St: As147, diluted 4000 times; THG: As170 diluted 2000 times; B: As138 diluted 16000 times, all in PBST). THG was synthesized in our laboratory [28] and other analytes were purchased from Sequoia Research Products, Ltd. (Oxford, UK) and Sigma-Aldrich. The analytes used were NorStanozolol (NorSt), 16 β -OH-Stanozolol (16bOH-St), 3'-OH-Stanozolol (3'OH-St), α -Boldenone (aB), Methylboldenone (MB), Gestrinone (G), Norethandrolone (NEth), Methyltestosterone (MT), Testosterone (T), Nandrolone (NT), Ethynilestradiol (EES), Progesterone (P), Trenbolone (Tr), Estrone (E1), Estradiol (E2), Androstenedione (A1), Androstadienedione (A2) and Dihydrotestosterone (DHT). Stock solutions were prepared at 10 mM concentration in DMSO. The synthesis of the oligonucleotides (*N1down*, *N2down* and *N3down*) and of the hapten-oligonucleotide conjugates (St: 8-*N1up*, THG: hG-*N2up* and B: 13-*N3up*) will be described elsewhere. The “H-OLG cocktail” is a mixture of the three conjugates at 0.01 μ g/mL. The anti-rabbit IgG-TRITC was purchased from Sigma-Aldrich. Other chemical reagents were purchased from Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, USA).

2.2. Buffers

PBS was 0.01 M phosphate buffer in a 0.8% saline solution (137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl), and the pH was 7.5. PBST was PBS with 0.05% Tween 20. Printing buffer comprised 150 mM sodium phosphate (pH 8.5)/0.01% sodium dodecyl sulphate. Blocking solution was 2% BSA in PBS. Hybridization buffer was 10 mM TRIS, 1 mM EDTA, 1 M NaCl (pH 7.2). The final washing buffer was 0.1 x SSC (15 mM NaCl + 1.5 mM sodium citrate), 0.05% SDS (pH 7.5).

2.3. General methods, materials and instruments

The poly-L-lysine coated microscope slides were purchased from Polysciences, Inc. The pH and the conductivity of all buffers and solutions were measured with a 540 GLP pH meter and an LF 340 conductimeter (WTW, Weilheim, Germany), respectively.

2.3.1. Microarray printing. Oligonucleotide chains (*N1-3down*, 200 μ g/mL in printing buffer) were spotted onto poly-L-lysine substrates using a BioOdyssey Calligrapher MiniArrayer (Bio-Rad Laboratories, Inc. USA) in a high-humidity chamber, maintained for 30 min at room temperature and finally dried in an oven for 30 min at 60°C. Each glass slide contained 24 wells. A 5 \times 3 spot matrix was printed on each well with five spots replicated for each oligonucleotide *Nxdown*.

2.3.2. Scanner. Measurements were recorded on a ScanArray Gx PLUS (Perkin Elmer, USA) with a Cy3

optical filter with 5- μ m resolution. The laser power and PMT were set to 90% and 70%, respectively. The spots were measured by F543_Mean-B543 (Mean Cy3 foreground intensity minus mean Cy3 background intensity). Fluorescence intensity values were expressed normalized or in relative units as average and standard deviation of three replicate wells. The competitive curves were analyzed with a four-parameter logistic equation using software [SoftmaxPro v4.7 (Molecular Devices) and GraphPad Prism v 4 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)]. The standard curves were fitted to a four-parameter equation according to the following formula: $Y = [(A - B)/1 - (x/C)^D] + B$, where A is the maximal fluorescence, B the minimum fluorescence, C the concentration producing 50% of the difference between A and B (or IC_{50}), and D the slope at the inflection point of the sigmoid curve. The limit of detection (LOD) was defined as the concentration producing 90% of the maximal fluorescence (IC_{90}).

2.4. Preparation of the hapten microarray

The slides were placed on a microplate microarray ArrayIt hardware system allowing 96-well formatted experimentation with up to four glass substrate slides (Telechem International Inc.). The system was provided with a silicon gasket that demarcated into 24 wells per slide. Before starting the assay, the slides were blocked (100 μ L/well-blocking solution) for 30 min and washed four times with PBST. Once ready, the H-OLG cocktail was added (0.01 μ g/mL in the hybridization buffer, 100 μ L/well in all cases) and after 30 min of incubation at RT, the slide were washed and dried. In this way, the chip was ready for use.

2.5. Multianalyte immunoassay on the microchips

Standards (0.1 nM–1 μ M (St), 0.1 nM–1 μ M (THG) and 0.5 nM–5 μ M (B), all in PBST) or the samples were added to the wells (50 μ L/well in PBST) followed by the “AS cocktail” (50 μ L/well, PBST) and incubated for 30 min at RT. The slides were washed and the anti-IgG-TRITC solution (1/250 in PBST, 100 μ L/well) was added. After an incubation step of 30 min at RT, the slide was washed with the final washing buffer, dried with N_2 and read with the scanner.

2.6. Semi-quantitative study

Blind samples were prepared in PBST and measured using the multi-analyte microarray protocol described above. Negative and positive control solutions with a concentration of the AAS at the minimum required performance limit (MRPL) value (according to WADA 10 μ L: 30.5 nM for St, 32 nM for THG and 35 nM for B) were also measured on the same slide. In order to obtain response within the linear range of St and THG, the samples and also the control of concentration at the St MRPL value (St CTR-MRPL) and the control of con-

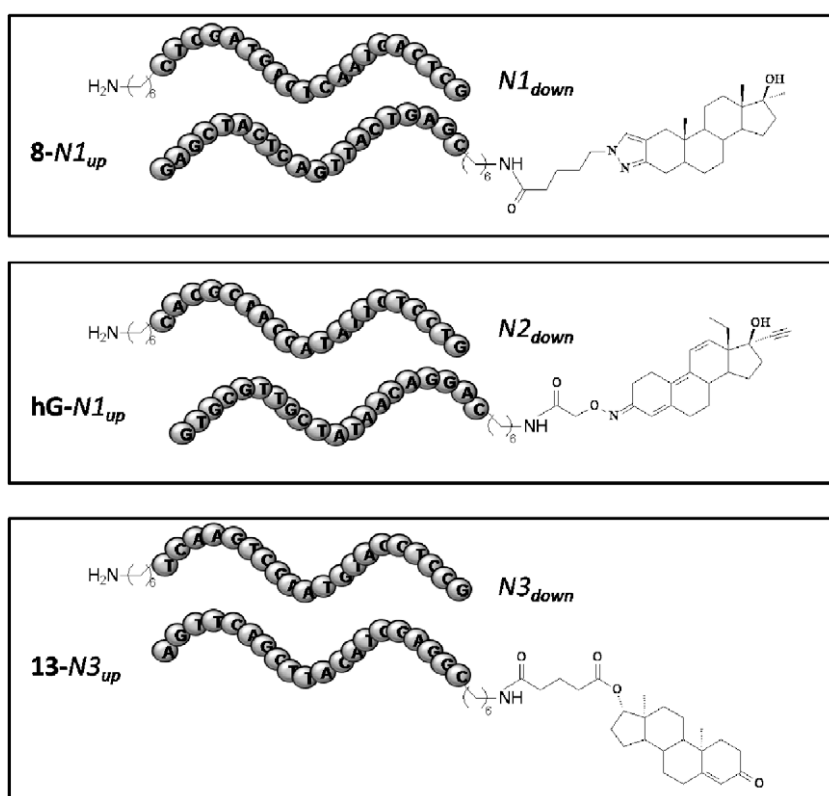


Figure 1. Chemical structures and sequences of the oligonucleotides immobilized on the microchip and the hapten-oligonucleotide conjugates, whose complementary sequence is used to build the hapten microarray. Stanozolol: *N1down/8-N1up*, Tetrahydrogestrinone: *N2down/hG-N2up* and Boldenone: *N3down/13-N3up*.

centration at the THG MRPL value (THG CTR-MRPL) were diluted (6 times in the St assay and 10 times in

the THG assay) in PBST. Analyses were performed in triplicate.

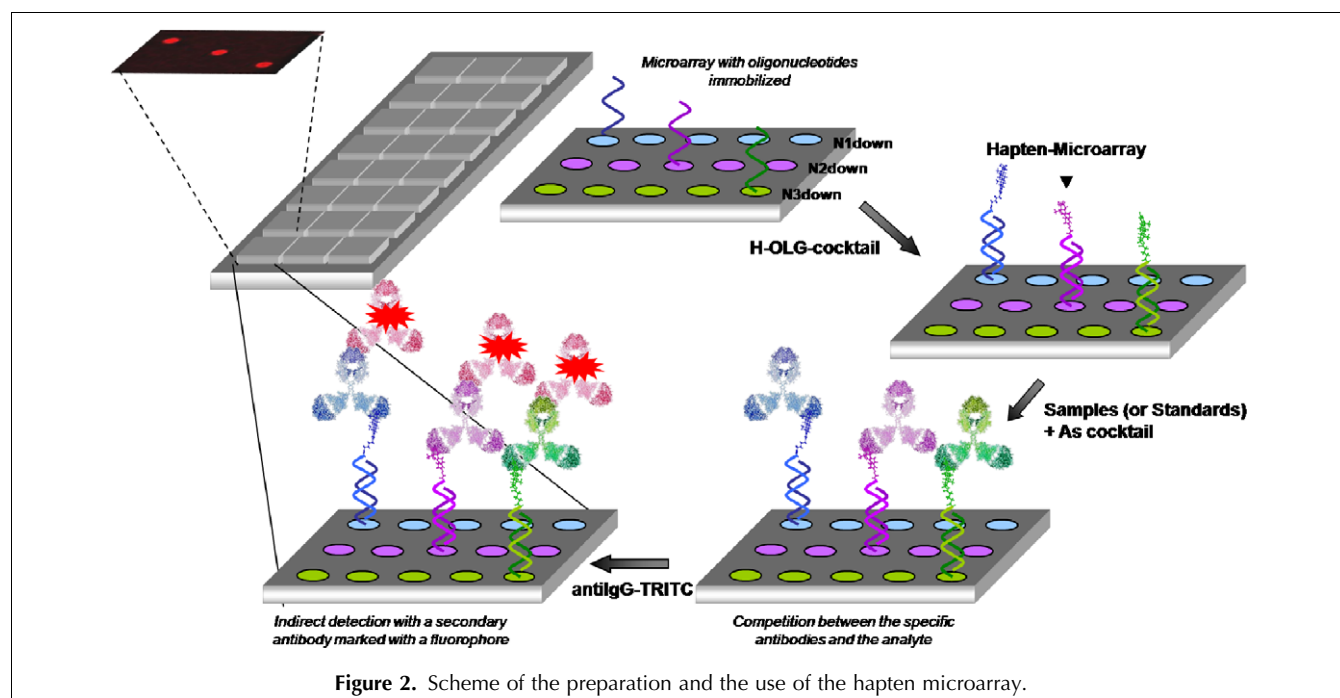


Figure 2. Scheme of the preparation and the use of the hapten microarray.

2.7. Specificity of the chip

The responses of other AASs and related steroids at their MRPL concentration were also evaluated in triplicate and measured with the microarray.

2.8. Decision limit ($CC\alpha$) and detection capability ($CC\beta$)

25 blank samples (PBST solutions) were analyzed for 3 days to calculate the decision limit and the signal-to-noise ratio at the window in which the lower concentration of the analyte was expected. The $CC\alpha$ was calculated by subtracting 2.33 times the corresponding standard deviation to the average signal obtained when measuring the blank samples ($\alpha = 1\%$) followed by interpolation of this value in the calibration curve of each steroid. $CC\beta$ was determined, in the same way, using the equation $CC\beta = CC\alpha(\text{signal}) - 1.64 \times SD$, SD being the standard deviation obtained for the above blanks.

3. Results and discussion

We present here the development of a universal bioanalytical platform for immunochemical analysis of different substances, particularly small organic molecules. The approach uses the advantages of DNA microarrays combined with the excellent features of antibodies as bioreceptors. Antibody microarrays have the potential to revolutionize protein diagnostics [9,14,30]. However, the major problems in the fabrication of antibody arrays are related to the reproducibility and the homogeneity of attaching the proteins onto the solid substrate. DDI strategies allow conversion of an array of DNA oligomers into an antibody microarray [14], but the stoichiometry and the conjugation site of the single stranded DNA to the protein need to be controlled precisely [17].

3.1. Application of strategy of DNA-directed immobilization (DDI)

In this work, we applied the DDI strategy to create a hapten microarray through the use of well-defined hapten-oligonucleotide conjugates. This type of microarray could allow determination of small organic molecules under competitive conditions, using the well-known indirect immunoassay format.

To achieve this objective, the microarray chip was prepared with oligonucleotide chains of different sequences [$N1_{down}$, $N2_{down}$ and $N3_{down}$ (see Fig. 1)] immobilized on the microarray substrate (microarray chip) using poly-lysine glass slides demarcated into 24 wells, by spotting a 5×3 matrix of the three oligonucleotides on each well [$N1_{down}$, $N2_{down}$ and $N3_{down}$, five replicates/each per well (see Fig. 2)]. In this way, the slides were used to prepare the AAS hapten microarray by hybridizing the oligonucleotide chains with their

complementary sequence using a cocktail of hapten-oligonucleotide conjugates (H-OLG cocktail). In this case, the hapten-oligonucleotide conjugates [$8-N1_{up}$, $hG-N2_{up}$ and $13-N3_{up}$ (see Fig. 1)] contained the complementary sequence of the immobilized oligonucleotides covalently attached to the St, THG and B haptens, respectively. Hybridization on the surface of the DNA-chip gave a hapten microarray in which each hapten was immobilized in an organized way through hybridization of the matching single-stranded DNA chains.

Fig. 2 illustrates the methodology used for measuring steroids with the hapten microarray. First, a mixture of the sample (or standards) and a cocktail with the antibodies (AS cocktail) was added, and, after 30 min incubation, the antibody-hapten-oligonucleotide interaction was visualized using anti-IgG-TRITC.

3.2. Selectivity of the hybridization step

This was assessed by using microarrays prepared as described above and incubating each chip separately with

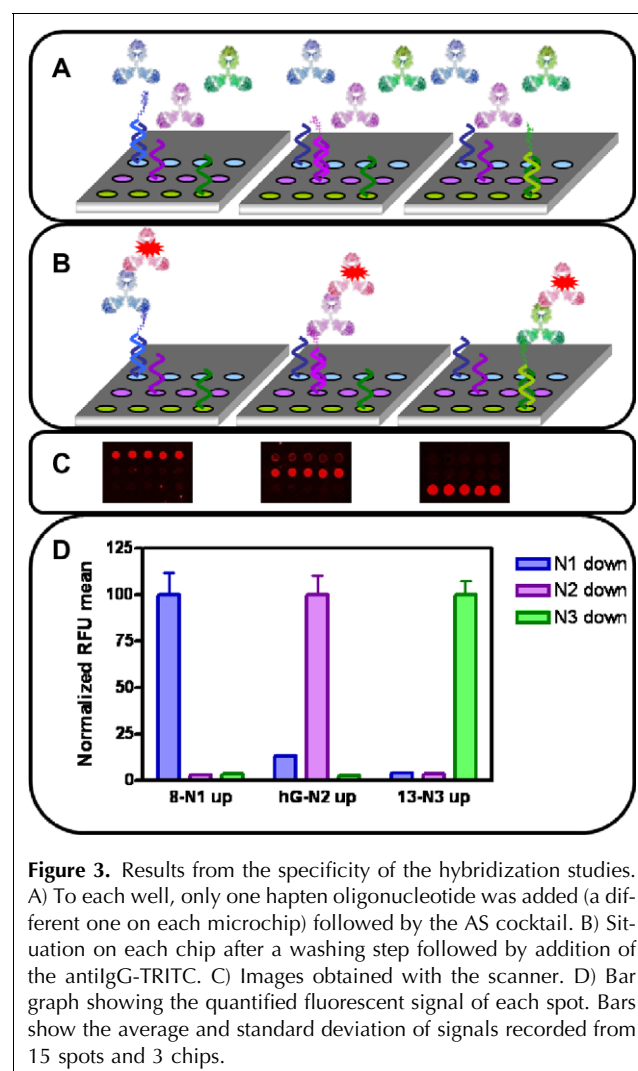


Figure 3. Results from the specificity of the hybridization studies. A) To each well, only one hapten oligonucleotide was added (a different one on each microchip) followed by the AS cocktail. B) Situation on each chip after a washing step followed by addition of the antiIgG-TRITC. C) Images obtained with the scanner. D) Bar graph showing the quantified fluorescent signal of each spot. Bars show the average and standard deviation of signals recorded from 15 spots and 3 chips.

one of the oligonucleotide-hapten conjugates (8-N1up, hG-N2up and 13-N3up). After a washing step, the "AS cocktail" was added, followed by the anti-IgG-TRITC. Fig. 3 shows that fluorescent signals were observed on only those spots in which the complementary oligonucleotide was immobilized, demonstrating the high specificity of this step. Moreover, specific antibody binding occurred on only those spots in which hybridization had taken place.

3.3. Selectivity of the antibody-binding step

This has been demonstrated before on ELISA formats in which haptenized proteins were immobilized on the microplates [28,29]. However, to ensure the specificity of the signal for the hapten-oligonucleotide conjugates, each microarray chip was incubated with the H-OLG cocktail and, in the next step, the antibodies were added separately on each microchip, followed by the anti-IgG-TRITC. In this case, the greater signals were observed on those spots that contained the matching hapten-oligonucleotide conjugate. However, surprisingly, shared-recognition was observed between St and THG. Thus, a marked recognition of the 8-N1up (St) by As170 (specific for THG) was observed and vice versa, although the recognition of As147 (specific for St) for hG-N2up (THG) was lower (see Fig. 4). Although this shared-recognition effect could be a drawback, as will be shown below, subsequent experiments demonstrated that this effect was not observed using the "As cocktail". Apparently, the presence of the specific antibody in the mixture prevented binding of other antibodies.

3.4. Multiplexed microarray for anabolic androgenic steroids

Analysis of St, THG and B was performed by exposing the hapten microarray to solutions containing these analytes mixed with the As cocktail and with no analyte. Fig. 5 shows that the presence of each analyte inhibited the binding of the corresponding antibody to the hapten-oligonucleotide in a specific manner, although a slight inhibition in the THG assay was observed in the presence of St, and vice versa, probably due to the high concentrations assayed in these initial experiments. Moreover, Fig. 5 shows that no shared recognition was observed using the As cocktail. This could be explained by the greater affinity of each antibody for its counter hapten-oligonucleotide in the microarray, because, in presence of the corresponding antibody, binding of other antibodies with lower affinity is prevented.

Standards at different concentrations of the three AASs were measured using the above-mentioned protocol, affording calibration curves (e.g., see Fig. 6). As can be observed, the detectability accomplished is in compliance with the WADA and EC requirements regarding the MPRL proposed by those agencies (see microchip features, Table 1). The experiments therefore

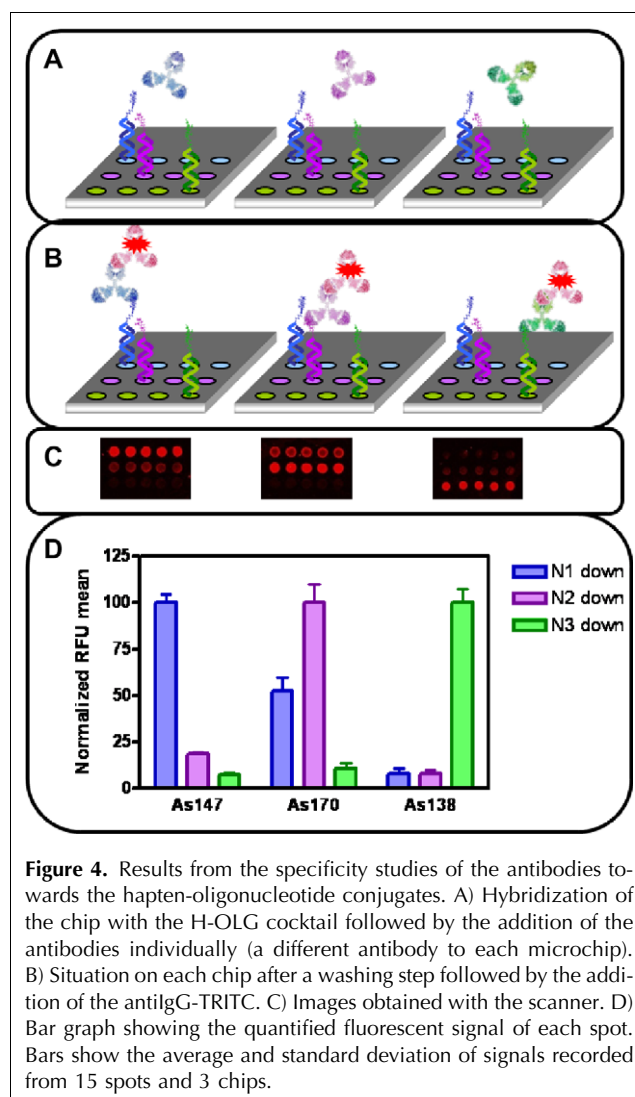


Figure 4. Results from the specificity studies of the antibodies towards the hapten-oligonucleotide conjugates. A) Hybridization of the chip with the H-OLG cocktail followed by the addition of the antibodies individually (a different antibody to each microchip). B) Situation on each chip after a washing step followed by the addition of the anti-IgG-TRITC. C) Images obtained with the scanner. D) Bar graph showing the quantified fluorescent signal of each spot. Bars show the average and standard deviation of signals recorded from 15 spots and 3 chips.

demonstrated that St, THG and B can be detected in buffer with LODs of 0.32 $\mu\text{g/L}$, 0.14 $\mu\text{g/L}$ and 0.48 $\mu\text{g/L}$, respectively, when the MRPL values proposed by WADA are 10 $\mu\text{g/L}$.

3.5. Preliminary validation study

In order to assess microarray precision, inter-slide and intra-slide variability was evaluated by measuring samples spiked at zero concentration (15 blank samples) and at the MRPL (45 samples, 15 for each steroid). Analyses were performed using 5 spots/chip in 3 chips/slide in 3 different microarray slides for each hormone. Table 1 shows the results obtained. The intra-slide variability refers to the variability between chips in the same microarray slide and the inter-slide variability refers to the variability between different microarray slides. As is shown, the coefficient of variations (%CV) obtained were quite low considering the microarray is addressed to perform screening.

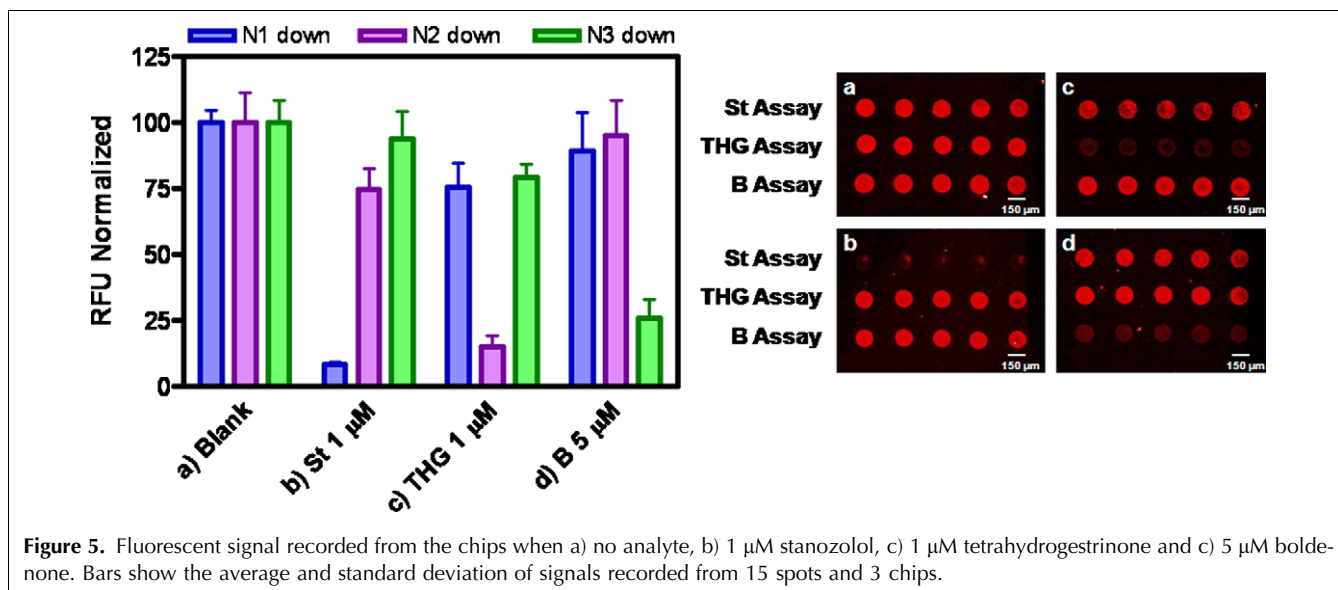


Figure 5. Fluorescent signal recorded from the chips when a) no analyte, b) 1 μ M stanozolol, c) 1 μ M tetrahydrogestrinone and c) 5 μ M boldenone. Bars show the average and standard deviation of signals recorded from 15 spots and 3 chips.

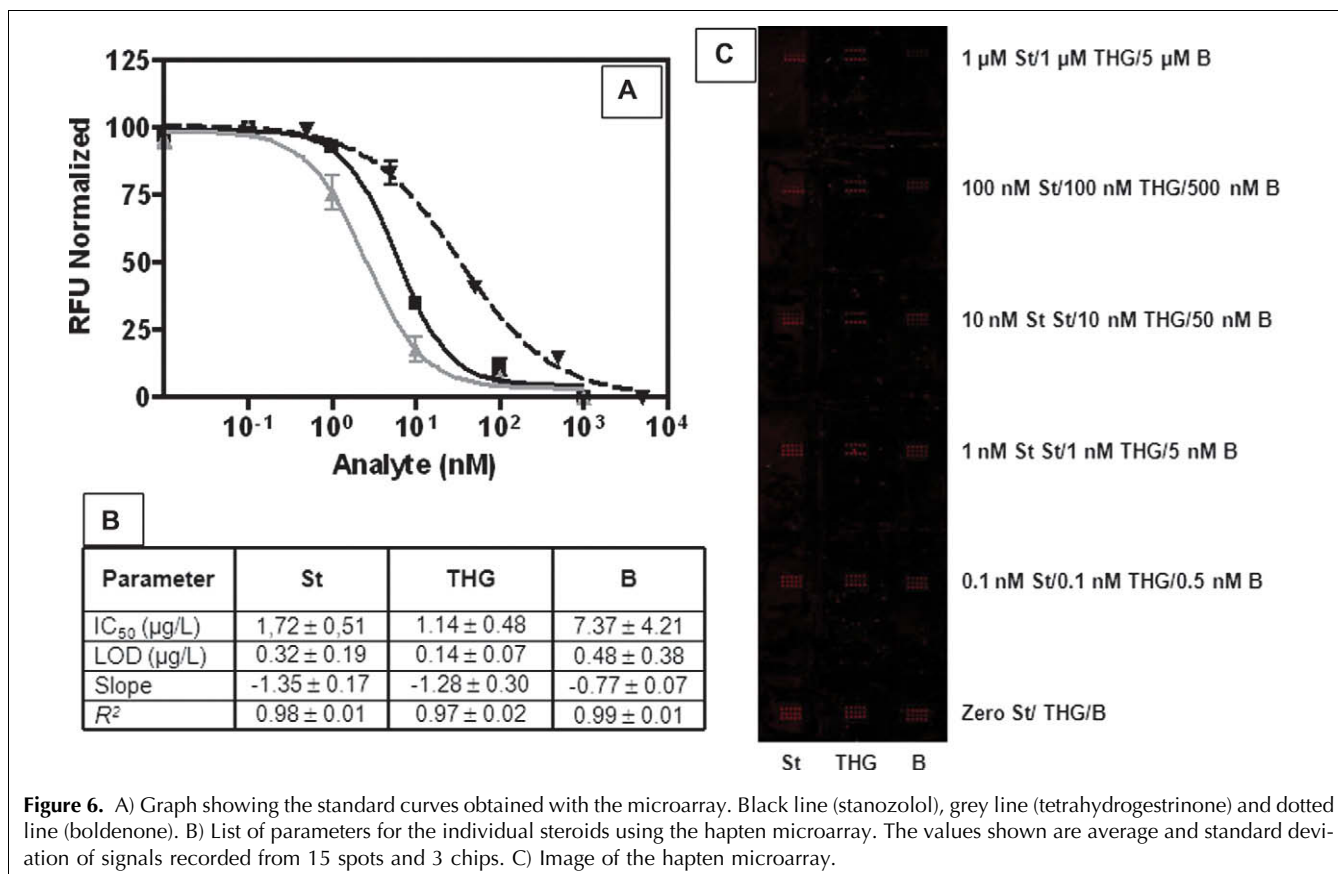


Figure 6. A) Graph showing the standard curves obtained with the microarray. Black line (stanozolol), grey line (tetrahydrogestrinone) and dotted line (boldenone). B) List of parameters for the individual steroids using the hapten microarray. The values shown are average and standard deviation of signals recorded from 15 spots and 3 chips. C) Image of the hapten microarray.

The specificity of the microarray was evaluated by measuring individual samples of different AASs, doping substances and dietary supplements (see Fig. 7). The results showed that these analytes do not affect the recognition profile of the individual assays. Moreover, other illegal substances, in addition to St, THG and B, could also be detected with this microarray due to the

immunoassay cross-reactivity, which expands the potential of the microchip configuration for screening purposes. Taking into account that the use of these substances is completely prohibited, any unknown sample with a signal below control at zero concentration (CTR zero) could be non-compliant and would need to be confirmed with a reference analytical method.

Table 1. Microarray precision results, the values being coefficients of variation expressed in % (SD/Mean*100)

Assay	%CV, Intra-side		%CV, Inter-side	
	MRPL	Zero	MRPL	Zero
Stanozolol	18	11	17	15
Tetrahydrogestrinone	30	18	15	18
Boldenone	14	10	8	11

With the aim of performing a preliminary evaluation of the microchip, blind spiked samples of the three steroids at different concentrations (from 10–15 nM for each steroid in buffer) were analyzed with the hapten

microarray and the response compared with those provided by CTR-zero and at the MRPL (CTR-MRPL) concentrations of each steroid, according to WADA. The objective of this experiment was to prove if the microarray could respond to the WADA requirements by detecting all samples with values above the MRPL. Results shown in Fig. 8 demonstrated that the hapten microarray developed in this study can clearly detect samples that contain AASs even below the MRPL. It must be noticed that the MRPL values indicate the detectability that the method should accomplish, but, since the use of AAS is completely prohibited, any sample giving a positive answer, even if the level is below the MRPL, could be subject to the necessary actions if confirmed by a reference method.

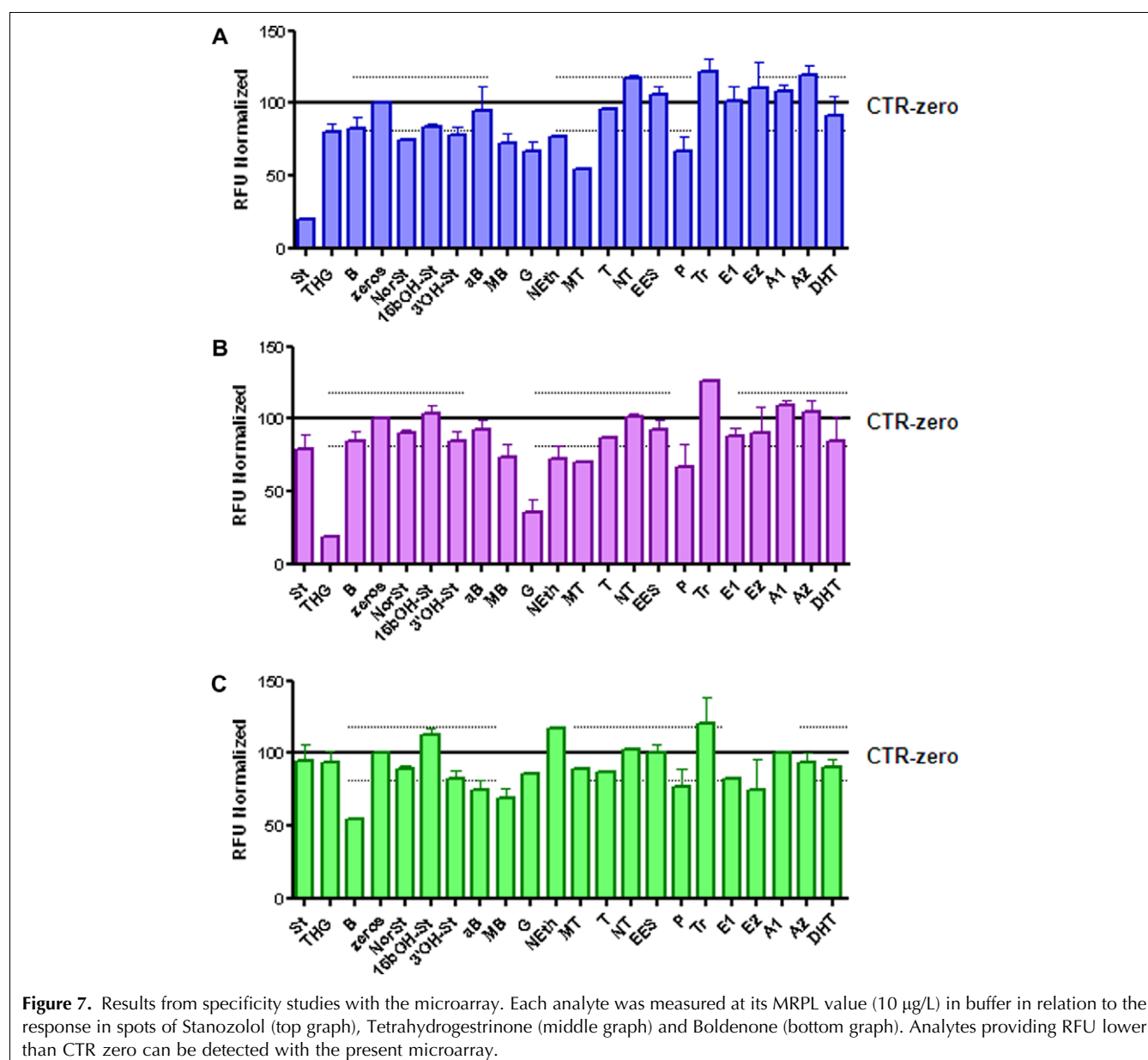
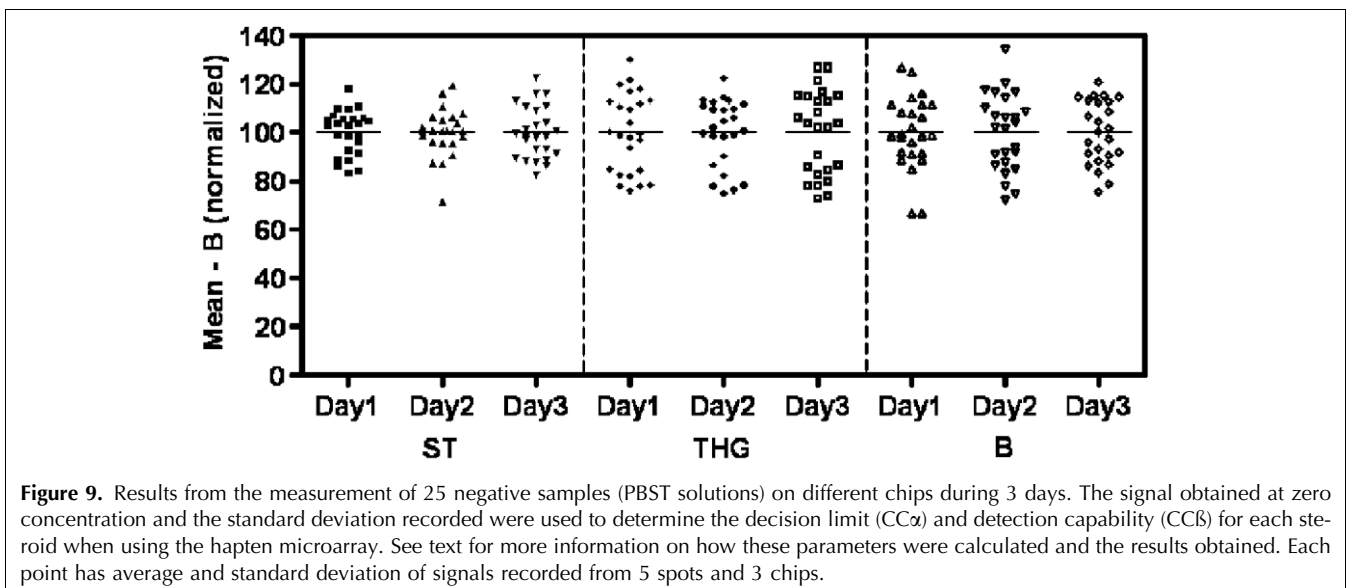
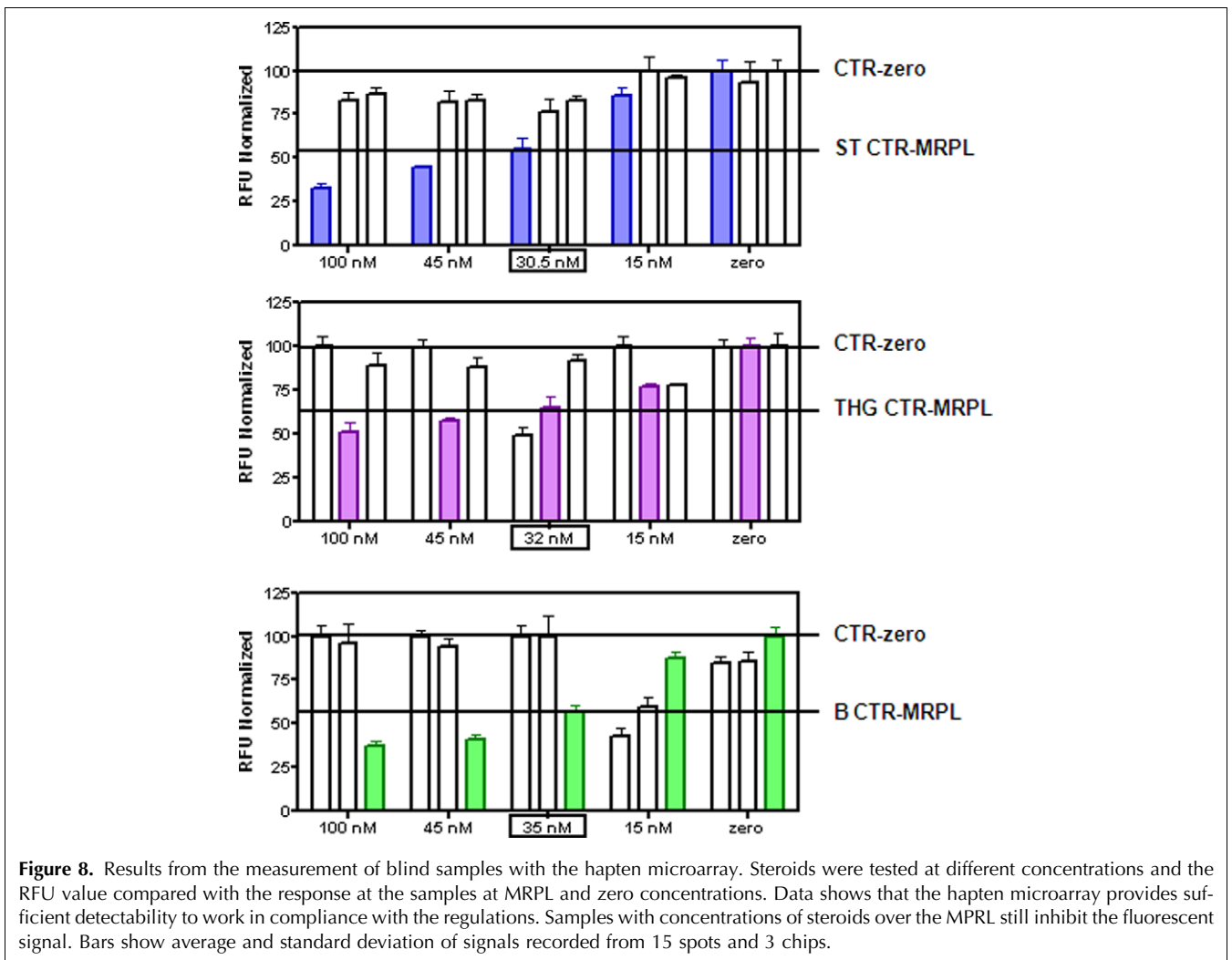


Figure 7. Results from specificity studies with the microarray. Each analyte was measured at its MRPL value (10 μ g/L) in buffer in relation to the response in spots of Stanozolol (top graph), Tetrahydrogestrinone (middle graph) and Boldenone (bottom graph). Analytes providing RFU lower than CTR zero can be detected with the present microarray.



Finally, a series of experiments was performed following the criteria of EC Commission Decision 2002/657/EC regarding qualitative screening methods in order to determine the decision limit ($CC\alpha$) and the detection capability ($CC\beta$) of the AAS hapten microarray. Following the procedure described in the experimental section, the $CC\alpha$ values obtained were 1.01 $\mu\text{g/L}$ for St, 0.52 $\mu\text{g/L}$ for THG and 4.89 $\mu\text{g/L}$ for B. (see Fig. 9). Similarly, $CC\beta$ values were found to be 1.79 $\mu\text{g/L}$, 2.71 $\mu\text{g/L}$ and 21.98 $\mu\text{g/L}$ for St, THG and B, respectively. Thus, while the $CC\alpha$ and $CC\beta$ values obtained for St and THG were in compliance with the WADA and EC requirements, B values were not. That was unexpected, considering the LOD values calculated from the calibration curves. Moreover, as Fig. 8 shows, the microarray can very well distinguish the samples that contain B, and that did not match the result obtained using the procedure suggested by the EC. This disagreement could be related to the competitive nature of this type of immunochemical method, for which perhaps other calculation procedures should have been used.

4. Conclusions

Immunochemical methods show great potential for diagnostics and screening purposes in many fields. Combining them with microarray technology may extraordinarily increase the analytical capabilities of these methods. Major concerns are around the homogeneity and the reproducibility of the immobilization of proteins to the surfaces of microarrays, whose functionality may be compromised. To circumvent these limitations, DDI methods have opened up the possibility to develop universal platforms for analysis of a great variety of substances (e.g., proteins, peptides and cells) using microarray technology. The results presented here support the universality of this approach. We developed a hapten microarray by immobilizing hapten-oligonucleotide conjugates in which the single-stranded DNA sequence was complementary to the oligonucleotide immobilized on the chip. This approach opens the door to use this universal platform for the analysis of small organic molecules by microarray. Moreover, at difference of the protein-DNA probes used to build protein microarrays, hapten-oligonucleotide conjugates can be easily prepared with very well-defined structure and stoichiometry.

As a proof of concept, we developed a hapten-microarray platform for detection of AASs using a site-encoded configuration in which the identity of the target analyte was encoded by its location in the detection platform. The assay can be run in about 3 h and provides a specific response on a different microarray section, depending on the target analyte. This platform could detect and iden-

tify these AASs in blind samples and discriminated between compliant, non-compliant and blank samples. The strategy presented here is universal and could be used to detect other target analytes of interest in the biomedical, food and environmental fields.

Acknowledgements

This work has been supported by the Ministry of Science and Innovation (Contract numbers NAN2004-09415-C05-02 and DEP2007-73224-C03-01). The AMR group is a Grup de Recerca de la Generalitat de Catalunya and has support from the Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació la Generalitat de Catalunya (expedient 2005SGR 00207).

References

- [1] P. Angenendt, J. Hoheisel, D. Cahill, H. Lehrach, J. Glokler, *Mol. Cell. Proteomics* 4 (2005) S330.
- [2] M. Cretich, F. Damin, G. Pirri, M. Chiari, *Biomol. Eng.* 23 (2006) 77.
- [3] D.A. Hall, J. Ptacek, M. Snyder, *Mech. Ageing Dev.* 128 (2007) 161.
- [4] A. Lueking, D.J. Cahill, S. Mullner, *Drug Discov. Today* 10 (2005) 789.
- [5] D.N. Modlin, L. Aldwin, D.A. Ross, S.P.A. Fodor, J.L. Winkler, C.J. Buchko, New combinatorial kit for forming polymer sequences on a substrate, especially for synthesizing high-density arrays of diverse polymer sequences, and for delivering fluids to several selected regions on the surface of a substrate, Affymetrix Inc., 2001 (www.affymetrix.com/).
- [6] P. Jonkheijm, D. Weinrich, H. Schroder, C.M. Niemeyer, H. Waldmann, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 47 (2008) 9618.
- [7] J. Ladd, C. Boozer, Q. Yu, S. Chen, J. Homola, S. Jiang, *Langmuir* 20 (2004) 8090.
- [8] R. Wacker, C.M. Niemeyer, *ChemBiochem* 5 (2004) 453.
- [9] C.A.K. Borrebaeck, C. Wingren, *Expert Rev. Mol. Diagnostics* 7 (2007) 673.
- [10] F. Rusmini, Z.Y. Zhong, J. Feijen, *Biomacromolecules* 8 (2007) 1775.
- [11] Y.C. Tang, G.Q. Wan, J.K. Ng, P.K. Ajikumar, H.P. Too, *Front. Biosci.* 13 (2008) 5755.
- [12] C.M. Niemeyer, *Trends Biotechnol* 20 (2002) 395.
- [13] S. Weng, K. Gu, P.W. Hammond, P. Lohse, C. Rise, R.W. Wagner, M.C. Wright, R.G. Kuimelis, *Proteomics* 2 (2002) 48.
- [14] R. Wacker, H. Schroder, C.M. Niemeyer, *Anal. Biochem.* 330 (2004) 281.
- [15] S. Takeda, S. Tsukiji, T. Nagamune, *Biorg. Med. Chem. Lett.* 14 (2004) 2407.
- [16] U. Feldkamp, H. Schroeder, C.M. Niemeyer, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 23 (2006) 657.
- [17] M. Lovrinovic, C.M. Niemeyer, *ChemBiochem* 8 (2007) 61.
- [18] M. Lovrinovic, M. Spengler, C. Deutsch, C.M. Niemeyer, *Mol. Biosyst.* 1 (2005) 64.
- [19] C.M. Niemeyer, *Biochem. Soc. Trans.* 32 (2004) 51.
- [20] H. Du, Y. Lu, W. Yang, M. Wu, J. Wang, S. Zhao, M. Pan, J. Cheng, *Anal. Chem.* 76 (2004) 6166.
- [21] H. Du, M. Wu, W. Yang, G. Yuan, Y. Sun, Y. Lu, S. Zhao, Q. Du, J. Wang, S. Yang, M. Pan, Y. Lu, S. Wang, J. Cheng, *Clin. Chem.* 51 (2005) 368.
- [22] Z. Peng, Y. Bang-Ce, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 6978.
- [23] B.G. Knecht, A. Strasser, R. Dietrich, E. Martlbauer, R. Niessner, M.G. Weller, *Anal. Chem.* 76 (2004) 646.

- [24] World Anti-Doping Agency (WADA), The 2008 Prohibited List (www.wada-ama.org/rtecontent/document/2008_List_Format_en.pdf).
- [25] European Commission, Off. J. Eur. Commun. L 125 (1996) 3.
- [26] European Commission, Off. J. Eur. Commun. L 262 (2003) 17.
- [27] K. Kramer, A. Hubauer, R. Lausterer, J.-P. Salvador, M.-P. Marco, Anal. Lett. 40 (2007) 1461.
- [28] J.-P. Salvador, F. Sanchez-Baeza, M.-P. Marco, Anal. Chem. 79 (2007) 3734.
- [29] J.-P. Salvador, F. Sánchez-Baeza, M.-P. Marco, Anal. Biochem. 376 (2008) 221.
- [30] C. Wingren, C.A.K. Borrebaeck, Omics 10 (2006) 411.
- [31] World Anti-Doping Agency (WADA), Minimum required performance limits for detection of prohibited substances, 2004 (www.wada-ama.org/en/dynamic.ch2?pagecategory.id=372).

5.3 Resum de les aportacions principals del capítol

- S'ha demostrat la possibilitat d'emprar *microarrays* d'ADN per analitzar substàncies de baix pes molecular, a través de la conversió d'aquests en *microarrays* d'haptens, fent ús de la reacció d'hibridació entre cadenes d'ADN complementàries (estratègia DDI) emprant sondes haptè-oligonucleòtid.
- Ha quedat demostrat que és possible la utilització d'aquest *microarray* d'haptens per a la detecció simultània dels corresponents analits e identificació en base a la seva localització en la plataforma de detecció. Aquest tipus de *microarray* pot ser una eina molt útil com a mètode de cribratge per a la detecció multiplexada de molècules de baix pes molecular en condicions competitives, emprant un format d'immunoassaig indirecte.
- S'ha desenvolupat un assaig immunofluorescent en format *microarray* per a la detecció d'AAS fent ús d'un còctel de conjugats haptè-oligonucleòtid i un còctel d'antisèrums, amb límits de detecció per sota dels requeriments establerts per la WADA i la UE per a la detecció d'aquests compostos.
- Aquesta és la primera vegada que es demostra que l'estratègia DDI pot ser útil per la conversió de *microarrays* d'ADN en *microarrays* aptes per l'anàlisi immunoquímico multiplexat de molècules petites.

6. PREPARACIÓ DE SUPERFÍCIES NANOESTRUCTURADES MITJANÇANT L'ESTRATÈGIA DDI

6.1 Precedents i objectius del capítol

Un cop demostrat que era possible desenvolupar una plataforma multiplexada de caràcter universal partint d'un *microarray* d'ADN, ens vàrem plantejar la idea d'utilitzar la mateixa estratègia (DDI) en aquest cas per a la immobilització de nanopartícules de metalls nobles sobre la superfície, amb l'objectiu de crear superfícies nanoestructurades que poguessin ser emprades com a transductors en immunosensors òptics de tipus LSPR (vegeu l'apartat 2.2.1.2). Això implicava, per una banda la preparació de conjugats biohíbrids oligonucleòtids-nanopartícules, i per l'altra, la preparació d'un *microarray* d'ADN que contingués les cadenes d'oligonucleòtids complementàries. D'aquesta forma fent ús de l'estratègia DDI, seria possible la immobilització controlada d'aquestes nanopartícules sobre la superfície a través de la hibridació entre les cadenes d'oligonucleòtids complementàries. A la vegada, aquesta superfície podria constituir una plataforma universal per a la detecció i quantificació de qualsevol tipus d'analit, sempre i quan es disposés de la corresponent sonda d'oligonucleòtids, necessària per a la seva detecció (vegeu l'esquema de l'estratègia en la Figura 6.1).

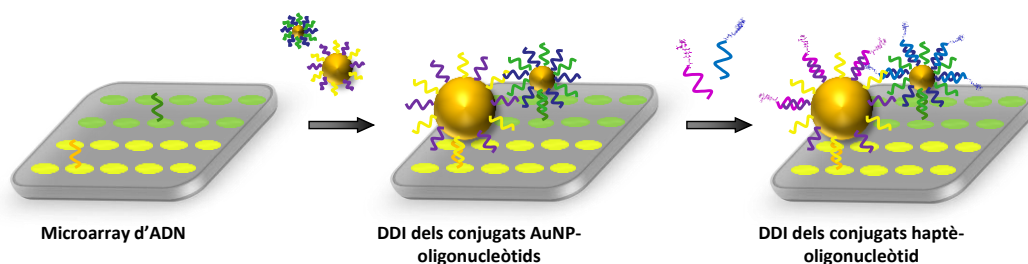


Figura 6.1: Esquema de la preparació de superfícies nanoestructurades biofuncionals a través de la immobilització de conjugats biohíbrids de nanopartícules d'or (AuNP) fent ús de l'estratègia DDI (*DNA-directed immobilization*) i la posterior hibridació de diferents sondes haptè-oligonucleòtids en funció dels analits a detectar.

Així doncs, en aquest capítol s'exposa el treball realitzat per a la preparació de superfícies nanoestructurades funcionals explotant els avantatges que ofereix l'estratègia DDI, i com a prova

del concepte, s'ha mostrat el potencial ús que podrien tenir aquestes superfícies com a transductors en un immunosensor òptic de LSPR per a la detecció d'hormones anabolitzants. Conseqüentment, per a la preparació dels conjugats biohíbrids es van emprar mescles equimolars de dos oligonucleòtids, un d'ells per tal d'immobilitzar la nanopartícula de forma controlada en la superfície, i l'altra, per capturar la sonda d'oligonucleòtids corresponent, diferent en funció de l'analít a analitzar. En aquest treball concretament, es varen fer servir les sondes d'haptens d'hormones anabolitzants prèviament sintetitzades (descrites en el capítol 4), i es van emprar nanopartícules esfèriques d'or de dues mides diferents, 20 nm i 40 nm, cada una d'elles amb un pic del plasmó ressonant superficial localitzat (LSPR) característic.

6.1.1 Fabricació de superfícies nanoestructurades de metalls nobles

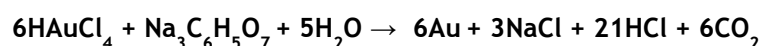
En els últims anys ha incrementat l'ús de tècniques litogràfiques basades en l'aproximació *top-down* per a la fabricació de nanoestructures metàl·liques sobre superfícies sòlides, com l'*electron beam lithography* (EBL)²⁰⁹, el *focused ion beam* (FIB)²¹⁰ o el *nanosphere lithography* (NSL)²¹¹⁻²¹⁴. Aquestes tècniques permeten un control acurat de la mida, forma i distribució espacial de les nanoestructures, aconseguint superfícies reproduïbles i homogènies. Tot i així, el cost associat a l'ús d'aquestes tècniques sol ser molt elevat en comparació a la immobilització de nanopartícules de metalls nobles prèviament sintetitzades sobre superfícies sòlides, aproximació coneguda com *bottom-up*²¹⁵. Aquesta estratègia ofereix una alternativa, en principi més senzilla i de menor cost, ja que simplement requereix la preparació de les nanopartícules en solució i la seva posterior immobilització sobre el substrat corresponent. El mètode més comú per a la síntesi de nanopartícules de metalls nobles es basa en la reducció d'una sal del metall en presència d'un agent reductor/estabilitzador, que permet formar una suspensió col·loïdal d'aquest metall i que en determina la forma i la mida, i a més proporciona estabilitat a les nanopartícules²¹⁶⁻²¹⁷; però també, la utilització de nanopartícules com a llavors del creixement per tal d'obtenir nanopartícules més grans i amb diferents formes, ofereix una alternativa més versàtil que ha estat àmpliament emprada²¹⁸⁻²²².

Tot i que, s'han preparat nanopartícules amb propietats plasmòniques amb diferents metalls nobles, com l'or (Au), la plata (Ag) i el coure (Cu), la plata i l'or són els metalls més emprats. Per una banda, les nanopartícules de Ag presenten LSPR més intensos i per tant més sensibles, però la major estabilitat de l'Au ha fet que siguin les nanopartícules més emprades a l'hora de desenvolupar biosensors²²³. La immobilització d'aquestes nanopartícules sobre superfícies sòlides generalment té lloc mitjançant interaccions químiques, explotant l'elevada afinitat de l'or pels grups funcionals amino, ciano i tiol^{65-66, 224}. Encara que altres estratègies com interaccions electrostàtiques entre superfícies carregades contràriament i nanopartícules metàl·liques²²⁵ o l'ús de la interacció estreptavidina-biotina^{62, 216}, també han donat lloc a bons resultats. Finalment, tot i que

la hibridació entre cadenes d'oligonucleòtids complementàries també ha estat emprada per la immobilització de nanopartícules d'or sobre superfícies de vidre²²⁶⁻²³¹, aquestes superfícies no han estat mai emprades com a possibles transductors pel desenvolupament d'immunosensors òptics basats en el LSPR.

6.2 Resultats i Discussió

Inicialment es van preparar nanopartícules d'or de 20 nm (AuNP20) seguint el mètode de la reducció del tetracloraurat amb citrat de sodi, segons la següent reacció d'oxidació-reducció:



introduïda per Turkevich i refinada per Frens^{217, 232}. A continuació, aquestes nanopartícules foren emprades com a llavors de recreixement per a la síntesi de nanopartícules d'or de 40 nm (AuNP40), reduint en aquest cas tetracloraurat sobre les AuNP20 prèviament preparades fent ús d'hidroxilamina, seguint la següent reacció d'oxidació-reducció, però essent absolutament necessària la presència de Au⁰ per tal de que comenci la reacció:



tal i com van descobrir Brown i col·laboradors²²² i van emprar posteriorment Haiss i col·laboradors²²⁰. Ambdues solucions col·loïdals foren caracteritzades per microscòpia de transmissió electrònica, per tal de mesurar la mida experimental de nanopartícules obtingudes en ambdós casos, i per espectroscòpia d'UV-visible, per tal d'observar el pic corresponent al LSPR de les dues solucions col·loïdals (vegeu Figura 1 de l'article 5 adjunt). En aquest cas les dues solucions de nanopartícules presentaven un pic de LSPR molt proper, essent el màxim d'absorbància per a les AuNP20 a 522 nm i per a les AuNP40 a 526 nm. Val a dir, que la posició del pic de LSPR no és linearament proporcional a l'increment de la mida de les nanopartícules, variant molt poc per nanopartícules d'entre 15 i 40 nm, mentre que per a nanopartícules d'entre 50 nm i 120 nm, s'observa una relació exponencial entre el desplaçament en la posició del LSPR cap a longituds d'ona més altes i l'augment en la mida de la nanopartícula²²⁰. Malgrat això, com a prova de concepte, vàrem decidir seguir endavant amb les partícules de 20 i 40 nm, per la facilitat de la seva preparació i conservació en solució col·loïdal.

A continuació, aquestes nanopartícules foren conjugades cada una d'elles a dues cadenes d'oligonucleòtids a través de grups tiols als extrems 5', tal i com ha estat descrit prèviament en la literatura per Taton²³³ i Hill²³⁴ (veure la secció de materials i mètodes de l'article 5 adjunt). Una de les cadenes, anomenada N_xup-SH, serviria per immobilitzar de forma selectiva les nanopartícules sobre el *microarray* d'ADN mitjançant la hibridació amb la cadena complementària N_xdown, prèviament immobilitzada en diferents *spots* (N₃down-NH₂ per a les AuNP20 i N₄down-NH₂ per a

les AuNP40, i l'altra cadena anomenada $N_y\text{down-SH}$, serviria per capturar el corresponent conjugat haptè- $N_x\text{up}$, el qual variaria en funció de l'analit que es volgués detectar (vegeu esquema en la Figura 6.2).

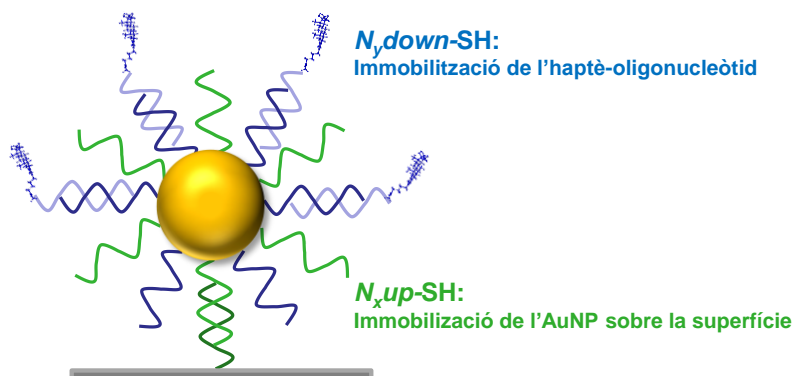


Figura 6.2: Representació esquemàtica de les diferents funcionalitats de les nanopartícules biohíbrides multimodals.

Concretament en aquest treball, inicialment es varen emprar les AuNP20 amb els immunoreactius específics per la detecció de ST, $N_1\text{down}/8\text{-}N_1\text{up}/\text{As147}$, per tal de demostrar la viabilitat de l'aproximació, i tot seguit s'empraren les AuNP40 amb els immunoreactius específics per la detecció de THG, $N_2\text{down}/\text{hG-}N_2\text{up}/\text{As170}$, per tal de demostrar la possibilitat de detectar simultàniament dues substàncies emprant les superfícies nanoestructurades amb les dues nanopartícules de diferent mida immobilitzades (vegeu taula 1 de l'article adjunt per informació addicional relativa a les seqüències dels oligonucleòtids emprats en aquest treball).

Així doncs, inicialment es prepararen *microarrays* amb 5×4 *spots* (columnes x files) amb la cadena d'oligonucleòtids $N_3\text{down-NH}_2$ immobilitzada, emprant la metodologia comentada en el capítol anterior però en aquest cas fent servir superfícies de vidre derivatitzades amb grups epòxids. Val a dir que controlant la humitat i la temperatura de la cambra on té lloc la dispensació de les cadenes, vàrem ser capaços d'obtenir *spots* homogenis sobre aquestes superfícies més hidrofíliques. D'aquesta forma les cadenes d'oligonucleòtids es trobaven unides de forma covalent sobre la superfície de vidre. A continuació les AuNP20 foren biofuncionalitzades amb les cadenes $N_3\text{up-SH}$ i $N_1\text{down-SH}$, en condicions equimolars, i aquestes partícules biohíbrides multifuncionals (AuNP20- $N_3\text{up}/N_1\text{down}$) foren immobilitzades al *microarray* d'ADN a diferents concentracions. Com es pot observar en les imatges obtingudes per microscòpia d'escaneig d'electrons (SEM) de la figura 3 de l'article 5 adjunt, les AuNP20 s'immobilitzaren únicament en la superfície delimitada pels *spots*, essent pràcticament nul·la la unió no específica de nanopartícules a la part exterior dels *spots*. Per altra banda, també es pot apreciar que al disminuir la concentració de nanopartícules en la solució, la densitat de partícules immobilitzades disminueix i la distribució d'aquestes a l'interior dels *spots* era més homogènia.

A continuació, es van realitzar una sèrie d'immunoassaigs amb detecció fluorescent, per tal de comprovar que les superfícies nanoestructurades, creades després d'immobilitzar el conjugat AuNP20-N₃up/N₁down, eren biofuncionals. Simultàniament es realitzaren dos controls per demostrar l'especificitat de cada etapa, per una banda es va preparar un conjugat d'or, AuNP20-N₁down, que no contenia la cadena d'oligonucleòtids necessària per la immobilització de les nanopartícules en la superfície, per tal de demostrar que la immobilització de les AuNP20 era selectiva i no deguda a unions no específiques, i per l'altra banda, es va afegir el conjugat 13-N₃up (haptè 13 de Boldenona), seguit de l'As138 (anticòs anti-Boldenona), per tal de demostrar que en els *spots* hi havia immobilitzada la cadena N₃down-NH₂. Per tal de realitzar l'immunoassaig en els *microarrays* on prèviament s'havien afegit les nanopartícules biohíbrides AuNP20-N₃up/N₁down i AuNP20-N₁down, s'afegí en primer lloc el conjugat 8-N₁up, seguit de l'As147, i en tots els casos, fou necessària l'addició d'una anti-IgG-TRITC per tal de poder realitzar la mesura fluorescent (vegeu l'esquema en la Figura 6.3).

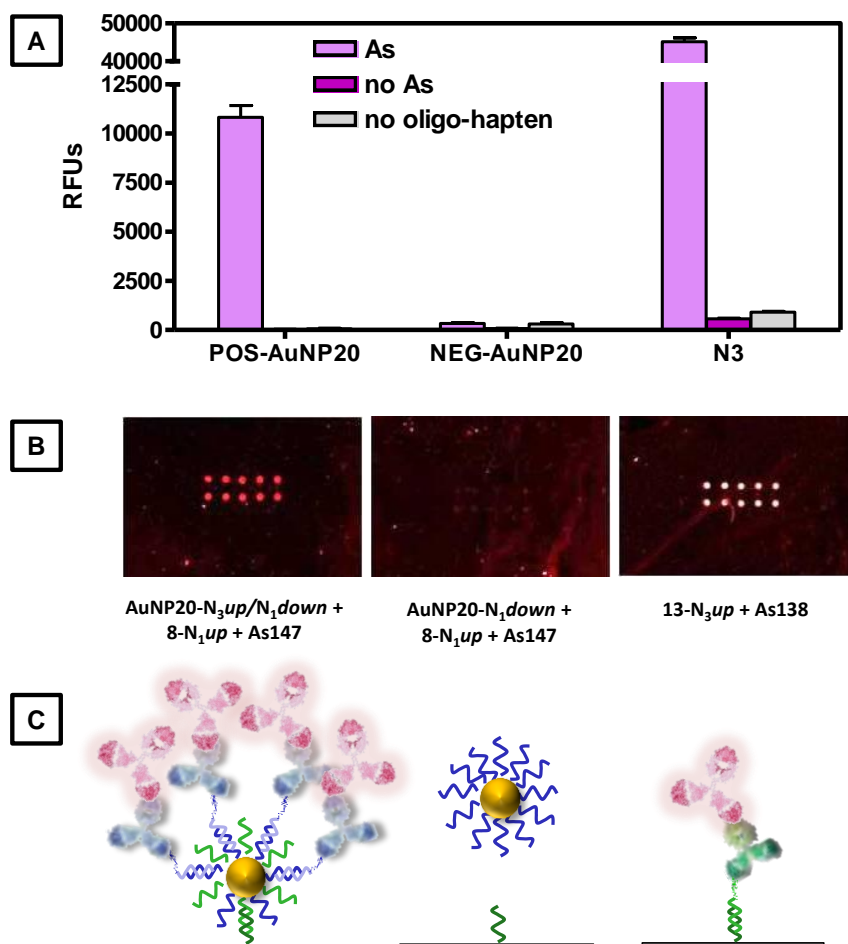


Figura 6.3: Avaluació fluorescent de la selectivitat de la immobilització del conjugat AuNP20-N₃up/N₁down i de la biofuncionalitat de les superfícies nanoestructurades creades. A) Gràfica on es mostra el senyal fluorescent, en unitats de fluorescència relatives (RFU), obtingut en cada cas. B) Imatges obtingudes amb el escàner de fluorescència, a on es pot observar les matrius de 5x2 *spots* (columnes x files) emprades per aquest estudi. C) Esquema dels reactius emprats en cada cas.

Com es pot veure en la Figura 6.3, en primer lloc quedà demostrat que la cadena N_3down es trobava immobilitzada en els *spots*, ja que s'observà fluorescència en aquells *spots* on s'havien afegit el conjugat 13- N_3up i l'As138, com a control. En segon lloc, que la immobilització de les AuNP20 havia tingut lloc de forma selectiva, ja que no s'observà pràcticament senyal fluorescent en aquells *spots* a on s'havia afegit el conjugat AuNP20- N_1down , essent per tant la immobilització de les nanopartícules únicament possible en presència de la cadena N_3up . I en tercer lloc, que després d'haver estat immobilitzat el conjugat AuNP20- N_3up/N_1down , la superfície nanoestructurada creada continuava sent biofuncional i podia ser emprada per la immunodetecció de l'analit corresponent, ja que el senyal als *spots* a on s'havien immobilitzat les nanopartícules biohíbrides, i a continuació s'havia afegit el bioconjugat 8- N_1up i l'As147 era molt clara.

Així doncs, després de demostrar l'estratègia amb les AuNP20, el següent pas va consistir en demostrar la possibilitat de crear simultàniament superfícies nanoestructurades amb nanopartícules de dues mides diferents fent ús de l'estratègia DDI. D'entrada es prepararen *microarrays* amb 5x2 *spots* amb la cadena $N_3down-NH_2$ i 5x2 *spots* amb la cadena $N_4down-NH_2$. Seguidament, les AuNP40 foren conjugades a les cadenes N_4up-SH i $N_2down-SH$, tal i com s'havia fet anteriorment amb les nanopartícules de 20 nm, i a continuació, solucions que contenien mescles de les dues nanopartícules biohíbrides, AuNP20- N_3up/N_1down i AuNP40- N_4up/N_2down , foren afegides sobre els *microarrays*. Com es pot observar en les imatges obtingudes per SEM de la figura 5 de l'article adjunt, cada conjugat era immobilitzat únicament en aquells *spots* on la cadena complementària havia estat immobilitzada prèviament, obtenint superfícies nanoestructurades ben diferenciades amb dos mides diferents de nanopartícules.

La biofuncionalitat d'aquestes superfícies fou avaluada mitjançant immunoassaigs fluorescents. En aquest cas, solucions amb els bioconjugats 8- N_1up (ST) i hG- N_2up (THG) foren afegides sobre els *microarrays* amb les nanopartícules biohíbrides d'or prèviament immobilitzades, seguit de solucions amb els As147 i As170, respectivament. Igual que abans, es realitzaren els controls pertinents per tal de comprovar que les cadenes N_3down i N_4down es trobaven immobilitzades en els *spots* corresponents, afegint en el primer cas el conjugat 13- N_3up seguit de l'As138 i en el segon cas el conjugat FQ- N_4up (oligonucleòtid N_4up conjugat a un haptè de fluoroquinolona) seguit de l'As172, selectiu per a fluoroquinolones. A la Taula 6.1 podeu trobar un sumari dels bioreactius emprats en aquest experiment. En tots els casos fou afegida al final una solució d'anti-IgG-TRITC per tal de poder realitzar la mesura fluorescent.

Taula 6.1: Llistat de tots els bioreactius emprats en els aquest treball.

Analit/Control	Microarray d'ADN	AuNP-ADN		Haptè-Oligo	As
ST	$N_3down-NH_2$	N_3up-SH	$N_1down-SH$	8- N_1up	As147
THG	$N_4down-NH_2$	N_4up-SH	$N_2down-SH$	hG- N_2up	As170

Control N ₃	N ₃ down-NH ₂			13-N ₃ up	As138
Control N ₄	N ₄ down-NH ₂			FQ-N ₄ up	As172

Com s'observa en la Figura 6.4, els resultats demostraren una vegada més que les cadenes N₃down i N₄down es trobaven immobilitzades en els *spots* corresponents i que no presentaven problemes d'hibridacions creuades. També es va comprovar que les superfícies nanoestructurades eren biofuncionals i específiques pels respectius analits, ja que en cada cas només s'observà senyal fluorescent en els *spots* corresponents a un dels analit, i no en els *spots* específics per a l'altra analit.

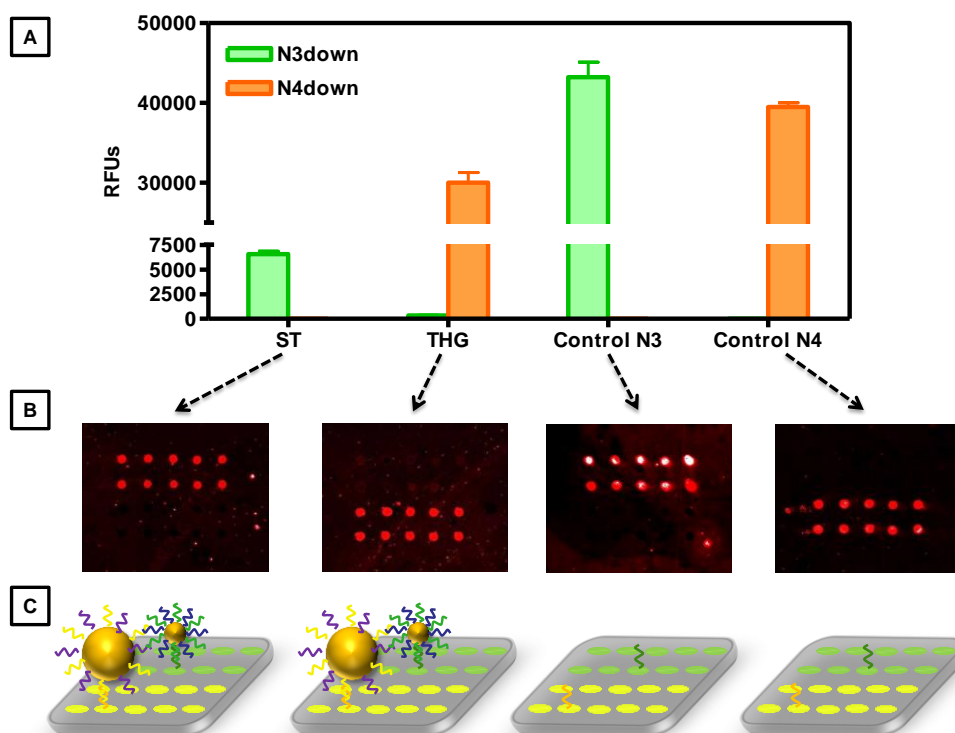


Figura 6.4: Avaluació fluorescent de la selectivitat de la immobilització dels conjugats AuNP20-N₃up/N₁down i AuNP40-N₄up/N₂down i de la biofuncionalitat de les superfícies nanoestructurades creades. A) Gràfica on es mostra el senyal fluorescent, en unitats de fluorescència relatives (RFU), obtingut en cada cas. B) Imatges obtingudes amb el escàner de fluorescència, a on es pot observar les matrius de 5x2 *spots* N₃down i 5x2 *spots* de N₄down, emprades per aquest estudi. C) Esquema de la superfícies emprades per aquest estudi.

El següent pas fou emprar aquestes superfícies per a la detecció simultània de ST i THG, fent ús de solucions amb diferents concentracions dels dos analits amb una relació 1:1. Com es pot veure en la figura 7 de l'article 5 adjunt, les corbes de calibratge obtingudes emprant com a plataforma d'assaig aquestes superfícies nanoestructurades, presentaven límits de detecció de 0.71 µg L⁻¹ (ST) i 0.13 µg L⁻¹ (THG), comparables als valors obtinguts en l'anàlisi d'aquests analits en l'assaig ELISA multianalit (vegeu l'apartat 3.2.2) i en el *microarray* fluorescent (vegeu l'apartat 5.2.3), prèviament desenvolupats en aquesta tesi. Això reafirmava que era possible l'ús d'aquestes superfícies per a la detecció simultània de ST i THG, per tant, el següent pas era el de comprovar

si la seva detecció també era possible, emprant les propietats plasmòniques d'aquestes superfícies, enlloc de emprant un anticòs secundari marcat amb un fluoròfor orgànic.

Per demostrar això, calia observar un canvi en la posició del màxim del pic del plasmó ressonant d'aquestes superfícies nanoestructurades, degut als diferents processos de reconeixement biomolecular que tinguessin lloc en la seva superfície. En aquest sentit es va estudiar en primer lloc la detecció de ST de forma individual. Concretament, s'afegiren en diferents zones de la superfície els immunoreactius en diferents etapes, emprant períodes d'incubació de 30 min per a cada una d'elles. Finalment les superfícies foren rentades i en sec es mesurà la posició del pic de LSPR per a les diferents zones, emprant un microscopi de camp fosc acoblat a través d'una fibra òptica a un espectrofotòmetre (vegeu la Figura 6.5).

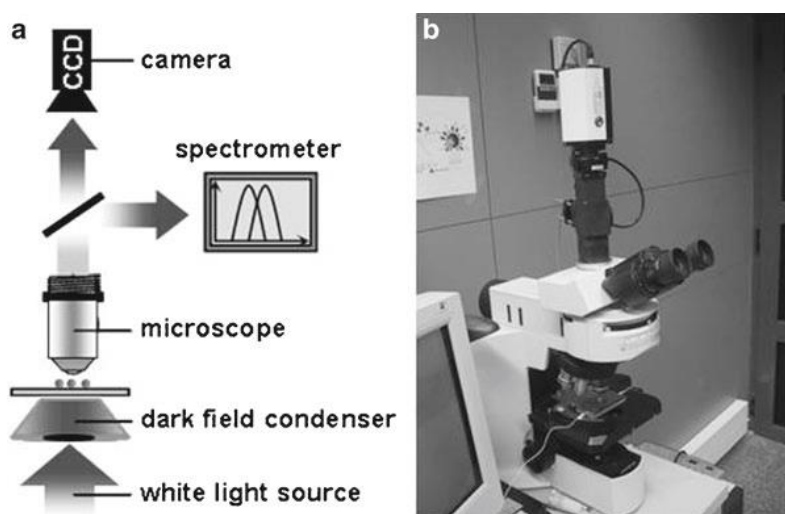


Figura 6.5: (a) Representació esquemàtica del sistema de mesura emprat i (b) imatge real²³⁵.

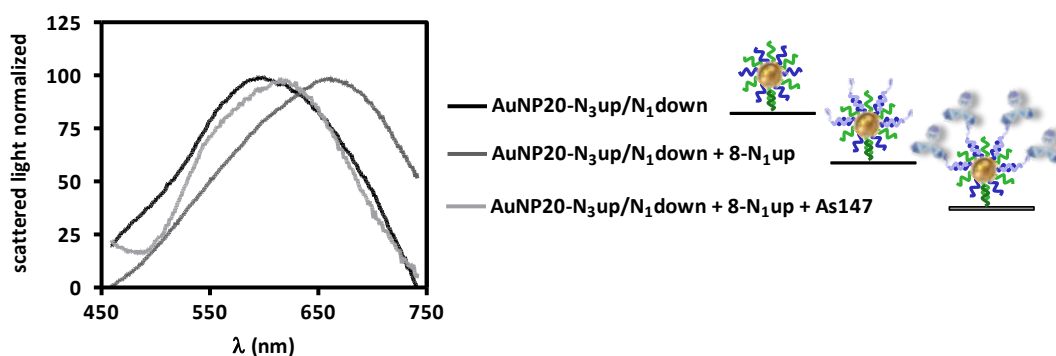


Figura 6.6: Desplaçament del pic de LSPR de les superfícies amb les AuNP20 immobilitzades degut a la hibridació de l'haptè-oligonucleòtid i al seu posterior reconeixement per part de l'anticòs corresponent.

Com es pot veure en la Figura 6.6, es mesurà la posició del pic de LSPR de tres zones de la superfície nanoestructurada: a) una zona que només tingués les AuNP20 immobilitzades, b) una zona en la que s'havia afegit el corresponent conjugat haptè-oligonucleòtid, i c) una zona en la que després d'afegir el conjugat haptè-oligonucleòtid també s'havia afegit el corresponent As. Els resultats (vegeu Figura 6.6) mostraren que quan s'afegia el conjugat 8-N₁up (ST) sobre la

superfície amb les nanopartícules biohíbrides de 20 nm prèviament immobilitzades, es produïa un desplaçament del pic LSPR cap a λ més grans (conegut com a *red-shift*) degut a la hibridació de les cadenes d'oligonucleòtids complementàries. Val a dir que aquesta seria considerada la situació inicial de l'immunosensor per a la detecció de molècules de baix pes molecular. Per contra, quan en una zona amb el conjugat 8-N₁up immobilitzat s'hi afegia l'antisèrum corresponent As147, s'observava un desplaçament cap a longituds d'ona més baixes (conegut com a *blue-shift*) degut al reconeixement dels haptens per part dels anticossos específics.

D'igual forma, fent servir les mateixes superfícies nanoestructurades amb les AuNP20 immobilitzades i posteriorment el conjugat 8-N₁up hibridat, es realitzà un assaig competitiu incubant solucions amb diferents concentracions de ST conjuntament amb l'As147. Tal i com s'observa en el gràfic de barres de la Figura 6.7, a mesura que la concentració de ST disminuïa major era el canvi en la posició del pic de LSPR, ja que major era el nombre de molècules d'anticòs que s'unien a la superfície. Els resultats preliminars obtinguts fins el moment semblen indicar que un immunosensor basat en la LSPR que emprés aquestes superfícies nanoestructurades, podria permetre detectar ST a concentracions significativament baixes (~ 0.3 nM: $0.09 \mu\text{g L}^{-1}$), estant en consonància amb els requeriments de la WADA.

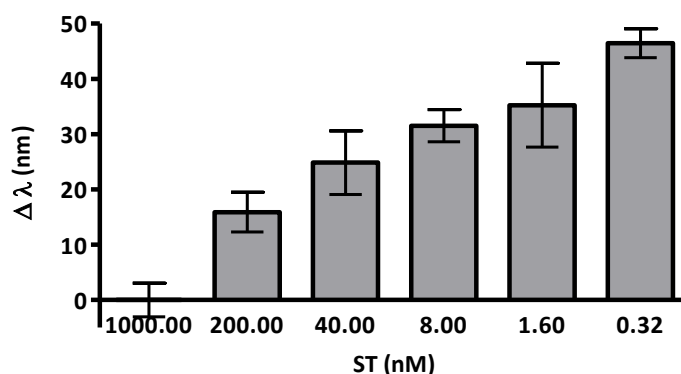


Figura 6.7: Diagrama de barres on es mostra el canvi produït en la posició del pic de LSPR a diferents concentracions de ST.

A continuació, amb la mateixa finalitat superfícies amb les dues classes de nanopartícules immobilitzades i amb els corresponents conjugats haptè-oligonucleòtid específicament hibridats, foren exposades a solucions de concentració molt elevada (1000 nM) de cadascun dels analits, conjuntament amb el corresponent As específics, per separat. Com es pot observar en la figura 8 de l'article, en ambdós casos, s'observà un desplaçament cap a longituds d'ona més baixes a menor concentració d'analit, ja que això suposava una major unió de l'As respectiu sobre la superfície. Com ja s'ha comentat anteriorment pel cas del ST, cal recordar que la posició inicial del pic de LSPR per a les dues classes de nanoestructures no era el corresponent al que podrien tenir les nanopartícules aïllades, sinó que es trobava desplaçat a λ més altes; cal tenir en compte que

aquestes nanopartícules estaven rodejades de cadenes d'oligonucleòtids carregades negativament, i que això segurament afectava l'índex de refracció de la interfase provocant el desplaçament en la posició del pic de LSPR.

Amb aquest treball es demostra que és possible la utilització de l'estratègia DDI per generar superfícies amb propietats plasmòniques, i que podrien ser emprades per la multidetecció. En aquest cas, i tal com era d'esperar, la separació dels pics ressonants de les dues nanopartícules emprades no era suficientment gran, per tant la identificació del analit tindria lloc a través d'una codificació espacial. Es per això que s'han utilitzat dos oligonucleòtids diferents per a la immobilització de cadascuna de les nanopartícules (N_3 down i N_4 down) i que aquestes s'han biofuncionalitzat amb els oligonucleòtids complementaris corresponents. No obstant, en cas d'emprar nanopartícules amb pics de LSPR més diferents entre ells, ja sigui degut a l'ús de diferents metalls, diferents mides o diferents formes, la multidetecció podria ser possible en base a una codificació no planar i d'acord amb la freqüència del pic ressonant. Per altra banda, l'ús de nanopartícules més grans, o de materials amb pics de LSPR més intensos també podrien facilitar el desenvolupament d'aquest tipus de plataformes en futurs treballs.

Finalment, voldríem mencionar que cal tenir cura amb les condicions de treball per tal d'obtenir mesures robustes. Un fenomen observat al realitzar les mesures de LSPR, fou que quedaven restes de les sals dels tampons emprats en l'assaig al assecar la superfície, i aquestes al interaccionar amb la llum, emmascaraven el senyal produït per les nanoestructures alterant el resultat final. Un altre problema que ens vam trobar fou que al rentar les superfícies amb aigua per tal de que quedessin completament netes al final de l'assaig, les nanopartícules desapareixien degut a la deshibridació de les cadenes d'oligonucleòtids. Aquest problema es va solucionar gràcies a fonts bibliogràfiques, fent ús d'un tampó 0.3M d'acetat d'amoni, pH 7.0²³⁶, que deixava les superfícies de vidre netes sense afectar la hibridació de les cadenes d'oligonucleòtids. Una opció que podria ser estudiada en un futur per tal de regenerar les superfícies nanoestructurades, seria la d'emprar derivats sintètics de l'ADN com per exemple, els àcids peptidonucleics (PNAs) sobre el *microarray* per tal d'immobilitzar els conjugats AuNP-ADN. En els PNAs la cadena negativa sucre-fosfat és reemplaçada per unitats repetides de N-(2-aminoetil)-glicina unides per enllaços amida. Els àcids peptidonucleics també poden formar dúplexs amb cadenes complementàries d'ADN i en comparació amb els dúplexs d'ADN, els dúplexs híbrids mostren una major estabilitat tèrmica i es poden formar en condicions de baixa força iònica^{197,237}, per tant controlant aquests paràmetres, es podria deshibridar els conjugats haptè-oligonucleòtid mantenint les nanopartícules immobilitzades en la superfície.

6.2.1 Publicació relacionada

6.2.1.1 **Article 5: Preparation of multiplexed plasmonic nanostructured surfaces by assembling DNA-Gold biohybrid nanoparticles.** *N. Tort, J.P. Salvador and M.P. Marco. (Pendent de publicar)*

Resum de l'article: En aquest treball han estat desenvolupades superfícies nanoestructurades mitjançant la immobilització de nanopartícules d'or biohíbrides i multifuncionals a través de l'estratègia DDI. Nanopartícules d'or (AuNP) de diferents mides, i per tant, amb diferent pic LSPR, han estat funcionalitzades cada una d'elles amb dues cadenes d'oligonucleòtids diferents. Una de les cadenes ha estat introduïda per tal de dirigir la nanopartícula sobre la superfície e immobilitzar-la en unes zones discretes i determinades, mentre que l'altra cadena serveix per introduir la molècula necessària per realitzar l'assaig emprant una sonda prèviament sintetitzada. En aquest cas en concret, s'han emprat conjugats haptè-oligonucleòtid per a la detecció d'hormones anabolitzants en condicions de competència. La selectivitat de la immobilització ha estat demostrada per SEM, mentre que la biofuncionalitat de les superfícies ha estat posada de manifest mitjançant immunoassaigs fluorescents en format *microarray*. Resultats preliminars mostren que aquestes superfícies podrien ser emprades com a transductors en immunosensors de LSPR per a la multidetecció de molècules de baix pes molecular.

Preparation of Multiplexed Plasmonic Nanostructured Surfaces by Assembling DNA-Gold Biohybrid Nanoparticles

Nuria Tort^{1,2}, J.-Pablo Salvador^{2,1} and M.-Pilar Marco^{1,2}*

¹Applied Molecular Receptors group (AMRg), IQAC-CSIC.

²CIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN)

Jordi Girona 18-26, 08034-Barcelona, Spain

ABSTRACT

Nobel metal nanostructured surfaces suitable for multiplexed localized-surface plasmon resonance (LSPR) biosensing have been created by DNA-directed immobilization (DDI) of two distinct multimodal biohybrid gold nanoprobles. Gold nanoparticles (AuNP) of distinct sizes, and therefore showing distinct resonant peaks (RP), have been functionalized each of them with two different single stranded-DNA (ssDNA) chains. One of the ssDNA chains, was specifically designed to address each AuNP to distinct and defined spots of a DNA microarray, that contained the complementary ssDNA strands. The second ssDNA chain was used to introduce the specific biomolecule required to perform the assay, using a pre-synthesized complementary bioconjugate. For instance, in this case oligonucleotide probes with complementary sequences to distinct steroid hapten-oligonucleotide bioconjugates have been used to detect anabolic androgenic steroids under competitive conditions using these nanostructured surfaces. Scanning electron microscopy (SEM) has been used to demonstrate the selective immobilization of each AuNP onto the surface, and, fluorescent immunoassays have been performed to demonstrate the functionality and these surfaces. Preliminary data show that these nanostructured surfaces could be used as transducers in LSPR immunosensors to detect small molecular weight analytes, such as anabolic androgenic steroids. The results presented here open the door for an easy way to construct site-encoded multiplexed plasmonic chips, combining the DDI strategy with multimodal biohybrid nobel metal nanoparticles.

KEYWORDS: Gold Nanoparticles-DNA conjugates, oligonucleotide bioconjugates, DNA-directed Immobilization (DDI), Localized surface plasmon resonance (LSPR), Multiplexed biosensor, Fluorescent Microarray, Anabolic-Androgenic Steroids (AAS)

In the last decade, an increased knowledge in nanoscience has triggered the interest for the application of nanoparticles in bioanalytical techniques and biosensors. The main purpose has been the enhancement of the response of already established optical or electrochemical transducers¹⁻²,

but also to develop new transducers with improved features based on the properties of the materials at nanolevel³⁻⁹. Nanoparticle-based optical biosensors, like those based on the localized surface plasmon resonance (LSPR) principle, have been proven to be suitable for the quantitative detection of chemical and biological targets¹⁰⁻¹⁴. LSPR is an optical phenomenon generated when an incident photon or electromagnetic field interacts with a metal nanoparticle producing the collective oscillation of the conduction electrons at their surface at a particular frequency known as resonant peak (RP)¹⁵. When these nanostructures interact with a light beam, part of the incident photons are absorbed and part are scattered in different directions. Consequently, optical spectroscopy is the simplest method to detect the LSPR on metal nanostructures¹². The LSPR spectral position is highly dependent on the composition, size or shape of the nanoparticles, as well as the refractive index of the dielectric medium and the spacing between them¹⁶⁻¹⁷. Thus, LSPR biosensors based on the change in the refractive index of the surrounding media induced by biomolecular interactions at the surface of these nanostructures can be developed. Furthermore, multiplexed detection can be accomplished by combining simultaneously nanoparticles of different sizes (30-120 nm), shapes (nanospheres, nanorods, nanocages, nanostars, etc.) or materials (solid nanoparticles (Au, Ag, Cu, etc), nanoshells or alloys (Au-Ag)) (see reviews^{6, 18-21}).

Multiplexed LSPR sensing can be accomplished in solution²² or through the construction of nanostructured surfaces, although only few examples have been reported in the literature²³. One of the limitations is the fabrication of noble metal nanostructures in a reproducible and homogeneous way. Typical materials for plasmonic applications are noble metals, especially silver and gold; despite silver displays more intense LSPR bands than gold, the higher chemical stability of gold nanostructures has favoured its preferential application for biosensing⁴. In principle *bottom-up* and *top-down* approaches can be used²⁴; in the *top-down* approximation, advanced lithographic techniques like electron beam lithography (EBL)²⁵ or focused ion beam (FIB)²⁶ permit the fabrication of metal nanostructures with accurate control of size, shape and spatial distribution. However, these techniques are expensive and the patterned regions are small, which limits their use during development and, raises the cost of potential commercial sensing devices based on those types of nanostructures. Nanosphere lithography (NSL) is a less expensive alternative to construct such type of nanostructured surfaces²⁷⁻³⁰, although the cost of the equipment is still high. Noble metal nanoparticles are commonly created by chemical reduction of the metal salt in presence of a stabilizer which limits the growth of the particles, directs their shape and provides colloidal stability³¹⁻³³; but also, seeded growth has proven to be much more versatile in terms of size and shape control³⁴⁻³⁵. Using the *bottom-up* approach, nanoparticles with different composition, size and shape can be easily synthesized, and then, immobilized onto solid supports through different chemistries, such as i) electrostatic interactions, using proteins or polyelectrolytes adsorbed on the nanoparticles surface¹⁴, ii) high affinity interactions, like the existing between biotin and

streptavidin³⁶⁻³⁷ or iii) exploiting the high affinity of gold and silver colloids towards amino or mercapto functional groups, present on glass surfaces upon silanization^{10, 17, 36, 38}. Some years ago, we reported the development of a LSPR biosensor^{13, 38} based on the chemical immobilization of AuNP on a (NH₂ and SH) silanized glass surfaces, but multiplexation was not achieved.

DNA-directed immobilization (DDI), based on the self-organizing capabilities and the highly specificity of the DNA hybridization, allows the immobilization of potentially any type of biomolecule onto a DNA-biofunctionalized surface. Thus, we have recently reported the use of a DNA-microarray to prepare a multiplexed hapten-microarray by the hybridization of hapten-oligonucleotide probes with complementary ssDNA strands immobilized on distinct spots of the microarray³⁹. The conjugation of thiolated ssDNA to gold nanoparticles through the covalent interaction thiol/Au has been largely reported⁴⁰⁻⁴⁷. However, few examples in the literature have used the DNA-directed immobilization strategy to immobilize noble metal nanoparticles onto solid supports to create nanostructured surfaces⁴⁸⁻⁵¹ and never those surfaces have been used for sensing purposes.

Here we report for the first time, the development of a LSPR biosensor chip based on the construction of homogenous and biofunctional nanostructured surfaces using the high specificity of the DNA hybridization to address multimodal biofunctional AuNPs of different sizes to predefined positions on a DNA microarray. As a proof of concept, we have used these chips to detect Anabolic Androgenic Steroids (AAS) for which immunoreagents available in our laboratory had been already validated^{39, 52-55}.

RESULTS AND DISCUSSION

Gold nanoparticles (AuNPs) were prepared by the citrate reduction method introduced by Turkevich et al.^{31, 56} and refined by Frens³³ to obtain particles of a mean size of 18.8 ± 2.4 nm (AuNP20) (n=50, 13% dispersion) according to TEM analysis. A concentration of $7 \cdot 10^{11}$ AuNP mL⁻¹ was estimated considering the initial amount of Au ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) and assuming a quantitative reduction ($\text{Au}^{3+} \rightarrow \text{Au}^0$). These nanoparticles were at the same time used as seeds to prepare AuNPs of about 40 nm (AuNP40) size following the N-hydroxylamine reduction method developed by Brown et al.³⁴ and also employed by Haiss et al.³⁵. In this procedure, additional Au³⁺ is reduced at room temperature on the surface of the seeds increasing their diameter. A mean size of 40.3 ± 3.3 nm (n=50, 8 % dispersion) was obtained according to TEM analysis. The concentration of nanoparticles of the obtained solution was $7 \cdot 10^{10}$ AuNP mL⁻¹. The UV-vis absorption spectra and TEM pictures of both particles are shown in Figure 1.

Multimodal biohybrid nanoparticles were designed considering *i*) the necessity to address the particles selectively onto defined spots of the surface, previously prepared by immobilizing

complementary ssDNA strands, and *ii*) the fact that these particles had to include a second functionality related to the sensing goal. As proof-of concept, in this study we focused on the detection of AAS, a particular family of steroids used illegally as doping agents in sportive competitions to improve athletic performance, and as growth-promoters in farms to increase meat production. Immunochemical determination of AAS takes place under competitive configurations due to their small molecular size. Previously, we already demonstrated the possibility to simultaneously quantify AAS on a multiplexed ELISA⁵⁷ and on a hapten microarray created on a glass surface using hapten-oligonucleotide probes as competitors immobilized onto the surface by DDI³⁹. Thus, in this case, we followed the same approach, attempting to immobilize those hapten-oligonucleotide probes on the AuNPs surface through the hybridization with the complementary ssDNA chain to obtain a multifunctional hapten biofunctionalized nanostructured surface. Therefore, two different oligonucleotides strands *per* nanoparticle were designed and synthesized with the necessary SH functionality to bind them to the AuNP, particularly, N_xupSH and $N_ydownSH$ (where, N_x or N_y , means a particular oligonucleotide sequence, and the term *up* or *down*, is used to describe the relative position on the hybridization event, see Figure 2). N_xupSH , is complementary to the oligonucleotide strand ($N_xdownNH_2$) previously immobilized on the spots of the glass surface (DNA microarray), and $N_ydownSH$, is complementary to the corresponding hapten- N_yup bioconjugate. In this study, we selected stanozolol (ST) and tetrahydrogestrinone (THG) as model targets; the hapten-oligonucleotide probe of the first one (8- N_1up) was addressed to biofunctionalize the AuNP20 (gold nanoparticles of 20 nm size), while the hapten-oligonucleotide probe of the second one (hG- N_2up) was used for the AuNP40 (gold nanoparticles of 40 nm size). As it is shown in Figure 2, for the AuNP20 two types of biohybrid nanoparticles were prepared, one called *positive*, because contained both strands (N_3upSH and $N_1downSH$) and the other called *negative*, because only contained one of the strands ($N_1downSH$), while for the AuNP40 nm, only a *positive* multifunctional biohybrid nanoparticle was prepared (N_4upSH and $N_2downSH$).

On a first instance, AuNP20-DNA biohybrid nanoparticles were used to demonstrate the viability of the immobilization approach by SEM. For this purpose, solutions of distinct concentrations of AuNP20- N_3up/N_1down were added to microarrays (5x4, columns x rows) spotted with $N_3downNH_2$ on a previously silanized glass slide. The SEM images in Figure 3 show that immobilization only occurred on those spots where the complementary strand ($N_3downNH_2$) had been previously immobilized, and no unspecific adsorption was observed outside the spots (see Figure 3, A and B). Moreover, the particle density was clearly dependent on the concentration of the nanoparticles solution, and the distribution became more homogeneous as lower was the concentration (see Figure 3, C). The biofunctionality of these nanostructured surfaces was assessed, by hybridizing these nanostructures with the ST hapten-oligonucleotide bioconjugate 8- N_1up and running a non-competitive fluorescent immunoassay with anti- ST (As147) followed by the anti-IgG-TRITC

bioconjugate. In this case, both, *positive* and *negative* AuNP20-DNA conjugates were added to different positions of the slide. Similarly, a positive control (N3) to probe the correct immobilization of $N_3\text{downNH}_2$ on the slide was run, using in this case a complementary boldenone (B) hapten-oligonucleotide bioconjugate, 13- $N_3\text{up}$ and the B specific antiserum, As138. As can be observed in Figure 4, fluorescence was only observed in those spots where *positive* AuNP20-DNA nanoparticles and the positive control (N3) had been added, while no signal was recorded on the arrays where *negative* AuNP20-DNA nanoparticles had been added. These experiments confirmed the selective immobilization of the AuNP20- $N_3\text{up}/N_1\text{down}$ through DDI on the glass microarray substrate.

The next goal was to probe the possibility to develop nanostructured surfaces for multiplexed detection employing DDI and nanoparticles of different sizes. For this purpose, solutions containing a mixture of both conjugates, AuNP20- $N_3\text{up}/N_1\text{down}$ and AuNP40- $N_4\text{up}/N_2\text{down}$ were added to a glass slide with 5x4 spots microarrays, but in which 5x2 had been spotted with $N_3\text{downNH}_2$ and 5x2 with $N_4\text{downNH}_2$ (see Figure 5). The SEM images could confirm that each biohybrid nanoparticle was immobilized on their specific location of the microarray and that no cross-hybridization phenomena had taken place. As before, the biofunctionality of these substrates containing multifunctional gold nanoparticles of different sizes (AuNP20 and AuNP40) was assessed by fluorescence immunoassay by adding the hapten-oligonucleotide probes, ST 8- $N_1\text{up}$ and THG hG- $N_2\text{up}$, separately to distinct microarrays, followed by the corresponding specific antisera (As147 and, anti-THG, As170) and anti-IgG-TRITC. In parallel, and as before, positive controls were run to check the correct immobilization of the capture oligonucleotides on the slide: control N3, for $N_3\text{downNH}_2$ (followed by 13- $N_3\text{up}$ and As138), and control N4, for $N_4\text{downNH}_2$ (followed by FQ- $N_4\text{up}$ and anti-FQ antiserum, As172) (see Table 2). The results demonstrated that the nanostructured chip created by DDI, containing two types of nanoparticles, was biofunctional and that the response was completely selective (Figure 6, A). Thus, both SEM and fluorescence immunoassays showed that each biohybrid nanoparticle (AuNP20- $N_3\text{up}/N_1\text{down}$ and AuNP40- $N_4\text{up}/N_2\text{down}$) was specifically hybridized with its complementary capture strand $N_3\text{downNH}_2$ and $N_4\text{downNH}_2$, respectively) and responded to the presence of specific antibodies (see Figure 6, B). Moreover, each of these chips could be used to quantify AAS as demonstrated by adding to multifunctional hapten biofunctionalized nanostructured surfaces standard solutions containing a 1:1 mixture of the target analytes (ST and THG) at different concentrations and running the fluorescent immunoassay. Figure 7 shows the calibration curves obtained for ST and THG employing these multifunctional nanostructured surfaces. In both cases, the detectability values achieved were in compliance with the minimum required performance limits (MRPLs) established by the World Anti-doping Agency (WADA), and were comparable to the detectability values

obtained by our group using these immunoreagents in other formats (microplate-based ELISA⁵³⁻⁵⁵ and fluorescent microarray immunoassay³⁹).

Finally, we attempted to demonstrate the capability of these DDI-created multifunctional nanostructured surfaces for LSPR biosensing. With that purpose, multifunctional hapten biofunctionalized nanostructured chips prepared by hybridization of the nanostructured surface with the hapten-oligonucleotide probes, were exposed to samples with zero concentration of analyte (maximum antibody binding to the chip) and to samples with a high concentration of analyte (1000 nM for each one, to have a complete inhibition of the binding of the specific antibody to the surface) and the LSPR spectra were recorded. A shift of around 20-30 nm of the LSPR peak was observed due to the binding of each specific antibody to the corresponding position in the nanostructured chip, for both analytes (see Figure 8). It has to be noticed, that the off-set of LSPR peak, is the AuNP hybridized with the corresponding hapten-oligonucleotides (high negative charge around the AuNP surface). This might explain the blue-shift observed as a result of the binding of the antibodies to the surface (at zero concentration of analyte), instead of a red-shift usually produced when a protein binds to nanostructured surfaces^{13, 58}. However, in both cases, the LSPR peak was red-shifted regarding the LSPR peak of the bared gold nanoparticles (from 522 to 530 nm, approximately).

The results shown in this paper are just a demonstration of the potential of DDI to develop such kind of label-free optical biosensors and for this purpose, we have addressed the development of a multiplexed site-encoded LSPR platform. This approach takes advantage of the well-established DNA manufacturing procedures. Thus, a DNA microarray can be easily converted on a LSPR chip, by just hybridizing the surface with the corresponding set of multimodal biohybrid nanoparticles. However, once demonstrated, it is possible to envisage the possibility to develop non-planar, instead of planar (site encoded) multiplexed platforms, since the distinct optical properties of the nanoparticles used could be sufficient to record separate LSPR signals for each target analyte.

Regarding detectability, we have already demonstrated by fluorescence that the biofunctionality of these surfaces remain very good, and that the two analytes, ST and THG, can be detected simultaneously with a very good detectability. One of the main problems found on the LSPR measurements, was related to the presence of salt residues remaining from the buffer solutions on the surfaces, which strongly scattered the light masking the scattered light from the nanoparticles. That problem was solved washing the slides with 0.3 M ammonium acetate buffer, pH 7.0⁵⁹ before the LSPR measurements, but this step could also remove the AuNP if not performed for just only few seconds. At this point, we should also mention that the intensity of the signal recorded with our

equipment using nanoparticles of 20 nm was very low. More intense and narrower peaks and consequently much better and reproducible results could be obtained using bigger nanoparticles (about 80 nm) since contribution of scattering to the extinction rapidly increase with the size⁶⁰. All these aspects have prevented from obtaining reproducible and reliable quantitative measurements of the target analytes on a competitive format by LSPR. However, the experiments performed using non-competitive formats (i.e. binding of the antibodies to the nanostructured surface) provided in all cases very clear and reproducible results. Future challenges of this research would be focused on the development of more robust LSPR biosensors and also on demonstrating the possibility to regenerate these biofunctional nanostructured surfaces. In the actual sensor configuration shown in this paper, a final washing step with distilled water would remove not only the oligonucleotide probes, but also the nanoparticles from the surface. Thus, one option to circumvent this fact could be the use of peptide nucleic acids (PNAs) instead of DNA to immobilize the biohybrid gold nanoparticles onto the surface, preparing a PNA microarray as a substrate. PNA/DNA duplexes are more stable than DNA/DNA duplexes at low salinity media⁶¹, thus, controlling the salinity of the media and the temperature it would be possible to dehybridize the hapten-oligonucleotide conjugates without removing the gold nanoparticles from the surface.

CONCLUSIONS

Nobel metal nanostructured surfaces have been created through the well-known DNA-directed immobilization strategy immobilizing biohybrid gold nanoparticles with a simple hybridization step. These surfaces have been characterized by SEM and fluorescence. The selective immobilization of AuNP-DNA conjugates of two different sizes demonstrated in this work opens the possibility of using these nanostructured surfaces for multiplexed detection in an optical sensor, not only using nanoparticles of different sizes, but using nanoparticles with different shapes or composition. Preliminary results measuring the localized surface plasmon resonance (LSPR) of these nanostructured surfaces demonstrate the possibility to develop a multiplexed label-free biosensor using the change of the resonant peak position of these AuNPs.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and Immunoreagents. The preparation of the immunoreagents for Stanazolol (ST) and Tetrahydrogestrinone (THG) used in this study have been described before⁵²⁻⁵⁴. Stanazolol was purchased from Sequoia Research Products, Ltd. (Oxford, UK). Tetrahydrogestrinone (THG) was synthesized in our laboratory⁵⁴. Stock solutions of analytes were prepared at 10mM concentration in DMSO. GenesysSIGMA supplied oligonucleotides with amine and thiol moieties (*N1down/up*, *N2down/up*, *N3down/up*, *N4down/up*). The synthesis of the hapten-oligonucleotide conjugates (*8-N1up*, *hG-N2up*, *13-N3up* and *FQ-N4up*) will be described elsewhere. The anti-rabbitIgG-TRITC

was purchased from Sigma-Aldrich®. Other chemical reagents were purchased from Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI). The O-(methyl)-O'-(2-mercaptoethyl)-hexaethylene glycol (m-PEG-SH) was supplied by Polypure. Chloroauric acid (HAuCl₄·3H₂O), trisodium citrate (Na₃C₆H₅O₇·2H₂O) and N-hydroxylamine from Sigma-Aldrich® were employed for the synthesis of gold nanoparticles (AuNPs). Glycerol and Tris Base were employed for the final suspension of the synthesized AuNP-DNA conjugates. NaN₃ was used as preservative of the final conjugates. DL-dithiothreitol (DTT) was purchased from Sigma-Aldrich®.

Buffers. PBS was 0.01 M phosphate buffer in a 0.8% saline solution (137 mmol L⁻¹ NaCl, 2.7 mmol L⁻¹ KCl), and the pH was 7.5. PBST was PBS with 0.05% Tween 20. Printing buffer consisted of 150mM sodium phosphate (pH 8.5) with 0.01% sodium dodecyl sulphate (SDS). Hybridization buffer was 10 mM TRIS, 1mM EDTA, 1M NaCl (pH 7.2). The final washing buffer was saline-sodium citrate buffer (SSC) (15 mM NaCl + 1.5 mM sodium citrate), 0.05% SDS (pH 7.5). Disulfide cleavage buffer was 170 mM phosphate buffer (pH 8.0). Final reconstitution buffer of the AuNP-DNA conjugates was 20% glycerol, 20 mM Tris base, 0.05% NaN₃. For LSPR measurements the slides were washed with 0.3M ammonium acetate, pH 7.0.

Materials and Instruments.

NAP-5 columns (Sephadex G-25) were purchased from Pharmacia Biotech. COSTAR® 96 well UV Microplates, with UV transparent flat bottom and the plain microscope slides used to prepare the microarrays were from CORNING (Tewksbury, USA). pH and conductivity values of all buffers and solutions were measured with a 540 GLP pH meter and a LF 340, conductimeter (WTW, Weilheim, Germany), respectively. *Printing:* The immobilization of the capture amine-oligonucleotides on the glass slides in spots (100 µm) was performed with a BioOdyssey Calligrapher MiniArrayer (Bio-Rad Laboratories, inc. USA). *Scanning:* Fluorescent measurements were recorded on a ScanArray® Gx PLUS (Perkin Elmer, USA) using a green laser with an optical emission filter at 543 nm with 5 µm resolution. The laser power and PMT were set to 90% and 70%, respectively. The spots were measured by F543_Mean-B543 (Mean Cy3 foreground intensity minus mean Cy3 background intensity). Fluorescence intensity values are expressed in relative fluorescence units (RFUs) as average and standard deviation of at least 10 replicate spots in three replicate wells. The competitive curves were analyzed with a four parameter logistic equation using the software SoftmaxPro v4.7 (Molecular Devices) and GraphPad Prism v 4 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). The standard curves were fitted to a four parameter equation according to the following formula: $Y = [(A - B)/1 - (x/C)^D] + B$, where *A* is the maximal fluorescence, *B* is the minimum fluorescence, *C* is the concentration producing 50% of the difference between *A* and *B* (or IC₅₀), and *D* is the slope at the inflection point of the sigmoid curve. The limit of detection (LOD) is defined as the concentration producing 90% of the maximum fluorescence (IC₉₀). The

characterization of the AuNPs was performed using a PHILIPS CM30 transmission electron microscope and a UV-vis spectrophotometer. The nanostructured surfaces were characterized using an ultra high resolution electron microscopy (NovaNano SEM 230, FEI Company) of the Nanotechnology platform in Barcelona Science Park. And the optical setup consisted of an inverted microscope (Nikon, Ti-U). The extinction spectra of the gold colloids were measured by conventional dark-field spectroscopy (Dry DF Condenser, NA=0.90-0.80). The sample illumination was performed from with halogen lamp (100 W). The light scattered by the particles was collected by an objective lens ($\times 10$ with NA = 0.3 and working distance of 1.6 mm), fiber-coupled to a multimode fiber (fiber diameter = 400 μm) and sent toward a CCD-cooled spectrometer (Shamrock SR-303i, Andor).

Synthesis of Gold Nanoparticles (AuNPs)

AuNP20 were synthesized by the citrate method following the procedure reported by Turkevich³¹,⁵⁶ and Frens³³. The AuNPs were characterized in solution, by UV-Vis spectrometry and by TEM, taking several pictures of each batch of particles. The size of these nanoparticles was assessed measuring the diameters of a significant number of nanoparticles (n=50) supplied by TEM images.

AuNP40 were synthesized as described by Brown³⁴ and Haiss³⁵, using the AuNP20 as seeds. The AuNPs were characterized as explained above.

Preparation of Biohybrid Multifunctional Nanoparticles: AuNP-DNA conjugates

The oligonucleotide sequences coupled to the gold nanoparticles of 20 nm (AuNP20) and 40 nm (AuNP40) are listed in Table 1. The coupling of the oligonucleotides to the AuNPs was carried out following the procedures described by Taton⁴⁷ and Hill⁶². First of all, the possible 5'-disulfide functionality was reduced with DL-dithiothreitol (DTT) by adding a solution of 0.1 M DTT (100 μL) in disulfide cleavage buffer to lyophilized DNA (5 nmols), kept at RT for 2-3 h and purified with a NAP-5 column. A UV-visible spectrophotometer at 260 nm was used to determine the DNA location and the concentration was calculated using the Beer's Law: $A = \epsilon \cdot c \cdot l$. Then, thiol-terminated oligonucleotides (1.25 nmols of a 1:1 mixture of $N_{1downSH}$ and N_{3upSH} for the AuNP20 and 0.5 nmols of a 1:1 mixture of $N_{2downSH}$ and N_{4upSH} for the AuNP40), were added to the corresponding gold colloidal solutions (5 mL, AuNP20: $7 \cdot 10^{11}$ nanoparticles/mL and AuNP40: $7 \cdot 10^{10}$ nanoparticles/mL). The mixtures were incubated overnight (12 h) at RT protected to the light. Multiple small additions of 1M NaCl and 0.1M phosphate buffer (PB) were performed to reach 0.1 M NaCl and 10 mM phosphate buffer concentrations, and then, the biohybrid nanoparticles were incubated for 12 h more at RT. Afterwards, the mixtures were centrifuged, and the biohybrid AuNPs (red oil) were resuspended in 1 mM m-PEG-SH (5 mL) solution for 1 h. Finally, the biohybrid AuNPs were centrifuged two times in water, and after the third

centrifugation, they were resuspended in the final reconstitution buffer (1 mL) 5 times concentrated. The biohybrid nanoparticles were stored at 4°C protected to the light until use.

Preparation of Nobel Metal Nanostructured Surfaces

Epoxy-silane activated slides were prepared in the laboratory by deeping the slides on a 10% (w/v) NaOH solution for 1h at RT, followed by a derivatization with a 2.5% (v/v) 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane (GPTMS) solution in anhydrous ethanol for 3h at RT. Then, the capture oligonucleotide chains (N_3 -down NH_2 and N_4 -down NH_2 at 200 µg/mL in printing buffer) were spotted onto the epoxy-activated slides in a controlled humidity chamber at 60% and maintained for 3h at RT. The DNA functionalized slides could be stored until use for about 1 month at 4 °C on a dry chamber. For the immobilization of the biohybrid AuNP-DNA conjugates, the printed slides were placed on a microplate microarray ArrayIt® hardware system allowing 96-well formatted experimentation with up to four glass substrate slides (Telechem International Inc.). The system is provided of a silicon gasket that demarcates 24 wells for slide. On each well, there was a microarray with a defined number of spots, depending of the experiment. Before starting, the slides were washed four times with PBST and afterwards, the biohybrid AuNP-DNA (AuNP20- N_3 up/ N_1 down, AuNP40- N_4 up- N_2 down or both) were added onto the microarray (100 uL/well) at different concentrations (from 10^{10} to 10^{12} nanoparticles/mL, depending on the conjugate and on the assay), incubated for 30 min at RT, washed and dried. Under these conditions the slides could be stored at 4 °C on a dry chamber for more than 1 month, although in most of the experiments, the slides were immediately used or the day after for the assays.

Fluorescent Microarray Immunoassay

General Protocol. A solution of the corresponding hapten-oligonucleotide bioconjugate (8- N_1 up, hG- N_2 up, 13- N_3 up or FQ- N_4 up, 1 µg/mL in hybridization buffer) was added (100 uL/well) to the corresponding wells of the slide (with the biohybrid AuNPs conjugate or just with the N_x down NH_2 oligonucleotides for the control experiments), incubated for 30 min at RT and the slide was rinsed with PBST. Then, a solution of the corresponding specific antiserum (As147, As170, As138 or As172 diluted 1/1000 in PBST) was added (100 µL/well) to the corresponding wells and incubated for 30 min at RT. Following, the slide was washed again with PBST and finally, an anti-IgG-TRITC solution (1/250 in PBST) was added (100 µL/well). After an incubation step of 30 min at RT, the slide was washed with the final washing buffer, dried with N_2 and read with the scanner.

Competitive Assay. Slides treated with the hapten-oligonucleotide conjugates (8- N_1 up and hG- N_2 up, 0.01 µg/mL in hybridization buffer, 100 µL/well) and washed as described before were used to carry out the competitive assays. Solutions of the standards (0.064-1000 nM stanozolol/tetrahydrogestrinone in PBST) were added to the wells (50 µL/well in PBST) followed

by the corresponding antiserum (As147 diluted 1/2000 and As170 diluted 1/1000 in PBST 50 μ L/well) and processed as described above.

LSPR measurements

The slides prepared and processed as described above, but without the antiIgG-TRITC step, were washed the 0.3 M ammonium acetate buffer, dried with N₂ and read with the dark-field microscope.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to acknowledge Prof. R. Eritja (IQAC-CSIC, Barcelona, Spain) for supplying some oligonucleotides employed in this work and his scientific advice, to Prof. L. Lechuga (CIN2-CSIC, Bellaterra, Barcelona, Spain) for giving us the opportunity to use a dark-field microscope from her laboratory and to Prof. Gonçal Badenes and Dr. Romain Quidant (ICFO, Castelldefells, Barcelona, Spain) for the scientific discussions on LSPR. This work has been supported by the Ministry of Science and Innovation in the frame of d-WatchArray (DEP2007-73224-C03-01) and OligoCODEs (MAT2011-29335-C03-01) projects. The AMR group is a consolidated research group (Grup de Recerca) of the Generalitat de Catalunya and has support from the Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació la Generalitat de Catalunya (expedient 2009 SGR 1343). CIBER-BBN is an initiative funded by the VI National R&D&i Plan 2008-2011, *Iniciativa Ingenio 2010*, *Consolider Program*, *CIBER Actions* and financed by the Instituto de Salud Carlos III with assistance from the *European Regional Development Fund*. Núria Tort has a FI_B fellowship from the AGAUR (*Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca*) of the (Generalitat de Catalunya) Government of Catalonia.

FIGURES

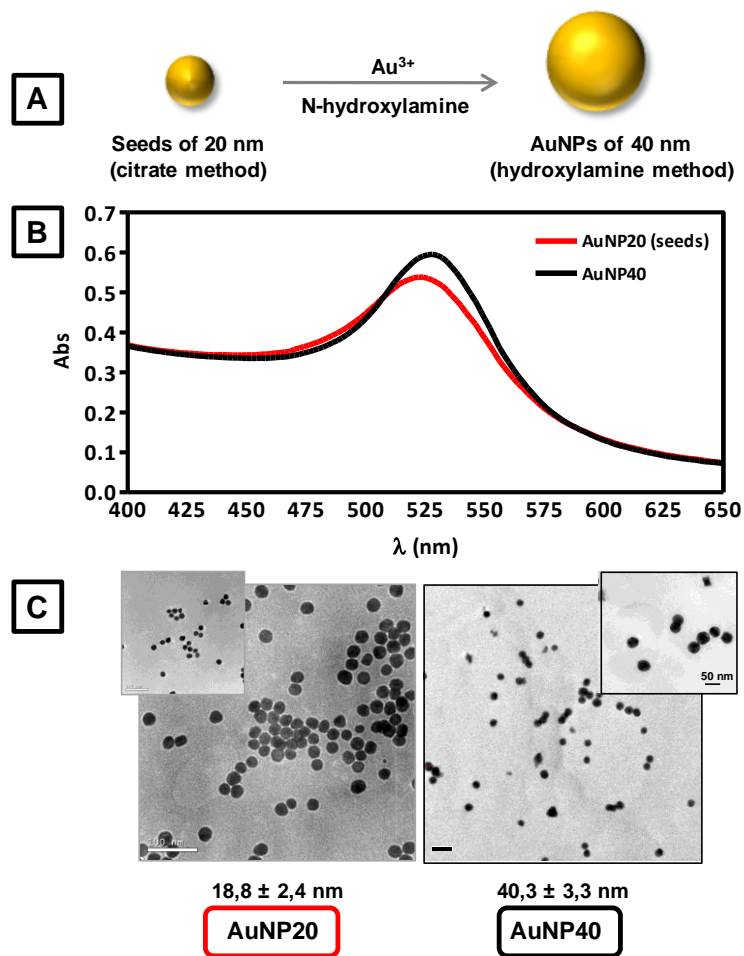


Figure 1: A) Scheme of the synthesis of the 40 nm AuNP (hydroxylamine method) from the 20 nm AuNP (citrate method) used as seeds. B) UV-vis spectra and C) TEM images of the gold colloidal solutions (AuNP20 and AuNP40) prepared.

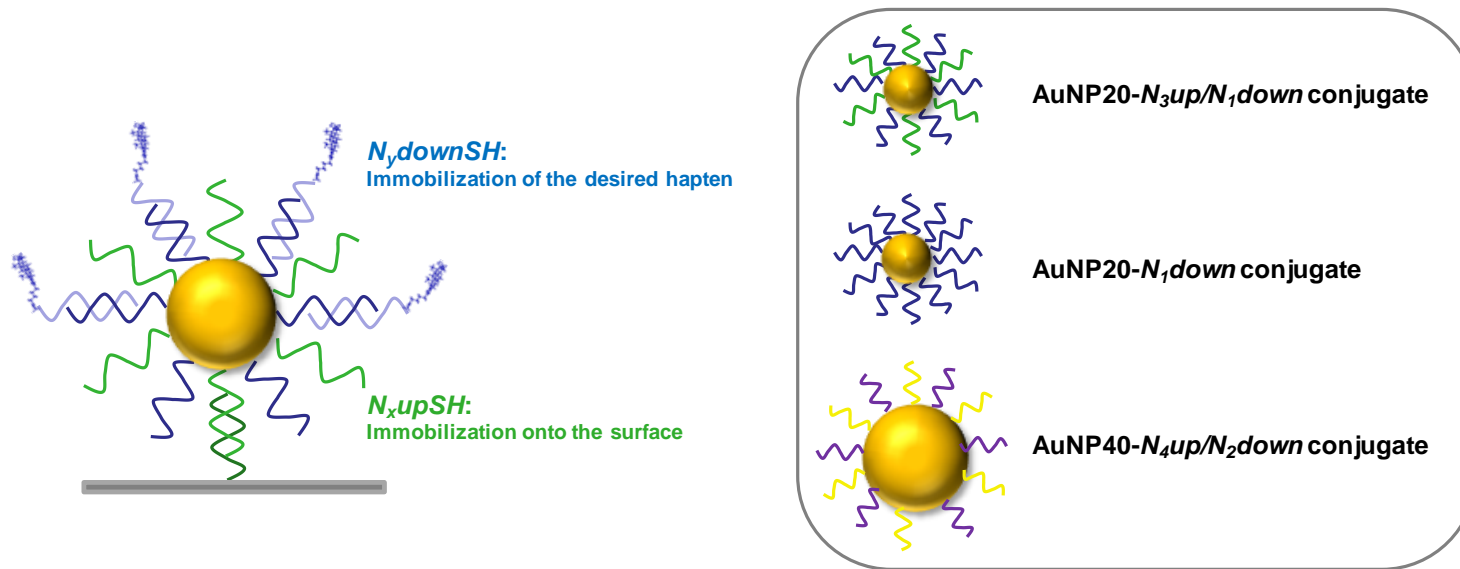


Figure 2: *Left:* Scheme of the different functionalities of the multifunctional biohybrid nanoparticles. *Right:* Image of AuNP-DNA conjugates prepared and employed in this work; two types of biohybrid 20 nm AuNPs were prepared, AuNP20- N_3 up/ N_1 down called *positive* and AuNP20- N_1 down called *negative*, and one for the 40 nm AuNPs, AuNP40- N_4 up/ N_2 down also called *positive*, and used in combination with the *positive* AuNP20- N_3 up/ N_1 down to perform multiplexed studies.

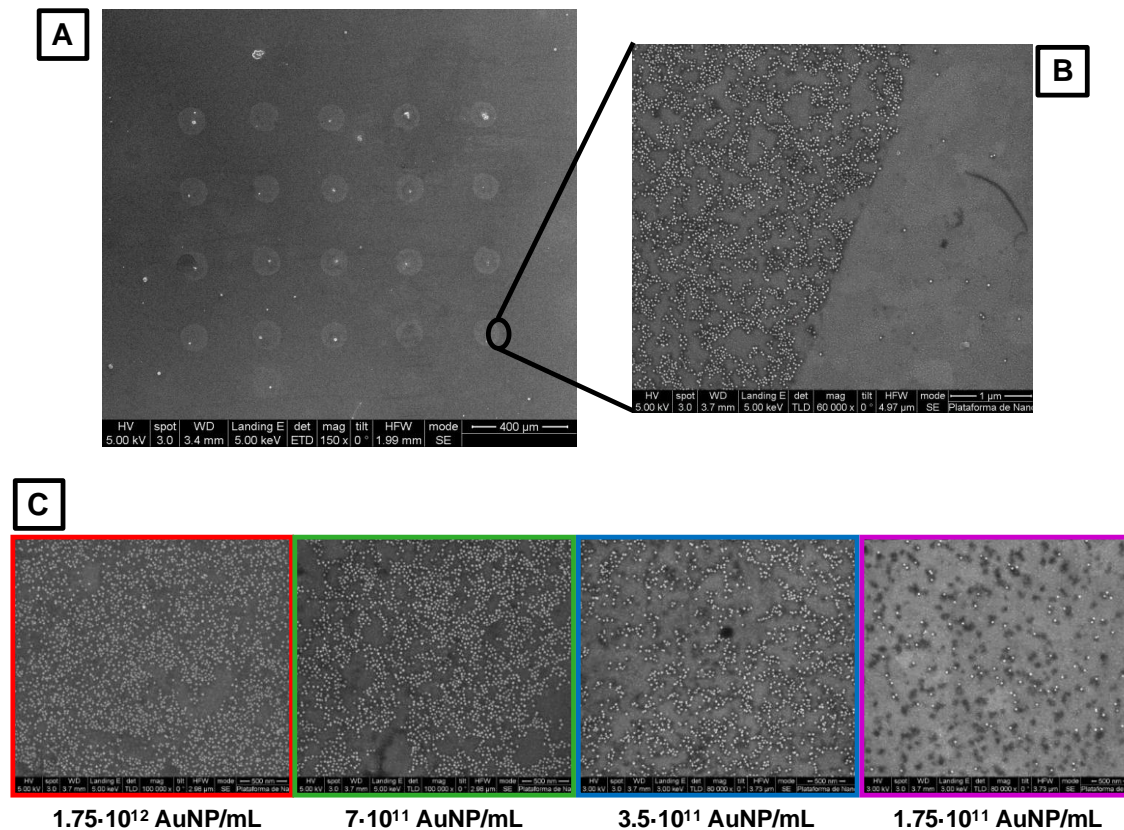


Figure 3: Surface electron microscopy images of nanostructured surfaces prepared by the DNA-directed immobilization of the AuNP20- N_3up/N_1down conjugate. A) Microscope image of one of the microarrays with a matrix of 5x4 replicate spots employed. B) Microscope image of the edge of one of the spots enlarged, where can be noticed that there is no unspecific absorption outside the spots, and that the gold nanoparticles have been immobilized selectively inside the spots where its complementary oligonucleotide strand ($N_3downNH_2$) was previously immobilized. C) SEM images corresponding to spots of different microarrays where different concentrations of AuNP20- N_3up/N_1down conjugate were added.

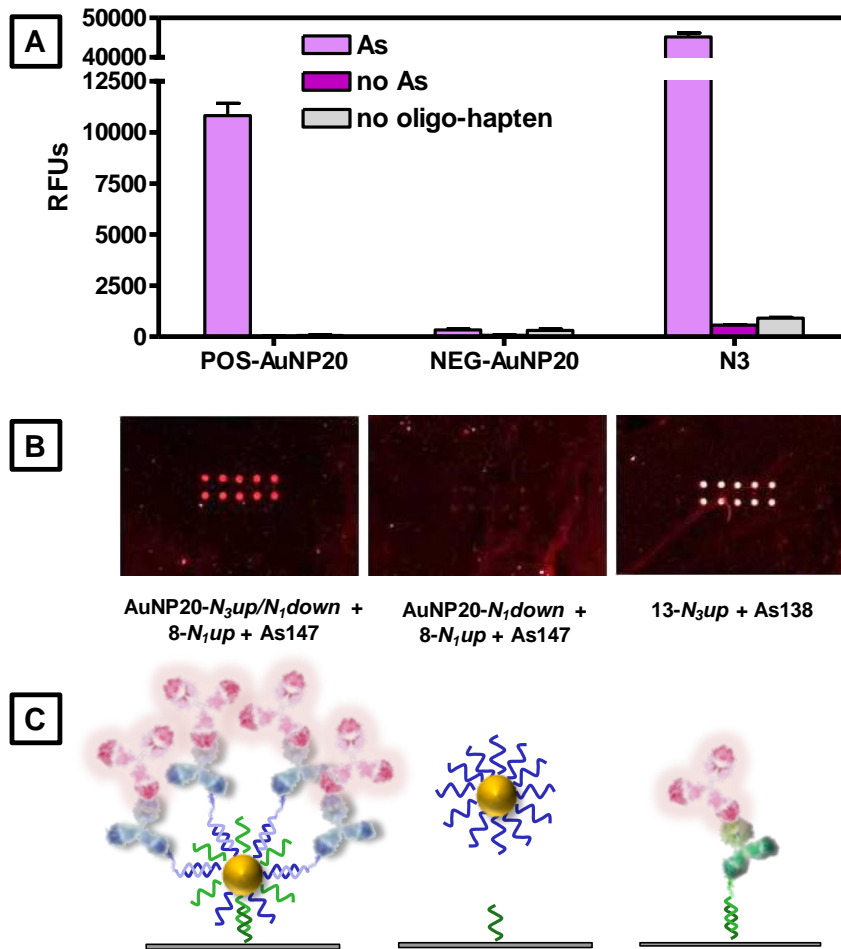


Figure 4: Fluorescent evaluation of the selectivity of the AuNP-DNA conjugates immobilization. A) Graph showing the relative fluorescence units (RFUs) recorded after performing the immunoassay on microarrays where AuNP20- N_3up/N_1down (positive AuNP20), AuNP20- N_1down (negative AuNP20) and no AuNP20 (positive immobilization control N3) have been added. As expected the positive AuNP20 and control N3 provided significant fluorescence, while the negative AuNP20 did not. B) Images obtained with a fluorescent scanner of three different microarrays, where can be observed the pattern of 5x2 replicate spots ($N_3downNH_2$) employed. The left image corresponds to the positive signal, the middle image corresponds to the negative control and the right image is the positive N3 control. C) Scheme of the reagents employed in each case.

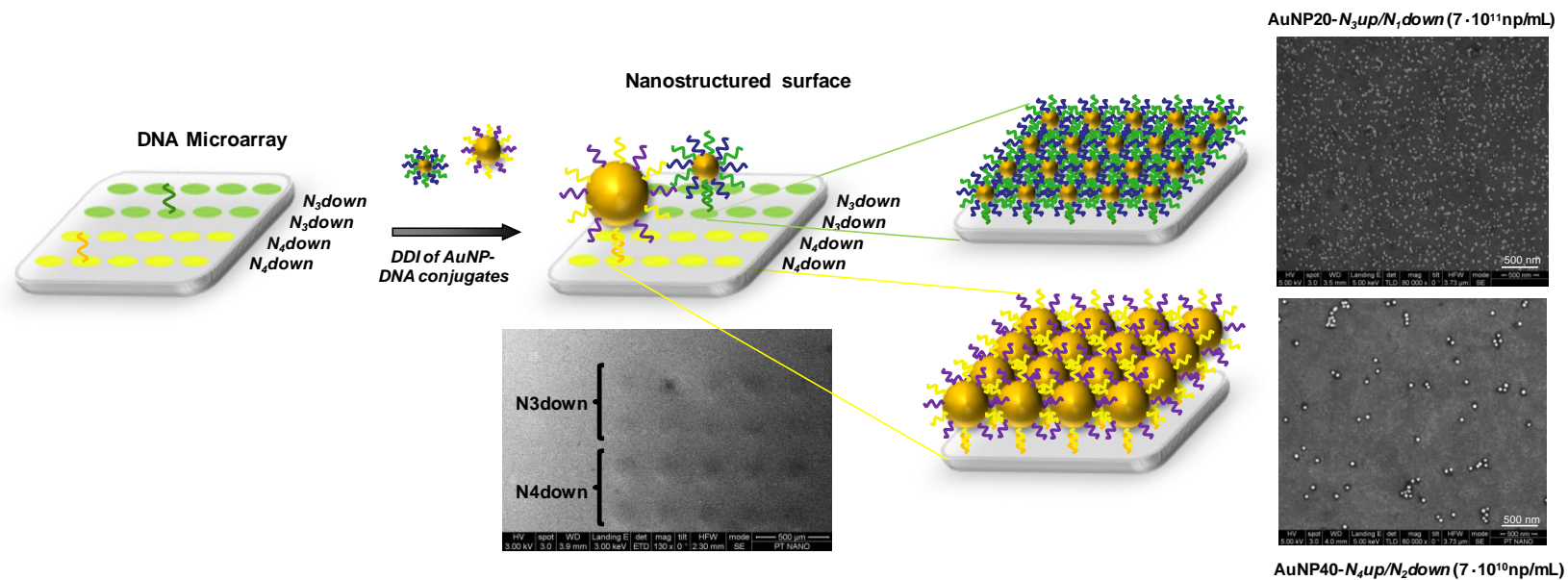


Figure 5: Scheme of the preparation of a multifunctional nanostructured surface through DNA-directed immobilization of a cocktail of AuNP-DNA conjugates of different sizes on different spots of a 5x4 microarray. The SEM images in the right side demonstrate the selectivity of the approach, showing how the AuNP20 and AuNP40 have been addressed to the corresponding spots where the complementary DNA chains have been previously immobilized.

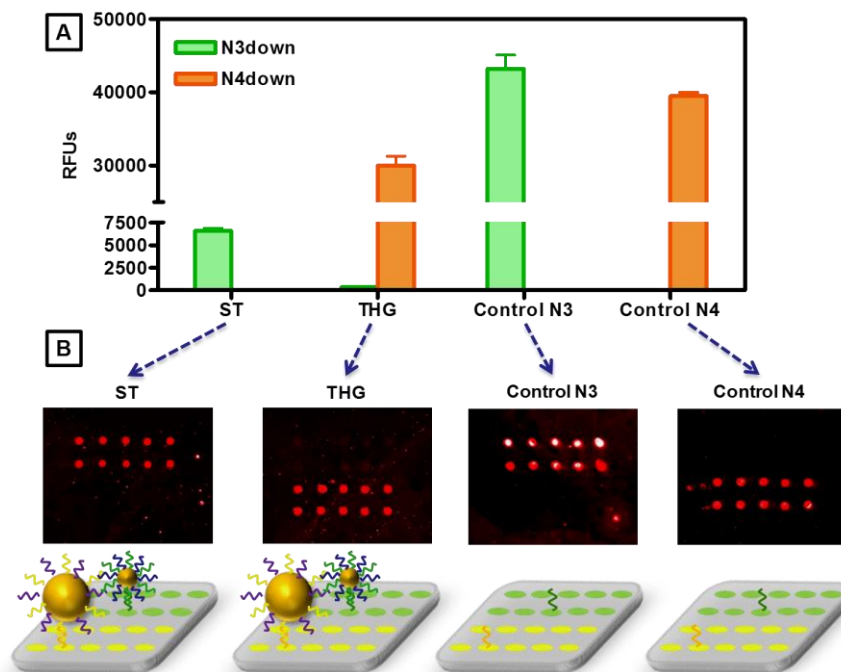


Figure 6: Evaluation of the biofunctionality of the multifunctional nanostructured surfaces prepared by DDI of AuNP-DNA conjugates of different sizes. The AuNP-DNA conjugates (AuNP20- N_{3up}/N_{1down} and AuNP40- N_{4up}/N_{2down}) for stanozolol (ST) and tetrahydrogestrinone (THG) were added as a cocktail to the DNA-microarray. In parallel, $N_{3down}NH_2$ and $N_{4down}NH_2$ (control N3 and control N4) were also added to the microarray slide A) Graph showing the Relative Fluorescence Units (RFUs) recorded after performing the immunoassay. B) Images obtained with a fluorescent scanner of the different microarrays, where can be observed the pattern 5x2 replicate spots ($N_{3down}NH_2$) and 5x2 replicate spots ($N_{4down}NH_2$) employed. In all the cases, an anti-IgG-TRITC solution was added in the last step.

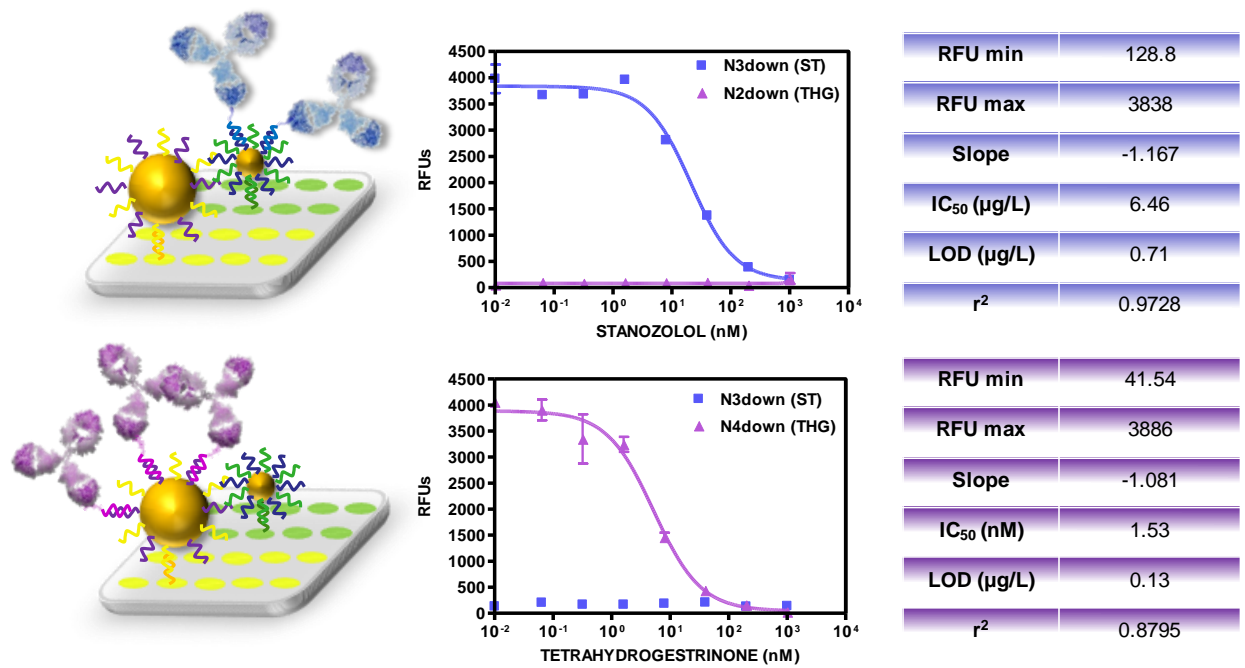


Figure 7: Calibration curves for stanozolol (ST) and tetrahydrogestrinone (THG) and main features of these assays. Fluorescent immunoassays were performed on the multifunctional nanostructured surfaces. Each data point corresponds to the average of 30 spots.

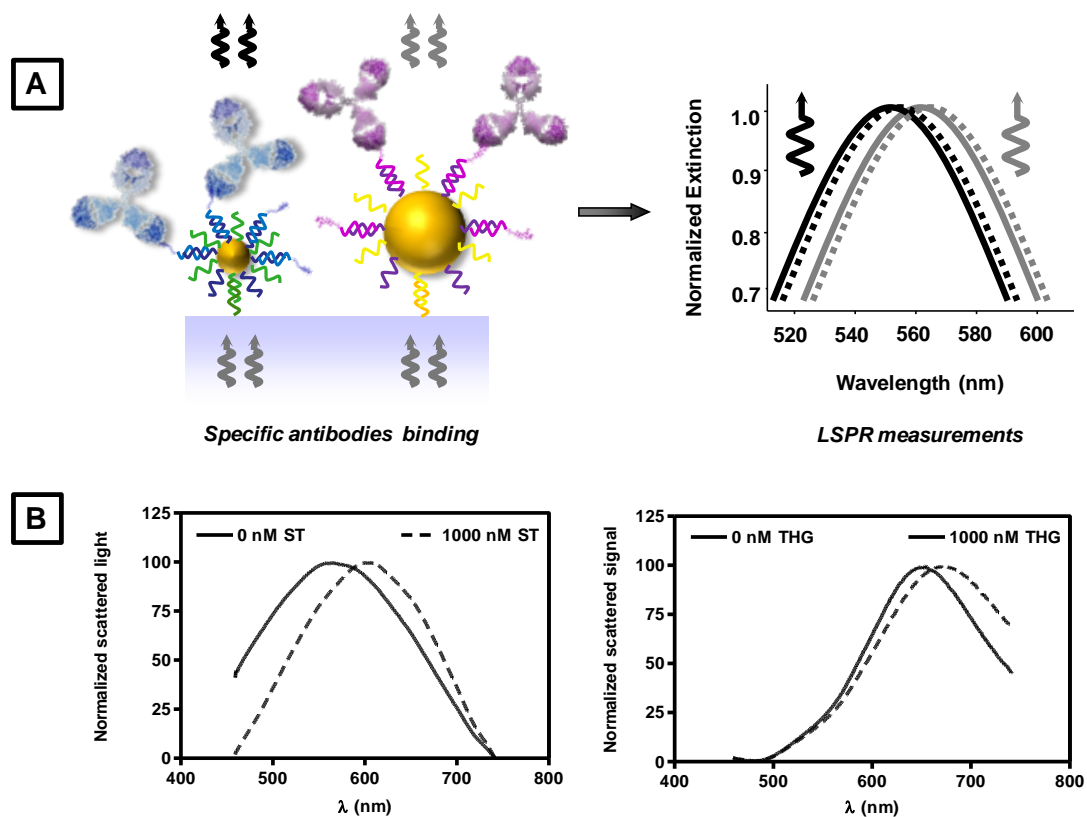


Figure 8: Results from the multiplexed LSPR sensing experiments performed in the presence and absence of the target analytes (ST and THG) A) *Left.* Scheme of a nanostructured surface when specific antibodies against stanzolol (ST) and tetrahydrogetrinone (THG) bind to their corresponding hapten previously immobilized on the surface. *Right.* Graph where have been drawn hypothetic LSPR peaks of the two size gold nanoparticles with the respective hapten-oligonucleotide conjugate hybridized, and the LSPR peak shift, when the specific antibodies interact with this surfaces. B) Graphs of the scattered light of the two different nanoparticles immobilized on the surface (AuNP20 for ST detection (left) and AuNP40 for THG detection (right)). a) A high concentration of analyte (1000 nM) was present in the sample, thus no antibody was bound to the surface (dashed line) and b) no analyte was present, thus the maximum amount of specific antibodies were bound to the surface (continued line).

TABLES

Table 1: List of all the sequences of oligonucleotides and modifications employed in this work.

Name	Sequence	Modification (5'-end)	Assay function
<i>N₃downNH₂</i>	5'-CGGATAGAGCACTACGTTGT-3'	Aminohexyl	DNA Microarray
<i>N₄downNH₂</i>	5'-CGGATAGAGCACTACGTTGT-3'	Aminohexyl	DNA Microarray
<i>N₁downSH</i>	5'-CAGGACAATATCGTTGCGTG-3'	Thiohexyl	AuNP20-DNA
<i>N₂downSH</i>	5'-CGGAGGTACATTCGACTTGA-3'	Thiohexyl	AuNP40-DNA
<i>N₃upSH</i>	5'-ACAACGTAGTGCTCTATCCG-3'	Thiohexyl	AuNP20-DNA
<i>N₄upSH</i>	5'-CTCTGTACTAACGCTGGA-3'	Thiohexyl	AuNP40-DNA
8- <i>N₁up</i>	5'-CACGCAACGATATTGTCCTG-3'	8	ST detection
hG- <i>N₂up</i>	5'-TCAAGTCGAATGTACCTCCG-3'	hG	THG detection
13- <i>N₃up</i>	5'-ACAACGTAGTGCTCTATCCG-3'	13	Control
FQ- <i>N₄up</i>	5'-CTCTGTACTAACGCTGGA-3'	FQ_EDA	Control

Table 2: List of all the reagents employed in the multiplexed studies.

TARGET	DNA Microarray	AuNP-DNA		Hapten-DNA	As
	(down series)	(up series)	(down series)	(up series)	
Stanozolol (ST)	$N_3\text{downNH}_2$	$N_3\text{upSH}$	$N_1\text{downSH}$	$8-N_1\text{up}$	As147
Tetrahydrogestrinone (THG)	$N_4\text{downNH}_2$	$N_4\text{upSH}$	$N_2\text{downSH}$	hG- $N_2\text{up}$	As170
Control N3	$N_3\text{downNH}_2$			13- $N_3\text{up}$	As138
Control N4	$N_4\text{downNH}_2$			FQ- $N_4\text{up}$	As172

REFERENCES

- Hall, W. P., et al., LSPR Biosensor Signal Enhancement Using Nanoparticles-Antibody Conjugates. *The Journal of Physical Chemistry C* **115** (5), 1410-1414.
- Fernández, F., et al., Nanogold probe enhanced Surface Plasmon Resonance immunosensor for improved detection of antibiotic residues. *Biosensors and Bioelectronics* **2012**, *34* (1), 151-158.
- Wang, F.; Hu, S., Electrochemical sensors based on metal and semiconductor nanoparticles. *Microchimica Acta* **2009**, *165* (1), 1-22.
- Wang, Z.; Ma, L., Gold nanoparticle probes. *Coordination Chemistry Reviews* **2009**, *253* (11-12), 1607-1618.
- Wittenberg, N. J.; Haynes, C. L., Using nanoparticles to push the limits of detection. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* **2009**, *1* (2), 237-254.
- Mannelli, I.; Marco, M. P., Recent advances in analytical and bioanalysis applications of noble metal nanorods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2010**, *398* (6), 2451-2469.
- Cooper, M. A., Optical biosensors in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **2002**, *1* (7), 515-528.
- Borisov, S. M.; Wolfbeis, O. S., Optical Biosensors. *Chemical Reviews* **2008**, *108* (2), 423-461.
- Fan, X. W., I.M.; Shopova, S.I.; Zhu, H.; Suter, J.D.; Sun, Y., Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review. *Analytica Chimica Acta* **2008**, *620*, 8-26.
- Fujiwara, K., et al., Measurement of antibody binding to protein immobilized on gold nanoparticles by localized surface plasmon spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2006**, *386* (3), 639-644.
- Zhao, J., et al., Localized surface plasmon resonance biosensors. *Nanomedicine* **2006**, *1* (2), 219-228.

12. Willets, K. A.; Van Duyne, R. P., Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing. *Annual Review of Physical Chemistry* **2007**, *58* (1), 267-297.
13. Kreuzer, M., et al., Colloidal-based localized surface plasmon resonance (LSPR) biosensor for the quantitative determination of stanazolol. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2008**, *391* (5), 1813-1820.
14. Li, X., et al., Localized surface plasmon resonance (LSPR) of polyelectrolyte-functionalized gold-nanoparticles for bio-sensing. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2009**, *332* (2-3), 172-179.
15. Bohren, C. F. H., D. R. , Absorption and scattering of light by small particles. *Wiley-Interscience* **1983**.
16. Liz-Marzán, L. M., Tailoring Surface Plasmons through the Morphology and Assembly of Metal Nanoparticles. *Langmuir* **2005**, *22* (1), 32-41.
17. Yamamichi, J., et al., The mesoscopic effect on label-free biosensors based on localized surface plasmon resonance of immobilized colloidal gold. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2009**, *143* (1), 349-356.
18. Anker, J. N., et al., Biosensing with plasmonic nanosensors. *Nat Mater* **2008**, *7* (6), 442-453.
19. Petryayeva, E.; Krull, U. J., Localized surface plasmon resonance: Nanostructures, bioassays and biosensing-A review. *Analytica Chimica Acta* **2011**, *706* (1), 8-24.
20. Hu, M., et al., Gold nanostructures: engineering their plasmonic properties for biomedical applications. *Chemical Society Reviews* **2006**, *35* (11), 1084-1094.
21. Mayer, K. M.; Hafner, J. H., Localized Surface Plasmon Resonance Sensors. *Chemical Reviews* *111* (6), 3828-3857.
22. Yu, C.; Irudayaraj, J., Multiplex Biosensor Using Gold Nanorods. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (2), 572-579.
23. Endo, T., et al., Multiple Label-Free Detection of Antigen-Antibody Reaction Using Localized Surface Plasmon Resonance-Based Core-Shell Structured Nanoparticle Layer Nanochip. *Analytical Chemistry* **2006**, *78* (18), 6465-6475.
24. Sepúlveda, B., et al., LSPR-based nanobiosensors. *Nano Today* **2009**, *4* (3), 244-251.
25. Graells, S. A., R.; Badenes, G. and Quidant, R. , Growth of plasmonic gold nanostructures by electron beam induced deposition. *Appl. Phys. Lett.* **2007**, *91* (), 121112-1/3.
26. Bhushan, B.; Matsui, S., Three-Dimensional Nanostructure Fabrication by Focused Ion Beam Chemical Vapor Deposition. In *Springer Handbook of Nanotechnology*, Springer Berlin Heidelberg: 2010; pp 211-229.
27. Jensen, T. R., et al., Nanosphere Lithography: Surface Plasmon Resonance Spectrum of a Periodic Array of Silver Nanoparticles by Ultraviolet-Visible Extinction Spectroscopy and Electrodynamic Modeling. *The Journal of Physical Chemistry B* **1999**, *103* (13), 2394-2401.
28. Jensen, T. R., et al., Nanosphere Lithography: Tunable Localized Surface Plasmon Resonance Spectra of Silver Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B* **2000**, *104* (45), 10549-10556.
29. Haynes, C. L.; Van Duyne, R. P., Nanosphere Lithography: A Versatile Nanofabrication Tool for Studies of Size-Dependent Nanoparticle Optics. *The Journal of Physical Chemistry B* **2001**, *105* (24), 5599-5611.
30. Haes, A. J.; Van Duyne, R. P., A Nanoscale Optical Biosensor: Sensitivity and Selectivity of an Approach Based on the Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy of Triangular Silver Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124* (35), 10596-10604.
31. Turkevich, J. S., P.C.; Hillier, J.; , *Discussions of the Faraday Society* **1951**, *11*, 55-75.

32. Turkevich, J. S., P.C. and Hillier, J., THE FORMATION OF COLLOIDAL GOLD. *Journal of Physical Chemistry* **1953**, 57 (7), 670-673.
33. Frens, G., Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nature Physical Science* **1973**, 241 (1), 20-22.
34. Brown, K. R., et al., Seeding of Colloidal Au Nanoparticle Solutions. 2. Improved Control of Particle Size and Shape. *Chemistry of Materials* **1999**, 12 (2), 306-313.
35. Haiss, W., et al., Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV-Vis Spectra. *Analytical Chemistry* **2007**, 79 (11), 4215-4221.
36. Grabar, K. C., et al., Preparation and Characterization of Au Colloid Monolayers. *Analytical Chemistry* **1995**, 67 (4), 735-743.
37. Reinhard, B. r. M., et al., Calibration of Dynamic Molecular Rulers Based on Plasmon Coupling between Gold Nanoparticles. *Nano Letters* **2005**, 5 (11), 2246-2252.
38. Kreuzer, M. P., et al., Quantitative detection of doping substances by a localised surface plasmon sensor. *Biosensors and Bioelectronics* **2006**, 21 (7), 1345-1349.
39. Tort, N., et al., Fluorescence site-encoded DNA addressable hapten microarray for anabolic androgenic steroids. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2009**, 28 (6), 718-728.
40. Demers, L. M., et al., A Fluorescence-Based Method for Determining the Surface Coverage and Hybridization Efficiency of Thiol-Capped Oligonucleotides Bound to Gold Thin Films and Nanoparticles. *Analytical Chemistry* **2000**, 72 (22), 5535-5541.
41. Hazarika, P. G., T.; Reibner, M.; Ceyhan, B.; and Niemeyer, C.M., Synthesis and Characterization of Deoxyribonucleic Acid-Conjugated Gold Nanoparticles. In *Bioconjugation Protocols: Strategies and Methods*, 2004; pp 295-304.
42. Kim, E.-Y., et al., A real-time PCR-based method for determining the surface coverage of thiol-capped oligonucleotides bound onto gold nanoparticles. *Nucleic Acids Research* **2006**, 34 (7), e54.
43. Li, Z., et al., Multiple thiol-anchor capped DNA-gold nanoparticle conjugates. *Nucleic Acids Research* **2002**, 30, 1558-1562.
44. Park, S., et al., Changes in Oligonucleotide Conformation on Nanoparticle Surfaces by Modification with Mercaptohexanol. *Nano Letters* **2004**, 4 (10), 1925-1929.
45. Stakenborg, T., et al., Increasing the stability of DNA-functionalized gold nanoparticles using mercaptoalkanes. *Journal of Nanoparticle Research* **2008**, 10 (0), 143-152.
46. Suzuki, K., et al., Controlling the Number and Positions of Oligonucleotides on Gold Nanoparticle Surfaces. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, 131 (22), 7518-7519.
47. Taton, T. A., *Preparation of Gold Nanoparticle-DNA Conjugates*. John Wiley & Sons, Inc.: 2001.
48. Wolfgang, F.; Taton, T. A., Metal nanoparticles as labels for heterogeneous, chip-based DNA detection. *Nanotechnology* **2003**, 14 (12), R63.
49. Loweth, C. J., et al., DNA-Based Assembly of Gold Nanocrystals. *Angewandte Chemie International Edition* **1999**, 38 (12), 1808-1812.
50. Reichert, J. r., et al., Chip-Based Optical Detection of DNA Hybridization by Means of Nanobead Labeling. *Analytical Chemistry* **2000**, 72 (24), 6025-6029.
51. Peschel, S., et al., Immobilization of gold nanoparticles on solid supports utilizing DNA hybridization. *Materials Science and Engineering: C* **2002**, 19 (1-2), 47-50.

52. Salvador, J. P., et al., Simultaneous immunochemical detection of stanozolol and the main human metabolite, 3'-hydroxy-stanozolol, in urine and serum samples. *Analytical Biochemistry* **2008**, 376 (2), 221-228.
53. Salvador, J. P., et al., A high-throughput screening (HTS) immunochemical method for the analysis of stanozolol metabolites in cattle urine samples. *Journal of Chromatography B* **2009**, 878 (2), 243-252.
54. Salvador, J.-P., et al., Preparation of Antibodies for the Designer Steroid Tetrahydrogestrinone and Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Human Urine Analysis. *Anal. Chem.* **2007**, 79 (10), 3734-3740.
55. Tort, N., et al., Multiplexed immunoassay to detect anabolic androgenic steroids in human serum. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2012**, 403 (5), 1361-1371.
56. Enustun, B. V. a. T., J., COAGULATION OF COLLOIDAL GOLD. *Journal of the American Chemical Society* **1963**, 85 (21), 3317-&.
57. Tort, N., et al., Multiplexed immunoassay to detect anabolic androgenic steroids in human serum. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 403 (5), 1361-1371.
58. Haes, A. J., et al., A Localized Surface Plasmon Resonance Biosensor: First Steps toward an Assay for Alzheimer's Disease. *Nano Letters* **2004**, 4 (6), 1029-1034.
59. Demers, L. M., et al., Direct Patterning of Modified Oligonucleotides on Metals and Insulators by Dip-Pen Nanolithography. *Science* **2002**, 296 (5574), 1836-1838.
60. Jain, P. K., et al., Calculated Absorption and Scattering Properties of Gold Nanoparticles of Different Size, Shape, and Composition: Applications in Biological Imaging and Biomedicine. *The Journal of Physical Chemistry B* **2006**, 110 (14), 7238-7248.
61. Nielsen, P. E.; Egholm, M., An Introduction to Peptide Nucleic Acid. *Current Issues Molec. Biol.* **1999**, 1 (2), 89-104.
62. Hill, H. D.; Mirkin, C. A., The bio-barcode assay for the detection of protein and nucleic acid targets using DTT-induced ligand exchange. *Nat. Protocols* **2006**, 1 (1), 324-336.

6.3 Resum de les aportacions principals del capítol

- S'ha demostrat que és possible la immobilització de nanopartícules d'or de diferent mida simultàniament i de forma controlada en un *microarray* d'ADN, fent ús de l'estratègia DDI.
- S'ha confirmat mitjançant microscòpia d'escaneig d'electrons i mitjançant la realització d'immunoassaigs fluorescents que la immobilització de les nanopartícules a través de la hibridació d'ADN té lloc de forma selectiva, i que les superfícies nanoestructurades creades són biofuncionals.
- Per primera vegada, s'ha demostrat que és possible preparar superfícies amb propietats plasmòniques mitjançant l'estratègia DDI i que aquestes podrien ser emprades com a transductors en immunosensors de LSPR. Tot i que els resultats mostrats en aquest capítol, pel que fa a la detecció de ST són tant sols preliminars, creiem que aquest treball obre les portes a realitzar un estudi més acurat d'aquesta aproximació pel desenvolupament d'immunosensors.

7. DESENVOLUPAMENT D'UN MICROARRAY PER A LA DIFERENCIACIÓ CEL·LULAR

7.1 Precedents i Objectius del capítol

El treball inclòs en aquest capítol va ser realitzat durant una estada pre-doctoral de tres mesos en el laboratori del Professor Christof M. Niemeyer de la Universitat de Dortmund, Alemanya. El Prof. Niemeyer és un referent en el camp de la nanobiotecnologia i ha estat pioner en plantejar i demostrar els avantatges d'utilitzar la molècula d'ADN per a la immobilització de proteïnes sobre superfícies sòlides fent ús de la reacció d'hibridació entre cadenes d'oligonucleòtids complementàries. Per aquest motiu i després d'haver demostrat l'aplicabilitat d'aquesta estratègia (*DNA-directed immobilization*, DDI) per a la immobilització d'haptens, concretament per a la detecció d'hormones anabolitzants, es va creure interessant efectuar una estada al seu grup per tal d'ampliar la formació adquirida, en aquest cas emprant la DDI per a la detecció de cèl·lules, per tal de demostrar la universalitat de l'estratègia. Així doncs, l'objectiu que es va proposar, fou el de desenvolupar un *microarray* d'anticossos que permetés la diferenciació de cèl·lules en funció de les proteïnes expressades en la seva membrana cel·lular, en un primer estadi en un format d'assaig estàtic però amb l'objectiu final d'integrar el chip d'ADN en un sistema microfluídic. Aquest projecte, es va realitzar al laboratori del Prof. Niemeyer en col·laboració amb la Sra Stephanie Reisewitz, que en aquell moment es trobava també realitzant la tesi doctoral.

7.1.1 Diferenciació cel·lular en *microarrays*

Entendre el comportament de cèl·lules, tan sanes com malaltes, requereix d'eines que permetin a partir d'una mescla complexa extreure el comportament de cada tipus de cèl·lula per separat. L'aparició dels *microarrays* cel·lulars ha fet possible l'anàlisi de cèl·lules intactes, sense la necessitat de treballar amb lisats de cèl·lules ²³⁸. Anticossos, proteïnes recombinants o altres

molècules que puguin reconèixer o ser reconegudes per part de les cèl·lules poden ser immobilitzades sobre un suport sòlid emprant aparells automàtics per dispensar els reactius en posicions predeterminades de la superfície. A continuació, s'afegeix la mescla de cèl·lules per tal que tingui lloc el seu reconeixement i la conseqüent captura en funció de la seva composició. D'aquesta forma, és possible identificar i quantificar diferents tipus de cèl·lules basant-nos únicament en les molècules que es troben expressades en la seva superfície. Les cèl·lules immobilitzades poden ser analitzades mitjançant microscòpia òptica o escàners automàtics. Per altra banda, es possible immobilitzar diferents tipus de molècules en un mateix spot per tal d'obtenir major informació sobre el comportament de les cèl·lules; per exemple, a part de les anomenades *molècules de captura*, que són aquelles que s'uneixen a les cèl·lules de forma específica determinant la zona d'immobilització de les cèl·lules, després hi ha les *molècules detectores*, que són aquelles que s'uneixen als factors solubles que secreten les cèl·lules, i també les *molècules efectores*, que són aquelles que poden afectar al comportament de les cèl·lules²³⁹. Els anticossos monoclonals són els elements de reconeixement més emprats per al desenvolupament de *microarrays* cel·lulars. Tal com ja s'ha esmentat abans, existeixen moltes formes d'immobilitzar anticossos sobre una superfície sòlida, ja sigui per adsorció, covalentment sobre superfícies químicament modificades²⁴⁰, a través de la interacció altament específica estreptavidina-biotina emprant anticossos biotinitats, com també, a través de la hibridació entre cadenes d'oligonucleòtids complementàries. L'objectiu és sempre el de mantenir la conformació activa de l'anticòs, evitant possibles problemes de desnaturalització deguts al procés d'immobilització, que generalment venen ocasionats per canvis de pH, força iònica o temperatura. Aquest últim mètode, ha estat emprat per a la formació d'una llibreria d'anticossos codificats amb ADN (*DNA-encoded antibody libraries*, DEAL) per a la detecció multiplexada de ssDNAs, proteïnes i cèl·lules en una mateixa plataforma de diagnòstic²⁴¹. La mateixa estratègia ha estat emprada per a la immobilització directa de cèl·lules, introduint grups azido a la superfície de la cèl·lula i fent-les reaccionar posteriorment amb cadenes d'oligonucleòtids funcionalitzades amb grups fosfina a través de la reacció de Staudinger. Les cèl·lules modificades amb les cadenes ssDNA, posteriorment s'immobilitzen sobre la superfície sòlida a través de la hibridació amb les cadenes complementàries prèviament immobilitzades²⁴².

Recentment han aparegut dispositius microfluidics per a la diferenciació de cèl·lules i el seu posterior cultiu. Els principals avantatges de les plataformes microfluídiques de cultiu cel·lular són la miniaturització i la capacitat d'observar a temps real el reconeixement cel·lular i el posterior creixement. Alguns dispositius microfluídics han estat emprats pel cultiu cel·lular fins a 4 setmanes; el que ha permès optimitzar condicions, com la densitat de cèl·lules inicial, la composició del medi de cultiu i els temps de renovació del medi, per tal de millorar el creixement i la proliferació, i ajudar a mantenir les funcions cel·lulars durant el procés de cultiu²⁴³⁻²⁴⁵. Malgrat els avenços realitzats en aquest camp, majoritàriament s'ha treballat en el cultiu d'un sol tipus de

cèl·lula²⁴² sense arribar a abordar la multidetecció, i són molt pocs els exemples en la literatura que hagin emprat molècules de reconeixement contra antigens específics localitzats en la membrana cel·lular per a la captura de cèl·lules en flux²⁴⁶⁻²⁴⁷.

7.2 Resultats i Discussió

A continuació es passarà a explicar quina fou la meua contribució en aquesta línia d'investigació, que finalment va portar a la publicació de l'article que s'adjunta al final del capítol. Inicialment, com a prova de concepte, es va escollir treballar amb cèl·lules humanes embrioniques de ronyó (HEK293). Aquestes cèl·lules expressen en la membrana cel·lular la proteïna CD81 de 26 KDa. Així doncs, per tal de capturar les cèl·lules, s'escollí un anticòs monoclonal produït en ratolins contra la proteïna CD81 (MAc(anti-CD81)). L'esquema general per a la immobilització dels anticòssos sobre les superfícies sòlides, es basava en l'ús de la reacció altament específica d'hibridació entre cadenes d'oligonucleòtids complementàries, després d'una etapa prèvia de preincubació de l'anticòs MAc(anti-CD81) biotinilat amb els diferents conjugats STV-ssDNA (vegeu Figura 7.2).

7.2.1 Síntesi de bioconjugats estreptavidina-ADN

D'entrada, calia disposar d'una bateria de conjugats estreptavidina(STV)-ADN (STV-F1, STV-F5, STV-F9 i STV-F10), preparats amb diferents cadenes d'oligonucleòtids (F1, F5, F9 i F10) per poder dur a terme la multiplexació. Per una banda, el conjugat disposaria de la capacitat d'unir quatre equivalents de biotina o biomolècules biotinilades, i per l'altra, d'unir-se a la cadena d'oligonucleòtids complementària (cF1, cF5, cF9 i cF10) prèviament immobilitzada a la superfície del *microarray*.

Taula 7.1: Oligonucleòtids tiolats emprats per a la síntesi dels conjugats STV-ADN (sèrie t) i les cadenes d'oligonucleòtids complementàries de captura amino modificades (sèrie c)^a.

Nom	Seqüència	Modificació
tF1	CCT GCG TCG TTT AAG GAA GTA C	5'- tiol (C6)
tF5	GGT CCG GTC ATA AAG CGA TAA G	5'- tiol (C6)
tF9	GTG GAA AGT GGC AAT CGT GAA G	5'- tiol (C6)
tF10	GGA CGA ATA CAA AGG CTA CAC G	5'- tiol (C6)
cF1	GTA CTT CCT TAA ACG ACG CAG G	5'- amino (C6)
cF5	CTT ATC GCT TTA TGA CCG GAC C	5'- amino (C6)
cF9	CTT CAC GAT TGC CAC TTT CCA C	5'- amino (C6)
cF10	CGT GTA GCC TTT GTA TTC GTC C	5'- amino (C6)

^a Les seqüències es mostren en la direcció 5'-3'.

Durant l'estada es va realitzar la síntesi i purificació de dos dels quatre conjugats emprats en l'estudi, concretament el STV-F9 i el STV-F10. La síntesi es va realitzar utilitzant els

oligonucleòtids tiolats (tF9, tF10) (Taula 7.1) i estreptavidina (pes molecular aproximat de 56 KDa), tal i com ja ha estat descrit anteriorment²⁴⁸. Breument, l'estreptavidina va ser funcionalitzada amb grups maleimido a través dels grups ε-amino de les lisines, utilitzant el reactiu heterobifuncional, sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexà-1-carboxilat (sSMCC), i posteriorment s'hi uniren de les cadenes d'oligonucleòtids tiolades (Figura 7.1)²⁴⁹.

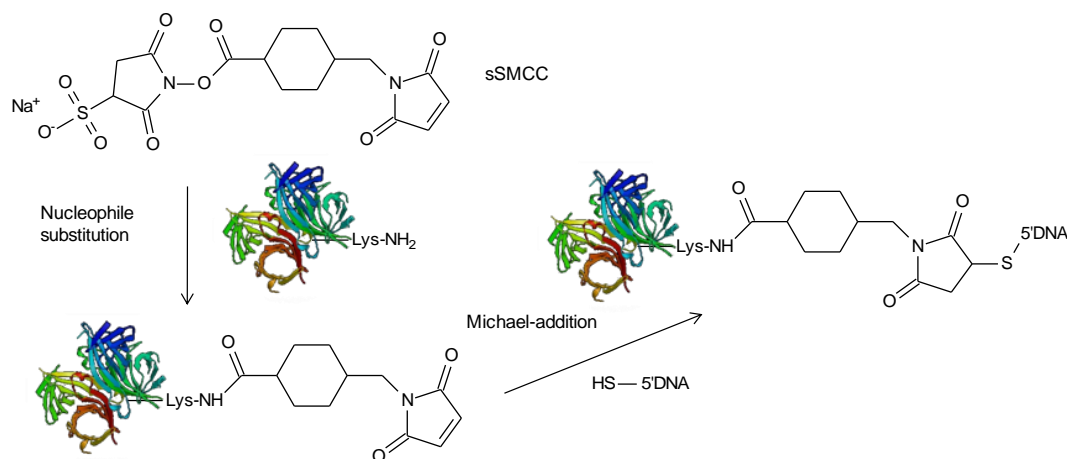


Figura 7.1: Esquema sintètic de la unió covalent de cadenes d'oligonucleòtids tiolades per l'extrem 5' als grups amino lliures de l'estreptavidina, fent ús del reactiu heterobifuncional sSMCC.

7.2.2 Microarray cel·lular

Abans de desenvolupar el *microarray* per a la diferenciació de cèl·lules, es va comprovar que l'anticòs (anti-CD81) s'immobilitzès de forma específica i controlada en la plataforma de detecció. L'avaluació de la correcta disposició en la superfície es realitzà mitjançant mesures de fluorescència.

La unió dels conjugats STV-ADN (STV-F1-STV-F5, STV-F9 i STV-F10) a l'anticòs (anti-CD81), es va realitzar preincubant per separat cada un dels conjugats d'estreptavidina amb l'anticòs (o sense, en els controls negatius) en quantitats equimolars.

Per a la immobilització dels oligonucleòtids de captura (cF1-cF10, Taula 7.1), complementaris als diferents conjugats IgG-STV-ADN, es van fer servir superfícies de vidre prèviament preparades en el laboratori²⁰⁴, les quals estaven derivatitzades amb dendrímers amb grups carboxílics activats amb N-hidroxisuccinimida. La dispensació es va fer fent ús d'un aparell piezoelèctric amb el qual els bioreactius es dipositaven en forma de nanogotes sense que les puntes entressin en contacte amb la superfície. Un cop dipositats els oligonucleòtids de captura, les superfícies s'incubaren tota la nit i a continuació foren conservades a -20°C fins al seu ús. Immediatament abans de realitzar l'assaig, el *microarray* d'ADN es va tractar amb una solució 100 mM d'amino-dPEG12-ODMT, per tal de reduir unions inespecífiques a la superfície, per part de biomolècules i però sobretot més endavant per part de cèl·lules (vegeu figura S1, de la informació suplementària de l'article adjunt). El

microarray s'utilitzà fent ús d'unes màscares adhesives que es fixaren a la part superior de la superfície del vidre. Tot seguit, es mesclaren els diferents conjugats IgG-STV-ADN, i la mescla s'afegí al *microarray* a on es deixà incubar durant 1 hora a temperatura ambient en una cambra humida amb una lleu agitació perquè tingués lloc la hibridació entre les cadenes d'oligonucleòtids complementaris (vegeu Figura 7.2).

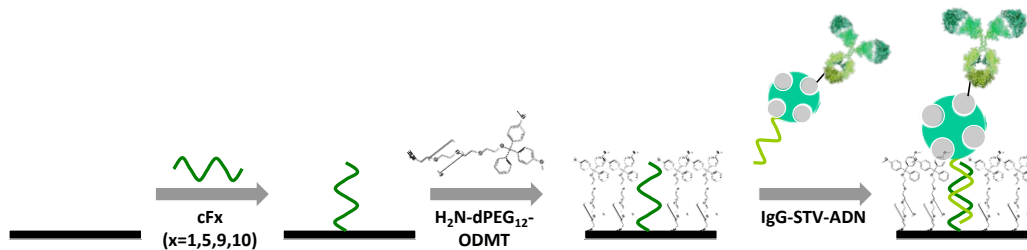


Figura 7.2: Esquema dels diferents passos a seguir per tal d'obtenir un microarray d'anticossos mitjançant la hibridació de cadenes d'oligonucleòtids complementàries.

Per tal d'observar la presència o l'absència d'anticòs en els diferents *spots*, es va utilitzar un conjugat anti-IgG-STV-Cy3, preparat prèviament mitjançant la preincubació d'un anticòs biotinitat produït en cabra contra IgGs de ratolí (anti-IgG) amb un conjugat d'estreptavidina fluorescent (STV-Cy3). La solució s'afegí al *microarray* i es deixà incubar durant 1 hora a temperatura ambient en una cambra humida amb una lleu agitació, per tal que tingués lloc el reconeixement biomolecular (veure Figura 7.3). Les lectures de fluorescència es portaren a terme en sec en un escàner de fluorescència, Genepix 4000B microarray scanner (Axon), amb una longitud d'ona d'excitació de 532 nm. Els resultats que es mostren en la Figura 7.4, demostraren que la immobilització de l'anticòs (anti-CD81) havia tingut lloc de forma específica i selectiva, i que per tant la superfície estava llesta per capturar cèl·lules que continguessin en la seva membrana cel·lular l'antigen CD81, com és el cas de les cèl·lules HEK293.

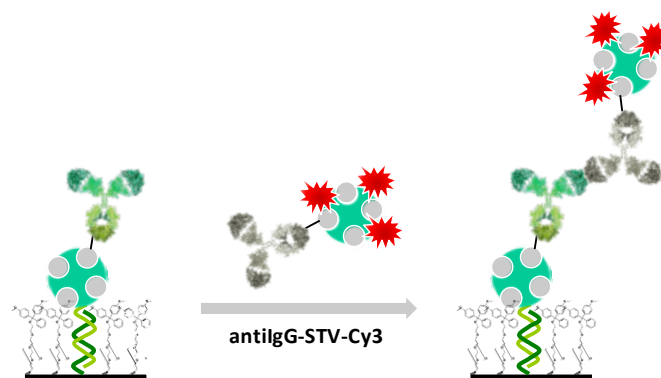


Figura 7.3: Esquema del format emprat per a la detecció fluorescent dels anticossos immobilitzats en el microarray.

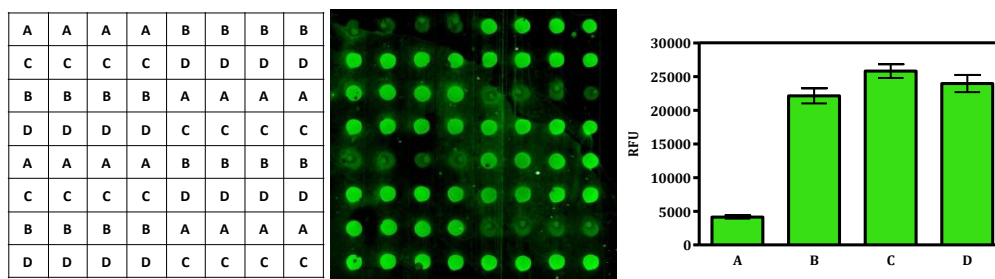


Figura 7.4: Esquerra) Esquema del diferent contingut de cada un dels spots A) 10 pmols STV-F1 (control negatiu), B) 10 pmols STV-F5 + 10 pmols MAc(anti-CD81)-biotina, C) 10 pmols STV-F9 + 10 pmols MAc(anti-CD81)-biotina i D) 10 pmols STV-F10 + 10 pmols MAc(anti-CD81)-biotina. Centre) Imatge obtinguda amb l'escàner de fluorescència. La mida dels spots era d'uns 250 μm . Dreta) Gràfic de barres on ha estat representada la mitja del senyal fluorescent dels diferents spots d'un mateix grup.

7.2.2.1 Adhesió i cultiu cel·lular

Així doncs, després d'haver immobilitzat l'anticòs (anti-CD81) en la superfície del *microarray*, es va procedir a comprovar si era possible capturar cèl·lules HEK293 de forma específica, a través de la interacció entre l'anticòs (antiCD81) i l'antigen CD81 expressat en la membrana cel·lular d'aquestes cèl·lules.

Un cop immobilitzat l'anticòs, tal i com s'ha comentat anteriorment, es van treure les màscares adhesives i es va rentar la superfície amb aigua milliQ i PBS, en condicions estèrils. A continuació, es col·locà el *microarray* en un plat de cultiu i s'afegí una solució de cèl·lules HEK 293 a una densitat de 10^5 cèl·lules/mL en un medi de cultiu D-MEM amb un contingut de 4.5 g/L glucosa, L-Glutamina, 0.5 g/L NaHCO_3 , 1% (v/v) piruvat sòdic (100 mM) i 25 mM HEPES, i es deixà incubant a 37°C amb agitació orbital. A continuació, s'eliminà el medi i es rentà el *microarray* amb PBS per tal d'eliminar les cèl·lules dèbilment adherides o immobilitzades de forma inespecífica en la superfície, i seguidament, s'afegí un medi D-MEM amb un contingut de 4.5 g/L glucosa, 3.7 g/L NaHCO_3 , 1% (v/v) piruvat sòdic (100 mM), 1% (v/v) solució penicil·lina/estreptomicina (100 mM) i 10% (v/v) FCS (Fetal Calf Serum), i es deixà incubar a 37°C amb un 5% CO_2 per comprovar si les cèl·lules eren capaces de continuar creixent un cop immobilitzades en la superfície (vegeu Figura 7.5). Es feren estudis variant els temps de captura i de cultiu de les cèl·lules sobre el *microarray*, observant els millors resultats capturant durant 4 hores les cèl·lules i després deixant-les créixer durant tota la nit en el medi de cultiu adequat (vegeu figura 2, de l'article adjunt).

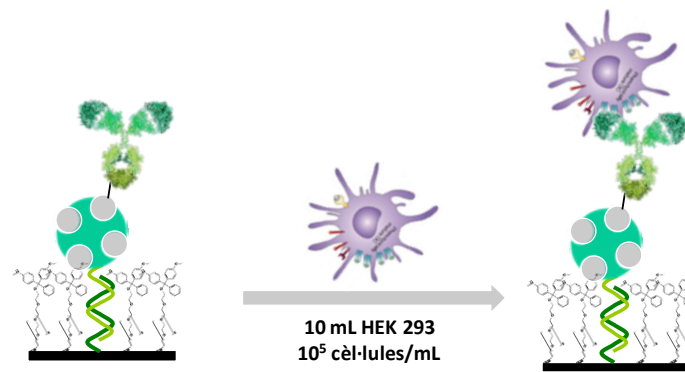


Figura 7.5: Esquema de la immobilització de les cèl·lules HEK 293 sobre el microarray a través de la interacció de l'antigen CD81 situat en la membrana cel·lular amb l'anticòs específic anti-CD81, prèviament immobilitzat.

Després d'incubar el *microarray* tota la nit, es va rentar la superfície amb PBS estèril i es va addicionar el tampó de fixació (100 mM K-Pipes, 37% (v/v) formaldehid, 10 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 0.1% (v/v) TX-100). Les cèl·lules un cop fixades es rentaren amb tampó TBS-T (10 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl i 0.1% (v/v) TX-100) i es bloquejà el *microarray* amb un 2% (w/v) BSA en tampó TBS-T durant 1 hora. Després de rentar amb tampó TBS-T, les cèl·lules es tenyiren amb una solució del 0.02% (v/v) DAPI, 0.1% (v/v) Oregon Green® 488 phalloidin en PBS durant 1 hora. Finalment, el *microarray* es rentà i la superfície un cop seca fou recoberta amb un cobra-portaobjectes utilitzant un medi no fluorescent per fer el muntatge (Aqua-Poly/Mount) i fou observada amb un microscopi de fluorescència inversa (Olympus IX81). Les imatges s'obtingueren amb el programa Cell^R versió 2006 i foren processades amb el programa MacBiophotonics ImageJ. En les imatges s'observa l'actina en verd i els nuclis de les cèl·lules de color blau (vegeu Figura 7.6). Aquest resultat demostrava, per una banda que era possible la captura de cèl·lules HEK293 fent ús d'aquest *microarray* d'anticossos selectius per a l'antigen CD81, però a més, que aquestes cèl·lules un cop capturades, continuaven vives i que per tant en les condicions apropiades, podien continuar creixent i al mateix temps ser capturades pels anticossos, fins arribar a cobrir tota la superfície del *spot*.

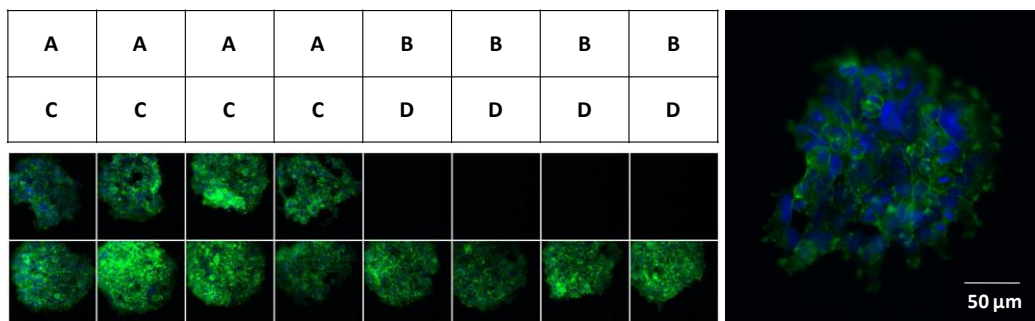


Figura 7.6: Esquerra superior) esquema del diferent contingut de cada un dels spots A) 10 pmols STV-F1 + 10 pmols MAc(anti-CD81)-biotina, B) 10 pmols STV-F5 (control negatiu), C) 10 pmols STV-F9 + 10 pmols MAc(anti-CD81)-biotina i D) 10 pmols STV-F10 + 10 pmols MAc(anti-CD81)-biotina. Esquerra inferior) imatge obtinguda amb el microscopi de fluorescència. Dreta) Imatge en detall d'un spot amb cèl·lules HEK 293 adherides, on s'observen els nuclis (color blau) i l'actina (color verd).

A continuació, es va provar una alternativa per a la visualització de les cèl·lules immobilitzades en el *microarray*, que es basava en l'ús de liposomes fluorescents. Per dur aquesta estratègia a terme es va emprar una solució de liposomes amb sulforodamina B encapsulada i conjugats a estreptavidina, preparats com ha estat descrit anteriorment²⁵⁰⁻²⁵¹. Aquests liposomes tenien addicionalment incorporada en la membrana lipídica un 0.44 mol% (del total de lípids) de Lisamina rodamina B per tal d'oferir un augment en el senyal fluorescent als liposomes intactes, necessari per a moltes aplicacions microscòpiques²⁵¹. Per a l'observació de les cèl·lules un cop fixades utilitzant aquest mètode, s'afegí una solució del conjugat IgG-STV-liposoma-SRB, prèviament preparat preincubant els liposomes fluorescents (STV-liposoma-SRB) i l'anticòs de ratolí biotinitat (anti-CD81). La solució es deixà incubant durant 3 hores amb una lleu agitació a 37 °C (Figura 7.7).

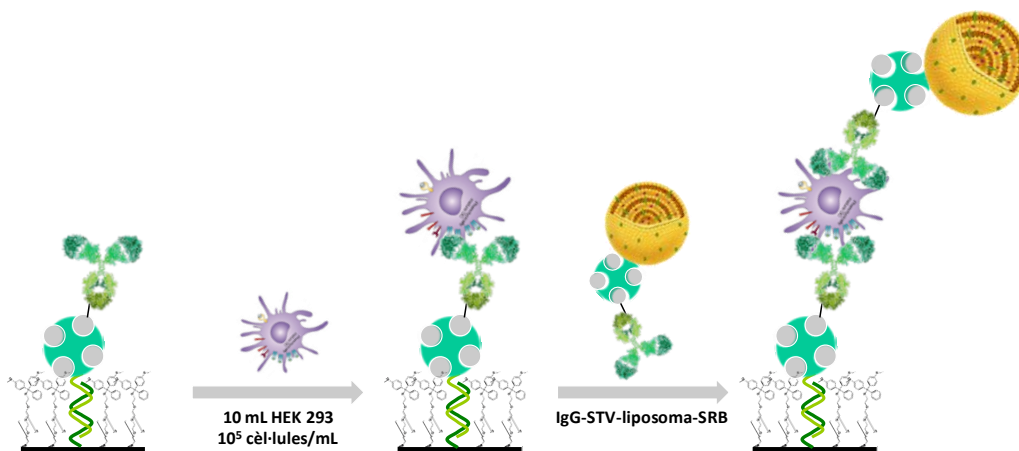


Figura 7.7: Esquema emprat per a la visualització de les cèl·lules en què s'utilitza un format sandvitx, emprant com anticossos de captura i de detecció l'anticòs anti-CD81 en ambdós casos, i liposomes fluorescents bioderivatitzats.

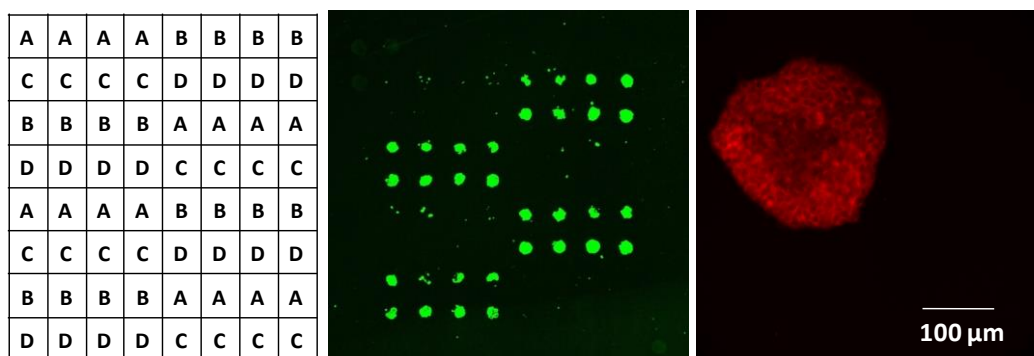


Figura 7.8: Esquerra) Esquema del contingut de cada un dels spots A) 10 pmols STV-F1 + 10 pmols PAc(anti-rabbit IgG)-biotina (control negatiu), B) 10 pmols STV-F5 + 10 pmols MAc(anti-CD81)-biotina, C) 10 pmols STV-F9 (control negatiu) i D) 10 pmols STV-F10 + 10 pmols MAc(anti-CD81)-biotina. Mig) Imatge obtinguda amb un escàner de fluorescència on s'observa en detall un dels spots amb un gran nombre de cèl·lules immobilitzades.

Finalment, la superfície es rentà amb tampó PBS, i un cop seca fou mesurada mitjançant un escàner de fluorescència i fent ús d'un microscopi de fluorescència (Figura 7.8 i Figura 3 de l'article adjunt). Com es pot observar en la Figura 7.8, la immobilització dels liposomes fluorescents fou específica, únicament s'observà fluorescència en aquells *spots* en els que s'havien capturat cèl·lules

HEK293. Aquest mètode de visualització permetia en primer lloc mesurar el *microarray* fent ús del escàner, per tal d'avaluar el resultat general, i en segon lloc, permetia la observació dels *spots* fent ús del microscopi, per tal de veure en detall l'estat de les cèl·lules.

7.2.3 Sistema microfluidic

A continuació, després de demostrar la capacitat de capturar cèl·lules de forma específica fent ús d'un *microarray* d'anticossos en un format d'assaig estàtic, es volgué explorar la possibilitat d'emprar la mateixa aproximació en un sistema microfluidic realitzant l'assaig sota condicions hidrodinàmiques.

En primer lloc es van preparar unes màscares de poli-(dimetil siloxà) (PDMS) que contenen un canal microfluidic. Breument, per tal d'obtenir les màscares de PDMS es combinen dos reactius per tal de preparar un solució de Sylgard 184 (Dow Corning), que després s'utilitza per omplir un motlle de níquel preparat mitjançant tècniques fotolitogràfiques, com ja ha estat prèviament descrit²⁵². A continuació, el motlle s'escalfa durant 15 minuts a 155°C, i després que hagi tingut lloc la polimerització, la màscara es treu del motlle i es tracta amb plasma (1 min, 0.2 mbar) per tal de formar grups silanols (vegeu Figura 7.9, A). Les dimensions de les màscares de PDMS són equivalents a la mida de les superfícies estàndards de vidre emprades en microscòpia ($76 \times 26 \text{ mm}^2$).

Seguidament, la màscara fou fixada sobre la superfície de vidre, amb les cadenes d'oligonucleòtids de captura prèviament immobilitzades, amb l'ajut d'un suport metàl·lic; la màscara s'uneix a la superfície de vidre prèviament activada a través d'enllaços covalents, quedant d'aquesta forma el canal microfluidic perfectament fixat. Les cadenes d'oligonucleòtids havien estat immobilitzades en zones diferenciades prèviament definides sobre la superfície de vidre amb l'ajut d'un dispensador de nanogotes, de tal manera que aquestes zones quedessin dins el canal microfluidic (vegeu Figura 7.9, B).

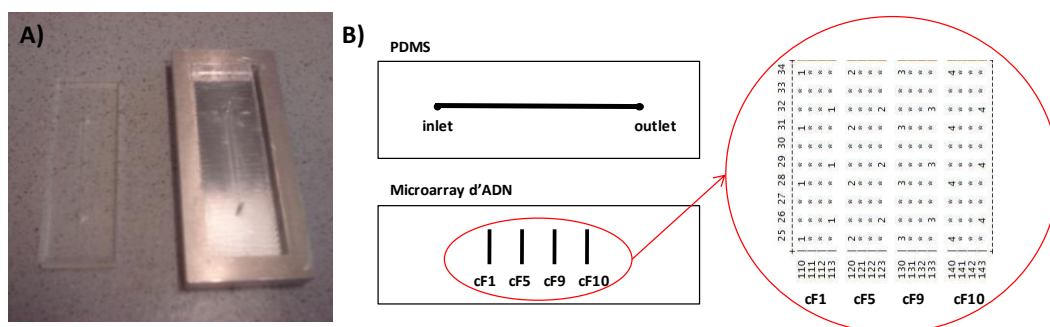


Figura 7.9: (A) Fotografia d'una màscara de PDMS recent preparada i al costat el motlle de níquel que s'utilitza. (B) Esquema d'una màscara de PDMS amb el canal microfluidic i d'una superfície de vidre amb els diferents oligonucleòtids de captura immobilitzats en zones ben diferenciades i pre-establertes.

La immobilització dels diferents conjugats IgG-STV-ADN a l'interior del canal microfluidic es dugué a terme de forma similar a la comentada anteriorment en l'assaig en format estàtic. Després d'haver unit la màscara de PDMS a la superfície del vidre, es van introduir a l'entrada (*inlet*) i a la sortida (*outlet*) del microcanal uns tubs que anaven connectats per una banda a una xeringa per permetria introduir les diferents solucions en el microcanal gràcies a la pressió aplicada per una bomba, i per l'altra a un vas per recollir les solucions al sortir del dispositiu, respectivament (vegeu Figura 7.10).

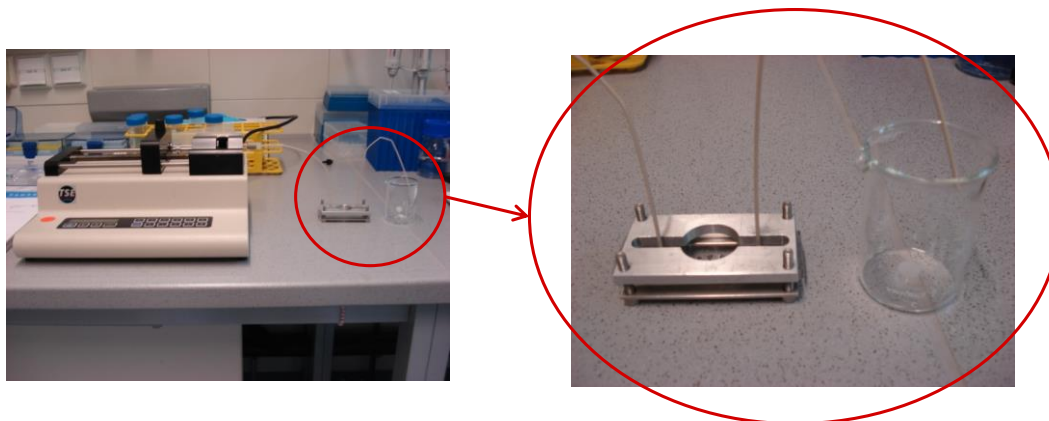


Figura 7.10: Fotografies del format d'assaig microfluidic. En la fotografia de l'esquerra es pot observar la bomba peristàltica, que empeny la xeringa que a través d'un tub microfluidic introdueix la solució en el sistema a través de la zona d'entrada (*inlet*) i després un altre tub microfluidic connectat a la zona de sortida (*outlet*) per on s'elimina la solució restant que va a parar a un recipient de residus. A la fotografia de la dreta, es veu amb més detall el microarray d'ADN que ha estat unit a la màscara de PDMS i com es manté subjecte gràcies a l'ús d'un suport metàl·lic.

Un cop rentat i bloquejat el microcanal amb una solució 100 mM d'amino-dPEG₁₂-ODMT en PBS, s'afegí la solució amb els conjugats IgG-STV-ADN durant 1 hora i mitja a un flux d'1 $\mu\text{L}/\text{min}$. A continuació, s'afegí el conjugat anti-IgG-STV-Cy3 per tal de realitzar les mesures fluorescents. Com es pot observar en el resultats obtinguts a l'escanejar el *microarray* un cop treta la màscara de PDMS (vegeu Figura 7.11), es veu clarament que la immobilització dels anticossos (anti-CD81) havia tingut lloc de forma específica i controlada. El senyal fluorescent que s'observà en les posicions A, C i D era molt superior al de la posició B, el qual podia ser degut a petits problemes d'unió inespecífica entre l'anti-IgG-STV-Cy3 i l'estreptavidina, però en tot cas, aquest fenomen era pràcticament inapreciable. D'igual forma es pot observar en la figura S3, de la informació suplementària de l'article adjunt, com en un experiment similar aquest, però posant els controls en diferents posicions, quedava corroborada l'especificitat de la immobilització.

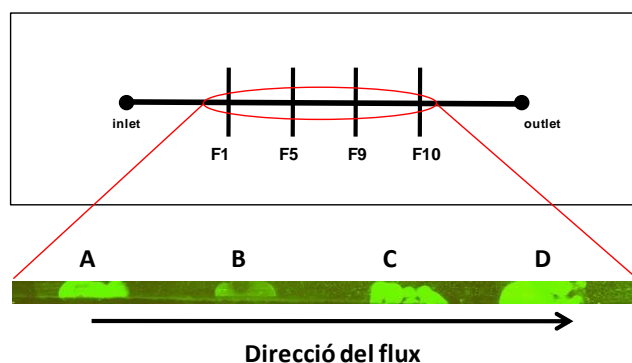


Figura 7.11: Imatge obtinguda amb un escàner de fluorescència d'un microarray microfluidic en el que s'havia immobilitzat: A) 10 pmols STV-F1 + 10 pmols MAc(anti-CD81)-biotina, B) 10 pmols STV-F5 (control negatiu), C) 10 pmols STV-F9 + 10 pmols MAc(anti-CD81)-biotina i D) 10 pmols STV-F10 + 10 pmols MAc(anti-CD81)-biotina.

7.2.3.1 Adhesió cel·lular amb el dispositiu microfluidic

Així doncs, igual que en el format estàtic, el següent pas fou comprovar que els anticossos un cop immobilitzats a l'interior del microcanal, eren capaços en condicions hidrodinàmiques de reconèixer l'antigen CD81 expressat en la membrana cel·lular de les cèl·lules HEK293 i capturar-les a l'interior del microcanal. Així doncs, un cop l'anticòs específic fou immobilitzat en zones discretes a l'interior del canal microfluidic, s'afegí una solució de cèl·lules HEK293 a una densitat de 10^5 cèl·lules/mL en el medi de cultiu D-MEM, amb un contingut de 4.5 g/L glucosa, L-Glutamina, 0.5 g/L NaHCO_3 , 1% (v/v) piruvat sòdic (100 mM,) i 25 mM HEPES, a un flux de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$. La correcta adhesió cel·lular fou controlada a través de l'observació de l'interior del microcanal a temps real amb un microscopi invertit (Observer.A1 Zeiss or Olympus IX81), realitzant fotografies a diferents temps durant un període aproximat de 40 minuts (vegeu Figura 7.12). Com s'observa en les imatges, les cèl·lules únicament quedaven situades en aquelles zones del microcanal on prèviament havia estat immobilitzat l'anticòs específic (F5 i F10), i no hi havia problemes d'unió inespecífica de les cèl·lules ni en les parets del microcanal ni en les zones on no s'havia immobilitzat l'anticòs (F1 i F9) (controls negatius, zones A i C). Per altra banda, també es pot veure com l'adhesió cel·lular tingué lloc de forma ràpida, obtenint regions amb una gran quantitat de cèl·lules immobilitzades, corresponents als *spots* amb l'anticòs anti-CD81 immobilitzat. D'igual forma, en la figura S4 de la informació de suport de l'article adjunt, es pot veure com augmenta la densitat de cèl·lules HEK293 immobilitzades en un *spot* en concret amb el temps.

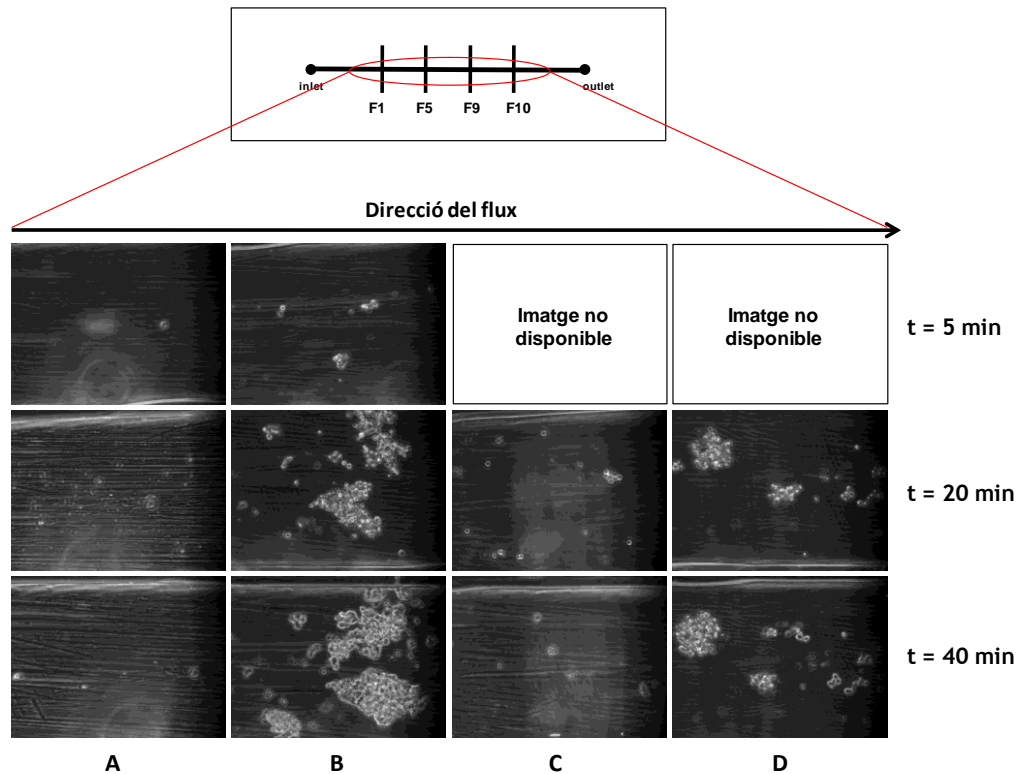


Figura 7.12: Imatges obtingudes a diferents temps amb un microscopi òptic invertit de l'adhesió de les cèl·lules HEK 293 a l'interior del canal microfluidic en el que s'havia immobilitzat en les diferents posicions: A) 10 pmols STV-F1 (control negatiu), B) 10 pmols STV-F5 + 10 pmols MAC(anti-CD81)-biotina, C) 10 pmols STV-F9 (control negatiu) i D) 10 pmols STV-F10 + 10 pmols MAC(anti-CD81)-biotina. Les imatges foren obtingudes després d'estar 40 minuts passant la solució de cèl·lules a 10^5 cèl·lules/mL a un flux de $1 \mu\text{L}/\text{min}$.

D'aquesta forma quedava demostrat que la immobilització d'anticossos específics sobre la superfície d'un *microarray*, mitjançant la hibridació de cadenes d'oligonucleòtids complementàries, ofereix una estratègia molt útil per al desenvolupament de nous sistemes de diferenciació cel·lular. Aquesta estratègia no només ha demostrat ser vàlida i útil per assaigs en condicions estàtiques, sinó que a més funciona en condicions hidrodinàmiques, permetent en aquest últim format reduir notablement la quantitat de mostra necessària i el temps d'assaig.

Posteriorment a la meua estada, la Sra. Stephanie Reisewitz va explorar en el format d'assaig microfluídic, la possibilitat de capturar simultàniament dos tipus de cèl·lules eucariotes, per una banda les cèl·lules HEK293, prèviament emprades com a prova de concepte, que expressen l'antigen CD81 i no l'antigen CD15, i per altra banda, les cèl·lules *Hodgkin lymphoma* (L540cy), que expressen en la seva superfície l'antigen CD15 (*3-fucosyl-N-acetyl-lactosamine*), que es tracta d'un carbohidrat, i no l'antigen CD81. Així doncs, anticossos anti-CD81 i anti-CD15, foren emprats per a la detecció d'aquestes cèl·lules, respectivament, essent preincubats per separat amb els conjugats STV-ADN i posteriorment immobilitzats a l'interior del microcanal a través de la hibridació amb les cadenes d'oligonucleòtids complementàries prèviament immobilitzades en al superfície. Com es pot veure en la figura 5 de l'article adjunt, al afegir una solució de cèl·lules HEK293, s'observaren majoritàriament cèl·lules en aquelles zones en què el corresponent anticòs

(anti-CD81) havia estat immobilitzat. D'igual forma, després d'una etapa de rentat a un flux elevat (5 μ L/min) per eliminar les cèl·lules adherides, s'afegí una solució de cèl·lules L540cy i majoritàriament s'observaren cèl·lules en les zones on l'anticòs específic (anti-CD15) havia estat immobilitzat. Estudis d'adhesió cel·lular realitzats a diferents temps demostraren que l'adhesió de les cèl·les HEK293 era superior a la de les cèl·lules L540cy, i tot i que també es va poder observar unió inespecífica per part de les dues cèl·lules, en tots dos casos, la unió específica era significativament superior.

7.2.4 Publicació relacionada

7.2.4.1 Article 6: *Capture and Culturing of Living Cells on Microstructured DNA Substrates.* S. Reisewitz, H. Schröder, N. Tort, K.A. Edwards, A.J. Baeumer and C.M. Niemeyer. *Small*, Vol. 5, issue 19, 2010, 2162-2168.

Resum de l'article: L'estratègia d'immobilitzar anticossos en una superfície a través de la hibridació de cadenes d'oligonucleòtids complementàries ha estat utilitzada en aquest treball per crear zones de reconeixement específiques per a la diferenciació i el cultiu de cèl·lules eucariotes. Immunoglobulines de tipus G (IgG) biotinilades, amb especificitat per a les proteïnes de membrana CD81 i CD15, foren unides a través de la interacció STV/biotina a conjugats covalents STV-ssADN. Emprant diferents conjugats STV-ssADN, capaços d'hibridar-se de forma específica amb els seus complementaris prèviament immobilitzats en la superfície, fou possible formar matrius d'IgGs específiques per a la captura de cèl·lules human embryonic kidney (HEK293) i Hodgkin lymphoma L540cy, amb els antigens CD81 i CD15, expressats respectivament en la seva superfície. El sistema de captura ha estat investigat en condicions estàtiques, com també en flux, utilitzant com a suport un *microarray* d'ADN. Ambdós formats demostraren ser útils per a la captura específica de cèl·lules ja que les cèl·lules adherides mostraren una morfologia intacte i pogueren ser posteriorment cultivades, fent créixer monocapes denses, restringides a les dimensions laterals dels *spots* d'ADN prèviament formats. També s'ha demostrat que la visualització de les cèl·lules capturades pot tenir lloc mitjançant la tinció clàssica, o a través de la utilització de liposomes fluorescents, els quals contenen sulfo-rodamina B (SRB) en el seu interior i l'IgG específica en la seva superfície.

Capture and Culturing of Living Cells on Microstructured DNA Substrates

Stephanie Reisewitz, Hendrik Schroeder, Nuria Tort, Katie A. Edwards, Antje J. Bäumner, and Christof M. Niemeyer*

A modular system for the DNA-directed immobilization of antibodies was applied to capture living cells on microstructured DNA surfaces. It is demonstrated in two different set-ups, static incubation and hydrodynamic flow, that this approach is well suited for specific capture and selection of cells from culture medium. The adhered cells show intact morphology and they can be cultivated to grow to dense monolayers, restricted to the lateral dimensions of DNA spots on the surface. Owing to the modularity of surface biofunctionalization, the system can readily be configured to serve as a matrix for adhesion and growth of different cells, as demonstrated by specific binding of human embryonic kidney cells (HEK293) and Hodgkin lymphoma L540cy cells onto patches bearing appropriate recognition moieties inside a microfluidic channel. We therefore anticipate that the systems described here should be useful for fundamental research in cell biology or applications in biomedical diagnostics, drug screening, and nanobiotechnology.

1. Introduction

Starting with the evolution of DNA microarrays in the 1990s,^[1] microarray technology has become one of the most important platform technologies for the high-throughput analysis of biological systems.^[2] This approach is nowadays

moving towards the fabrication of peptide and protein arrays to rapidly detect interaction partners, modification sites and enzyme substrates,^[3–7] and also to the arraying of fixed tissue samples^[8] and live cells.^[9,10] To help unraveling complex cellular traits in healthy and diseased states, microarrays can be used to delineate on a molecular level the characteristics of individual cells, even within complex mixtures. Thus, quantitative identification of distinct cell types based on the expression of particular cell surface molecules, as well as analysis of their response to defined signals through the secretion of specific factors or other measurable cellular activities is possible.^[9] Efficient immobilization strategies, which allow for directional and oriented immobilization of small molecules and whole-protein capture probes, are essential to warrant that the immobilized probes retain their undisturbed biological functionality, and therefore an intense development of bioorthogonal coupling chemistry is currently under way.^[7,10]

DNA-directed immobilization (DDI) of oligonucleotide-tagged components on DNA microarrays bearing complementary oligonucleotides is a powerful and chemically mild process, which fulfills the aforementioned requirements. In addition to numerous applications in the area of protein chips for diagnostics,^[11] the DDI method has also been employed for the generation of bioarrays of living cells.^[12] To further advance the latter approach, we here report the specific

Prof. C. M. Niemeyer, Dr. H. Schröder, S. Reisewitz
Technische Universität Dortmund
Fakultät Chemie
Biologisch-Chemische Mikrostrukturtechnik
Otto Hahn Str. 6, 44227 Dortmund, Germany
E-mail: christof.niemeyer@tu-dortmund.de

N. Tort
Applied Molecular Receptors Group (AMRg)
Chemical and Biomolecular Nanotechnology Department (IQAC-CSIC)
Barcelona, Spain

N. Tort
Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería
Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN)
Barcelona, Spain

Dr. K. A. Edwards, Prof. A. J. Bäumner
Department of Biological and Environmental Engineering
Cornell University, Ithaca, NY 14853, USA

DOI: 10.1002/sml.201000776

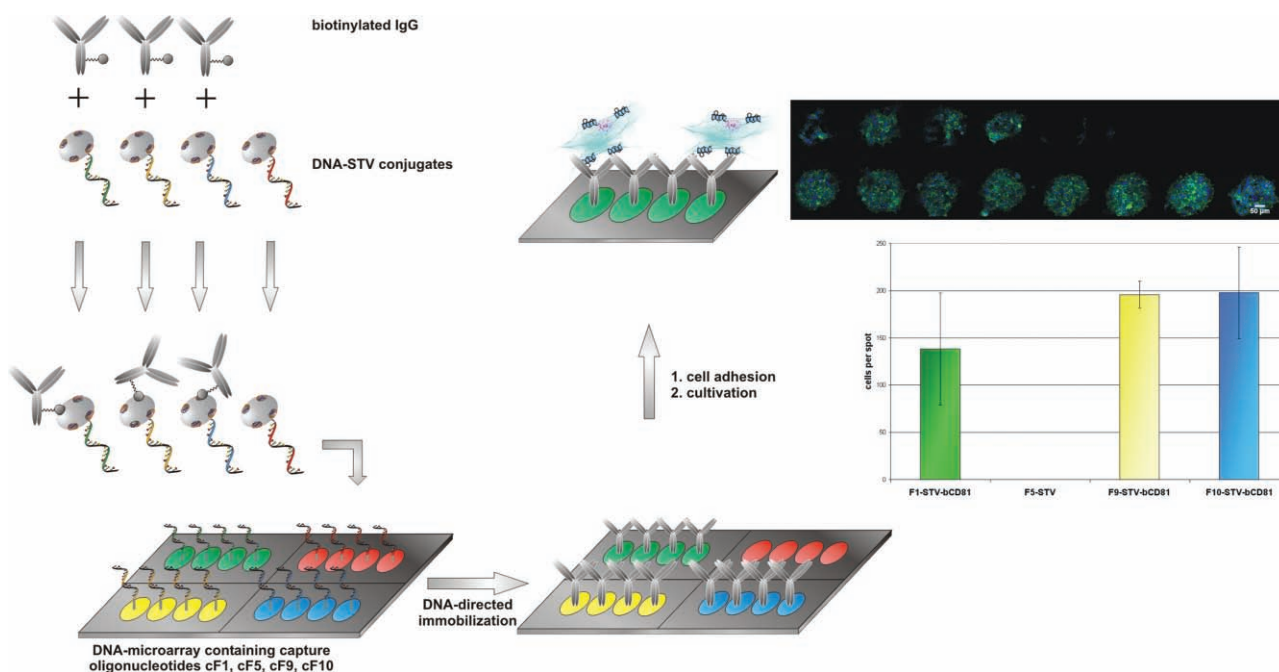


Figure 1. Schematic representation of the generation of live-cell arrays by DNA-directed immobilization of cell-specific mouse-anti-human CD81 IgG (α CD81). The biotinylated IgG is coupled with covalent conjugates of STV and ssDNA (F1-, F5-, F9- and F10-STV), hybridized with a DNA microarray, containing complementary capture oligonucleotides, cF1 (green), cF5 (red), cF9 (yellow), or cF10 (blue), and the resulting array is then used for the adhesion of HEK293 cells. Subsequent to capturing, cells were stained with DAPI and Oregon Green phalloidin. The inset shows a typical array, as visualized by inverse fluorescence microscopy. The bar diagram represents the number of adhered cells on the spots, as determined by the software ImageJ (scalebar = 50 μ m).

capture and subsequent cultivation of eukaryotic cells on microstructured substrates, taking advantage of a highly modular biomolecular assembly system comprised of covalent single-stranded DNA (ssDNA) conjugates of the biotin-binding protein streptavidin (STV) and biotinylated antibodies directed against cell-surface proteins (**Figure 1**). In particular, biotinylated immunoglobulin G (IgG) molecules with specificity for the cell surface proteins CD81 or CD15, in the following denoted as α CD81 or α CD15, respectively, were coupled with covalent ssDNA-STV conjugates by means of biotin-STV interaction. Using different ssDNA-STV conjugates, which contained orthogonal single-stranded DNA oligomers, capable of specific hybridization with their surface-immobilized complements, IgG arrays were generated and used for specific cell capture of living human embryonic kidney cells (HEK293) or Hodgkin lymphoma L540cy cells, expressing CD81 or CD15, respectively, on their surface. Capturing of cells was investigated in a static incubation format using a planar glass-supported DNA microarray as well as in a flow-through format, using a quasi one-dimensional (1D) array of IgG-containing patches inside a microfluidic channel.^[13] Both formats were found to be well suited for specific cell capture and we observed that adhered cells can propagate to form a dense monolayer, restricted to the lateral dimensions of the DNA spots of the array. We also demonstrate that staining of captured cells can be achieved by use of fluorescent liposomes, containing sulforhodamine B (SRB) in their inner cavity and α CD81-IgG recognition units on their outer surface.

2. Cell Capture by Static Incubation

We initially studied the capturing of human embryonic kidney cells (HEK293), which are known to express the 26 kDa cell surface protein CD81.^[14] To this end, an array of four capture oligonucleotides, cF1, cF5, cF9, and cF10, was prepared on glass slides, coated with a chemically activated organic layer of polyamidoamine dendrimers.^[15] The slides contain amino-reactive *N*-hydroxy-succinimide (NHS)-activated carboxylic acid groups, which were used for covalent immobilization of the amino-alkyl-modified capture oligomers cF1-cF10 (Figure 1).^[16] While dendrimer coating has previously been proven to be superior to other surface activation chemistries for DNA- and protein-microarray applications,^[17] the choice of blocking reagent to avoid non-specific adsorption of cells to the surface was less obvious and required optimization. It was found that binding of amino-dPEGTM₁₂-ODMT [1-amino-38-(4, 4'-dimethoxytrityl)-3, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36-undeca-oxa-octatriacontanoate] subsequent to immobilization of capture oligomers led to surface properties, which allowed specific capturing of cells (Figure S1, Supporting Information).^[16]

Surface-immobilized capture oligomers cF1-cF10 were then used for hybridization of a set of covalent ssDNA-STV conjugates, denoted as F1, F5, F9, or F10, coupled with biotinylated α CD81 IgG by high-affinity biotin-STV interaction. Since the specificity of hybridization of F1-F10 with their surface-bound Watson-Crick complements cF1-cF10 has previously been proven,^[18] we coupled three DNA-STV

conjugates (F1, F9, F10) with biotinylated α CD81–IgG to enable triplicate determination, while F5 remained unconjugated to serve as a negative control. It is shown in the inset of Figure 1, that the DDI-based IgG microarray specifically captured HEK293 cells only on spots that contained the α CD81–IgG. Cell binding was neither observed on the spots containing F5 nor on the surrounding surface, thereby demonstrating that surface chemistry and DDI-based probe assembly are well suited for generation of cell microarrays.

We then investigated whether the captured cells are indeed alive and capable of propagation. To this end, cells dispersed in cell-culture medium were allowed to bind to spots bearing the F9– α CD81 conjugate under culturing conditions (cell-culture medium, 37 °C, with mild agitation of 5 rpm to prevent sedimentation) for variable times. It is shown in **Figure 2** that the number of adhered cells steadily increased over time (panels A–C) and incubation overnight led to formation of a densely grown monolayer, restricted to the lateral dimensions of the DNA spots of the array (panel D). Fluorescence microscopy analysis clearly indicated that immobilized cells followed the typical adhesion process, previously observed for cell adhesion,^[19] which includes cell attachment, cell spreading, organization of actin cytoskeleton, and formation of focal adhesion points. The cell body begins to flatten and the plasma membrane spreads over the surface. In addition, cells also show spindle or pyramidal morphology with a well-defined cytoskeleton, as indicated by visible stress fibers within in the cytoplasm and the formation of focal adhesions

(Figure 2, and Figure S2 in the Supporting Information). It is well-known that the transmembrane protein CD81 associates with integrins, which play a key role in the formation of focal adhesions.^[19–21] To the best of our knowledge, however, it has not yet been demonstrated that the binding of eukaryotic cells to surface-bound α CD81–IgG indeed leads to the formation of a well-defined cytoskeleton. Therefore, our results indicate that DDI-based IgG arrays not only are highly suited for specific capture of living cells and that the adhered cells are viable and capable of propagation, but also that this approach is well suited for fundamental studies in cell biology.

To avoid endpoint analysis of captured cell arrays, we tested whether the immobilized cells can be stained in situ by use of fluorescent liposomes, which contain sulforhodamine B (SRB) in their inner cavity and α CD81–IgG conjugated via STV–biotin linkage on their outer surface. Due to the large internal volume, these liposomes serve as sensitive signaling reagents in immunoassays with comparable detection limits to enzyme immunoassays (EIA) and radioimmunoassay (RIA) without enzymatic amplification or radiolabeling, and they have therefore been used in a wide range of applications, such as DNA, messenger RNA (mRNA) or protein detection.^[22–25] Here, we used the SRB-liposomes to stain cells, which had previously been immobilized on an array, configured similar as described in Figure 1. Subsequent to cell capture, the SRB-liposomes were allowed to bind to immobilized cells followed by a short rinse to remove unbound materials.

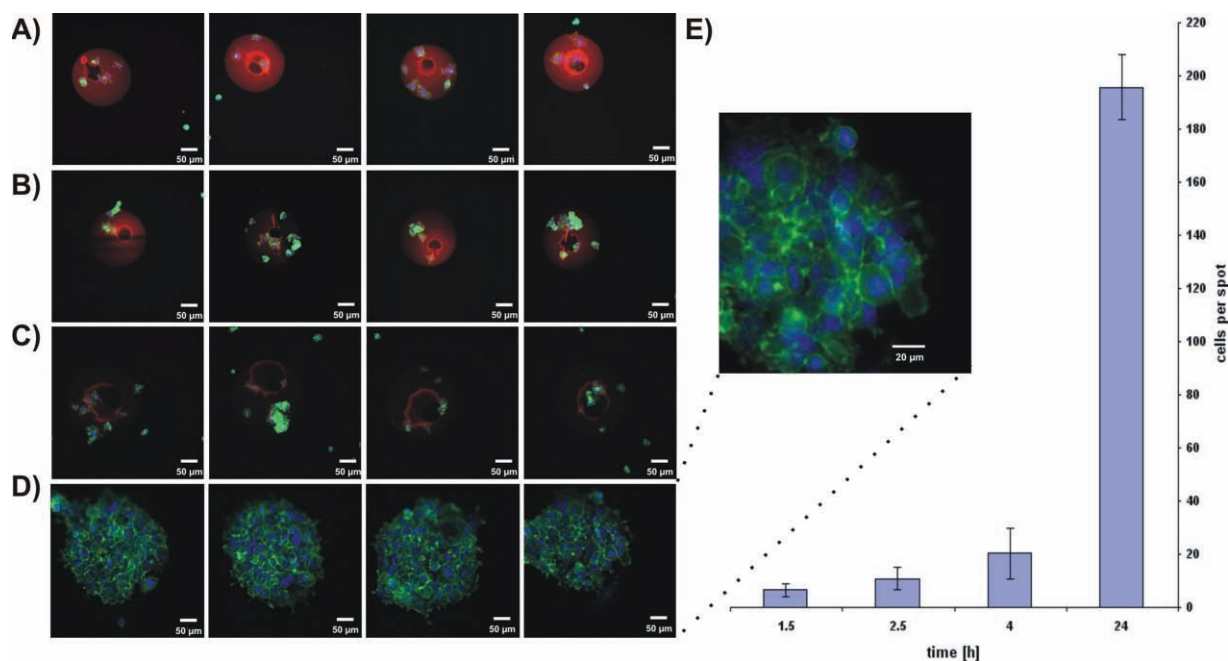


Figure 2. Time-dependent capturing and cultivation of human embryonic kidney cells on spots of a DNA–IgG-microarray bearing F9– α CD81. Cells were allowed to bind and grow for 1.5 h (A), 2.5 h (B), 4 h (C), or 24 h (D). The bar diagram in (E) represents the number of adhered cells per spot at different time points. Cells were stained with DAPI and Oregon Green phalloidin and imaged by inverse fluorescence microscopy. The color of the spots results from the Cy5-labeled DNA to visualize where the DNA–STV–IgG conjugate was bound. The higher-magnification image (inset) clearly shows the typical morphology of adhered cells to their cell ligand. The typical formation of focal adhesions is shown in Figure S2, Supporting Information.

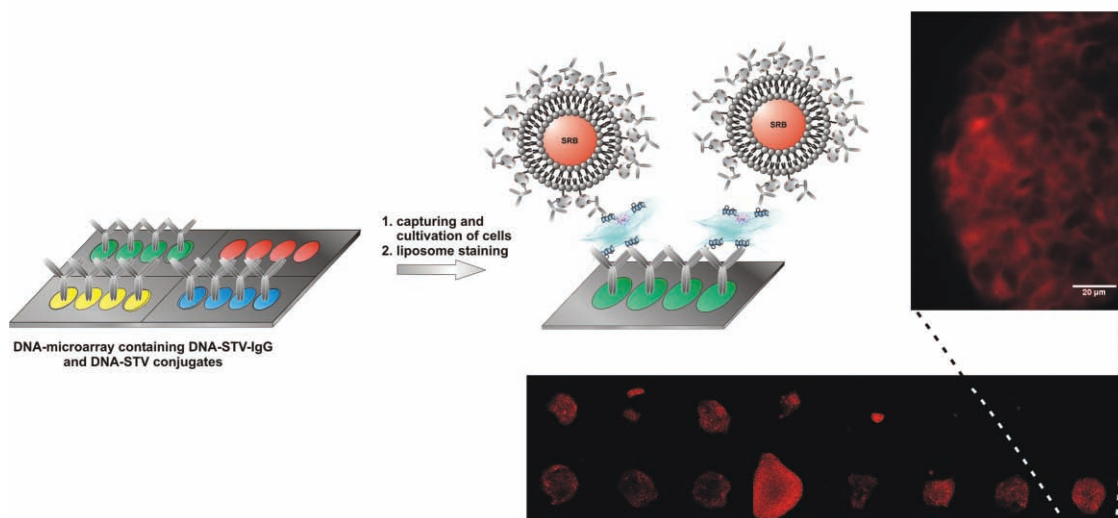


Figure 3. Detection of immobilized cells on a microarray using fluorescent liposomes, containing SRB in their inner cavity and α CD81-IgG, conjugated via STV-biotin linkage on their outer surface. The configuration of the DNA-IgG microarray is similar as depicted in Figure 1. The microscope image shows a representative array subsequent to cell capture, cultivation and liposome staining (scale bar = 50 μ m). The high-magnification image shows intact cell morphology, suggesting that cells are viable after immobilization and liposome staining.

It is shown in **Figure 3**, that intense red spots at the expected positions of the array indicate both presence of immobilized cells and successful staining with the α CD81-conjugated liposomes. Furthermore high-magnification fluorescence images (inset in Figure 3) clearly showed intact cell morphology, suggesting that cells are viable after immobilization and liposome staining.

3. Microfluidic Cell Capture

Cell capture was also investigated under hydrodynamic flow conditions inside a microfluidic channel which contained patches presenting the α CD81- and α CD15-IgG. This microfluidic polymer chip consists of a PDMS substrate containing a microfluidic channel and inlet/outlet ports, mounted on top of a glass slide bearing a DNA microarray to enable IgG binding by means of DDI (**Figure 4A**). The fabrication of this addressable microfluidic chip for DDI-based applications has previously been described,^[13] and we here used chips which contained four ssDNA patches (cF1, cF5, cF9, or cF10), arranged in a quasi-1D order (Figure S3, Supporting Information). We initially configured the microfluidic chip with F5-STV- α CD81 and F10-STV- α CD81 conjugates to study the capture of HEK293 cells, while positions cF1 and cF9 were modified with F1-STV and F9-STV as controls. It was clearly observed that HEK293 cells were only captured on patches containing the α CD81-IgG, while basically no adhesion was observed on the control patches (Figure 4B). Time course experiments revealed that adhesion occurred rapidly and led to densely packed cell monolayers (Figure 4C). Since no such monolayers were observable on control patches bearing F1-STV and F9-STV (Figure S4, Supporting Information), these experiments confirmed that DDI-based antibody arrays are well suited for microfluidic cell capturing.

Interestingly, it was observed the cells were captured efficiently even at high flow rates up to 1 μ L min^{-1} , while higher flow rates led to significant decrease of immobilization rates. Moreover, visual inspection of microscopy images indicated that cells preferentially adhered to sides within the spots where cells were already present. This suggests that connectivity between cells plays an important role and is maintained under the hydrodynamic flow conditions in this system.

We then investigated whether microfluidic cell capturing can be used for specific immobilization of two different cell types at distinctive patches inside the linear fluid channel (**Figure 5**). To this end, two patches of the array were functionalized with either F5-STV- α CD81 or F10-STV- α CD15 conjugates. The latter contained an IgG with binding specificity for cell surface protein CD15, which is not expressed on HEK293 cells. In contrast, human Hodgkin lymphoma L540cy cells express CD15, while they lack expression of CD81 on their surface.^[26] In a first experiment, medium containing HEK293 cells was flushed through the channel and cell adhesion was clearly observable on the patch containing F5-STV- α CD81, while significant lesser cells were captured on the patch containing F10-STV- α CD15 (Figure 5B, upper panel). Interestingly, brief washing of the channel with sterile PBS buffer at 5 μ L min^{-1} led to complete removal of bound cells (Figure 5B, middle panel), thus suggesting that this approach of cell capture and release might be useful for preparative cell separation. Next, medium-containing L540cy cells was flushed through the channel. This led to cell adhesion on the patch containing F10-STV- α CD15, while basically no cells were captured on the patch containing F5-STV- α CD81 (Figure 5B, lower panel). These results were confirmed by time course experiments (Figure 5C), which indicated that HEK293 cells adhere significantly faster on patches bearing α CD81 than on those with α CD15, respectively. Moreover, these experiments also revealed a faster binding of

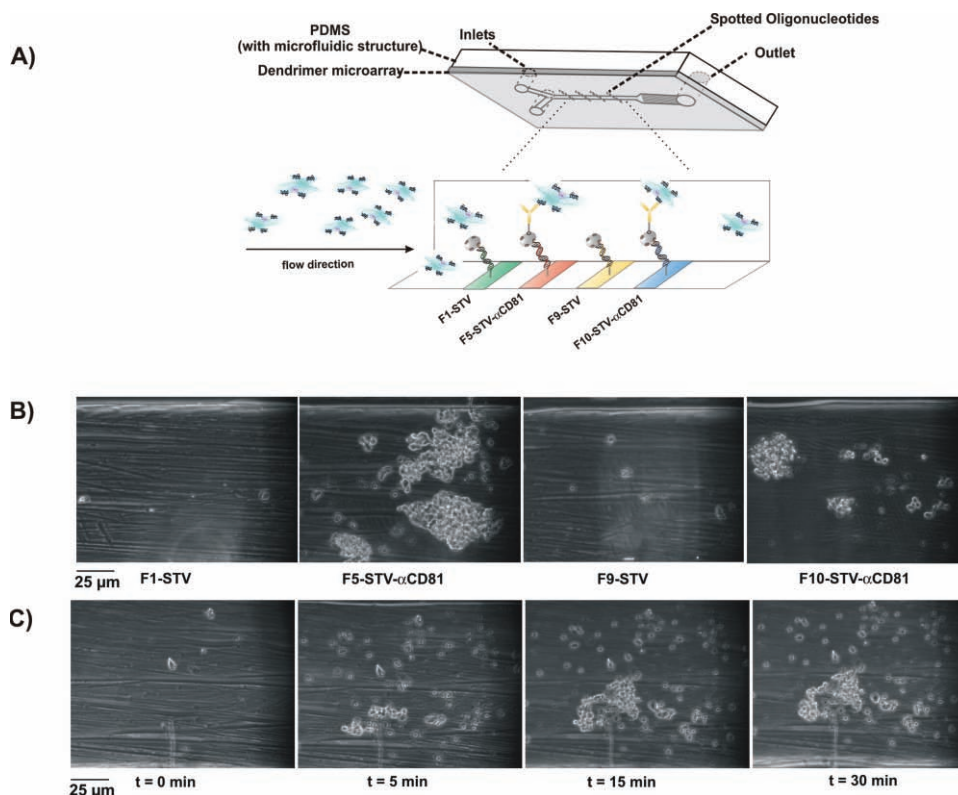


Figure 4. Cell-capture experiments of living HEK cells by cell-specific IgG capture probes inside a microfluidic channel. A) Schematic illustration of the configuration of the linear capture array inside the microchannel. Lines of capture oligonucleotides were spotted with a microarray prior to bonding of the PDMS substrate, containing the microfluidic channel and inlet/outlet ports. Immobilization of DNA-STV- α CD81 conjugates via DDI and cell capture were conducted under flow conditions. B) Representative microscope images of adhered HEK cells. Note that cell adhesion occurred only on patches containing DNA-STV- α CD81 (F5, F10) but not on patches containing DNA-STV only (F1, F9), which represent negative controls. C) Representative images of time-dependent HEK cell adhesion on patch F5, containing DNA-STV- α CD81 conjugate.

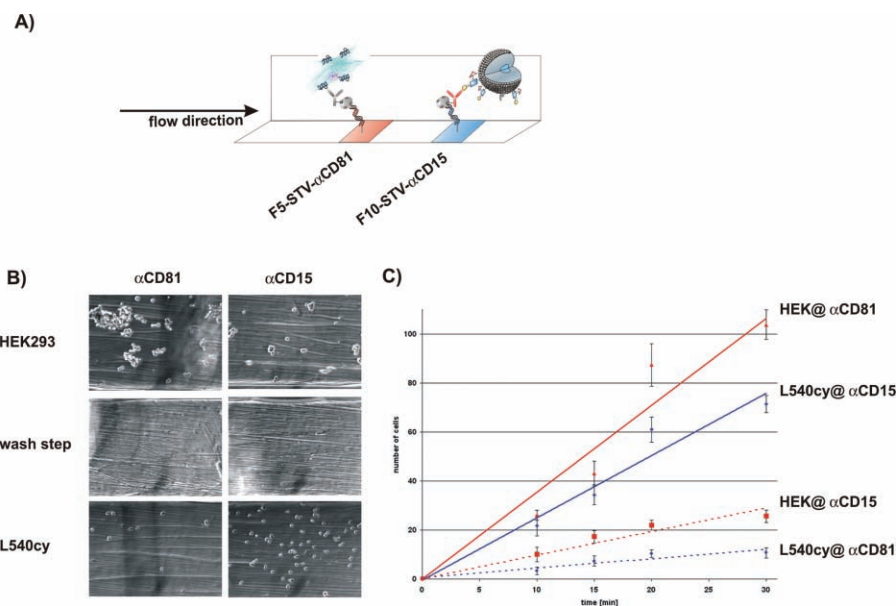


Figure 5. A) Schematic drawing of capturing HEK293 and human Hodgkin lymphoma L540cy cells under flow conditions inside a microfluidic channel, containing patches of DNA-STV- α CD81 (F5, specific against CD81 expressed on HEK293 cells) and DNA-STV- α CD15 (F10, specific against CD15 expressed on L540cy cells). B) Representative microscope images of adhered HEK and L540cy cells on spots containing α CD15 (left) or α CD81 (right) after 20 min of binding. Note that the intermittent washing step with buffer leads to complete removal of adhered cells. C) Time-dependency of cell adhesion of either HEK293 (red traces) or L540cy (blue traces) cells at the two patches bearing α CD81 or α CD15 IgG, respectively. Note that cells bind with significant higher efficiency to patches containing the specific antibody (continuous lines) than to those bearing the nonspecific IgG (dashed lines).

HEK293 cells to α CD81-IgG than binding of L540cy cells to α CD15-IgG. It should also be noted that cells could be successfully cultured inside the microchannel (Figure S5, Supporting Information), thereby again confirming that surface chemistry and general set-up of the system are well suited for selection and propagation of living cells.

4. Conclusion

In conclusion, we here demonstrate that DNA-directed immobilization of antibodies by means of ssDNA-STV conjugates on dendrimer-modified glass substrates provides a versatile route to readily generate arrays of living cells. It is shown in two different set-ups, static incubation and hydrodynamic flow, that this approach is well suited for specific capture of cells from culture medium. The adhered cells show intact morphology, they are viable and can propagate to form a densely grown monolayer, restricted to the lateral dimensions of the DNA spots inside the array. Owing to the modularity of surface functionalization by means of the DDI technique and the ssDNA-STV conjugates, this cell capture system can readily be configured to serve as a matrix for adhesion and growth of different cells, as demonstrated by specific binding of HEK293 and human Hodgkin lymphoma L540cy cells on patches bearing appropriate recognition moieties inside a microfluidic channel. By using DNA microarrays for the controlled immobilization of combinatorial libraries of cell-specific ligands, positionally encoded cell arrays can be generated, containing individual spots colonized by small populations of live cells. Given the possibility to selectively bind cells to DNA surfaces, the employment of DNA arrays as capture matrix should open up ways to the design of cell arrays by taking advantage of self-assembled DNA nanoarchitecture.^[27,28] This would allow implementation of additional functionality, such as switchable release by alteration of the physicochemical properties of the employed surfaces. We therefore anticipate that the systems described here should be useful for fundamental research in cell biology or applications in biomedical diagnostics, drug screening, and nanobiotechnology.

Supporting Information

Supporting Information is available from the Wiley Online Library or from the author.

Acknowledgements

This work was supported by International Max-Planck Research School in Chemical Biology (IMPRS-CB), Dortmund, and Max-Planck Society (Max-Planck Fellowship to C.M.N.). We are grateful to Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) for a Mercator Exchange Professorship, and Alexander von Humboldt Foundation for a Research

Fellowship to A.J.B. N.T. thanks CIBER-BBN and the Spanish Ministry of Science and Innovation for a mobility support grant (DEP2007-73224-C03-01) as well as Prof. Pilar Marco and the Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació la Generalitat de Catalunya (expedient 2009SGR 1343) for generous support. We thank Prof. Stefan Barth, Aachen, for kind donation of the Hodgkin lymphoma L540cy cell line.

- [1] M. C. Pirrung, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1276; *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1326.
- [2] J. Sobek, K. Bartscherer, A. Jacob, J. D. Hoheisel, P. Angenendt, *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2006**, *9*, 365.
- [3] M. F. Templin, D. Stoll, M. Schrenk, P. C. Traub, C. F. Vohringer, T. O. Joos, *Trends Biotechnol.* **2002**, *20*, 160.
- [4] E. Phizicky, P. I. Bastiaens, H. Zhu, M. Snyder, S. Fields, *Nature* **2003**, *422*, 208.
- [5] D. S. Yeo, R. C. Panicker, L. P. Tan, S. Q. Yao, *Comb. Chem. High Throughput. Screen.* **2004**, *7*, 213.
- [6] K. Y. Tomizaki, K. Usui, H. Mihara, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 782.
- [7] P. Jonkheijm, D. Weinrich, H. Schroeder, C. M. Niemeyer, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9618; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 9762.
- [8] T. Braunschweig, J. Y. Chung, S. M. Hewitt, *Expert Rev. Proteomics* **2005**, *2*, 325.
- [9] D. S. Chen, M. M. Davis, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 28.
- [10] D. Weinrich, P. Jonkheijm, C. M. Niemeyer, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7744; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7880.
- [11] C. M. Niemeyer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1200; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 1220.
- [12] a) R. A. Chandra, E. S. Douglas, R. A. Mathies, C. R. Bertozzi, M. B. Francis, *Angew Chem Int Ed Engl* **2006**, *45*, 896; b) E. S. Douglas, R. A. Chandra, C. R. Bertozzi, R. A. Mathies, M. B. Francis, *Lab Chip* **2007**, *7*, 1442; c) R. C. Bailey, G. A. Kwong, C. G. Radu, O. N. Witte, J. R. Heath, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1959; d) H. Schroeder, B. Ellinger, C. F. W. Becker, H. Waldmann, C. M. Niemeyer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4180; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 4258; e) R. Fan, O. Vermesh, A. Srivastava, B. K. Yen, L. Qin, H. Ahmad, G. A. Kwong, C. C. Liu, J. Gould, L. Hood, J. R. Heath, *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 1373; f) E. S. Douglas, S. C. Hsiao, H. Onoe, C. R. Bertozzi, M. B. Francis, R. A. Mathies, *Lab Chip* **2009**, *9*, 2010.
- [13] H. Schroeder, L. Hoffmann, J. Müller, P. Alhorn, M. Flegler, A. Neyer, C. M. Niemeyer, *Small* **2009**, *5*, 1547.
- [14] S. Levy, S. C. Todd, H. T. Maecker, *Annu. Rev. Immunol.* **1998**, *16*, 89.
- [15] R. Benters, C. M. Niemeyer, D. Wöhrle, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 686.
- [16] Detailed experimental protocols for DDI procedure, microarray and fluid-chip configuration, cell capture assays, and cell staining procedures are available in the Supporting Information.
- [17] For examples, see: R. Benters, C. M. Niemeyer, D. Drutschmann, D. Blohm, D. Wöhrle, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, E10; P. Angenendt, J. Glokler, J. Sobek, H. Lehrach, D. J. Cahill, *J. Chromatogr. A* **2003**, *1009*, 97; M. Koehn, R. Wacker, C. Peters, H. Schroeder, L. Soulere, R. Breinbauer, C. M. Niemeyer, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5830; *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 6010; A. Watzke, M. Koehn, M. Giutierrez-Rodriguez, R. Wacker, H. Schroeder, R. Breinbauer, J. Kuhlmann, K. Alexandrov, C. M. Niemeyer, R. S. Goody, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1408; *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1436; A. Dantas de Araújo, J. M. Palomoa, J. Cramer, M. Koehn, H. Schroeder, R. Wacker, C. M. Niemeyer, K. Alexandrov, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 296; *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 302; A. Watzke, M. Giutierrez-Rodriguez,

- M. Koehn, R. Wacker, H. Schroeder, R. Breinbauer, J. Kuhlmann, K. Alexandrov, C. M. Niemeyer, R. S. Goody, H. Waldmann, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6288; P. K. Ajikumar, J. K. Ng, Y. C. Tang, J. Y. Lee, G. Stephanopoulos, H. P. Too, *Langmuir* **2007**, *23*, 5670; P. Jonkheijm, D. Weinrich, M. Köhn, H. Engelkamp, P. C. M. Christianen, J. Kuhlmann, J. C. Maan, D. Nüsse, H. Schroeder, R. Wacker, R. Breinbauer, C. M. Niemeyer, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 4421; D. Weinrich, P. C. Lin, P. Jonkheijm, U. T. Nguyen, H. Schroeder, C. M. Niemeyer, K. Alexandrov, R. Goody, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1252; D. Weinrich, M. Kohn, P. Jonkheijm, U. Westerlind, L. Dehmelt, H. Engelkamp, P. C. Christianen, J. Kuhlmann, J. C. Maan, D. Nüsse, H. Schroeder, R. Wacker, E. Voges, R. Breinbauer, H. Kunz, C. M. Niemeyer, H. Waldmann, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 235.
- [18] H. Schroeder, M. Adler, K. Gerigk, B. Müller-Chorus, F. Götz, C. M. Niemeyer, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 1275.
- [19] U. Hersel, C. Dahmen, H. Kessler, *Biomaterials* **2003**, *24*, 4385.
- [20] B. A. Mannion, F. Berditchevski, S. K. Kraeft, L. B. Chen, M. E. Hemler, *J. Immunol.* **1996**, *157*, 2039.
- [21] Y. Chang, S. C. Finnemann, *J. Cell Sci.* **2007**, *120*, 3053.
- [22] H. A. Rongen, A. Bult, W. P. van Bennekom, *J. Immunol. Methods* **1997**, *204*, 105.
- [23] K. A. Edwards, A. J. Baeumner, *Talanta* **2006**, *68*, 1421.
- [24] K. A. Edwards, F. Duan, A. J. Baeumner, J. C. March, *Anal. Biochem.* **2008**, *380*, 59.
- [25] K. A. Edwards, K. L. Curtis, J. L. Sailor, A. J. Baeumner, *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 1689.
- [26] T. Kudo, Y. Ikehara, A. Togayachi, M. Kaneko, T. Hiraga, K. Sasaki, H. Narimatsu, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 26729.
- [27] N. C. Seeman, *Nature* **2003**, *421*, 427.
- [28] U. Feldkamp, C. M. Niemeyer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1856; *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1888.

Received: May 7, 2010

Published online: August 20, 2010

Capture and Culturing of Living Cells on Microstructured DNA-Substrates**

Stephanie Reisewitz,¹ Hendrik Schroeder,¹ Nuria Tort,² Katie A. Edwards,³ Antje J. Baeumner,³ and Christof M. Niemeyer^{1*}

Supporting Information

Experimental procedures

Preparation of DNA-STV conjugates: The synthesis and purification of the four covalent DNA-STV conjugates (F1, F5, F9 and F10) was carried out using the corresponding thiolated oligonucleotides (tF1, tF5, tF9 and tF10, Table 1, Sigma Aldrich) and Streptavidin, as described previously.^[1] In brief, STV (10 nmol) was derivatized with maleimido-groups using a heterobispecific crosslinker (sulfo-SMCC, Pierce), reacted with the thiolated oligonucleotide (10 nmol) and subsequently purified by anion-exchange chromatography. The one-to-one molar ratio of oligonucleotide and protein moiety of the conjugate was verified by gel-electrophoretic and photometric analysis, and its concentration was determined by absorbance measurements.^[2]

Table 1: Thiolated oligonucleotides for the generation of DNA-protein conjugates and the amino modified complementary capture oligomers. The sequences are shown in the 5'-3' direction

Name	Sequence	Modification
tF1	CCT GCG TCG TTT AAG GAA GTA C	5' thio link (C6)
tF5	GGT CCG GTC ATA AAGCGA TAA G	5' thio link (C6)
tF9	GTG GAA AGT GGC AAT CGT GAA G	5' thio link (C6)
tF10	GGA CGAATA CAA AGG CTA CAC G	5' thio link (C6)
cF1	GTA CTT CCT TAA ACG ACG CAG G	5' amino link (C6)
cF5	CTT ATC GCT TTA TGA CCG GAC C	5' amino link (C6)
cF9	CTT CAC GAT TGC CAC TTT CCA C	5' amino link (C6)
cF10	CGT GTA GCC TTT GTA TTC GTC C	5' amino link (C6)
dT12-cF1	TTT TTT TTT TTT GTA CTT CCT TAA ACG ACG CAG G	5' amino link (C6)
dT12-cF5	TTT TTT TTT TTT CTT ATC GCT TTA TGA CCG GAC C	5' amino link (C6)
dT12-cF9	TTT TTT TTT TTT CTT CAC GAT TGC CAC TTT CCA C	5' amino link (C6)
dT12-cF10	TTT TTT TTT TTT CGT GTA GCC TTT GTA TTC GTC C	5' amino link (C6)

Preparation of IgG conjugates: Coupling of the DNA-STV conjugates F1-F10 and the biotinylated antibodies mouse-anti-human CD81 (anell) or mouse-anti-human CD15 (antikörper-online) was achieved by mixing 0.01 mM stock solution of the conjugate in buffer A (10 mM Tris buffer, pH 7.4, 1 mM EDTA) and equimolar amounts (0.01 mM stock solution) of the biotinylated antibodies in PBS (150 mM NaCl, 3, 5 mM NaH₂PO₄, 8 mM Na₂HPO₄, pH 7.3). After incubation for 15 minutes at room temperature the mixture was diluted to 500 nM with buffer B (20 mM Tris buffer, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.05 % (w/v) Tween-20 and 800 μM biotin) or 10 μM biotinAtto647 (Atto-Tec) to yield dye labeled DNA-protein conjugates. Following incubation for another 15 minutes, the DNA-STV-IgG conjugates were mixed to a final concentration of 25 nM each in buffer B.

Preparation of SRB-liposome conjugates: 150 mM sulforhodamine B-encapsulating liposomes conjugated to streptavidin were prepared as described previously.^[3] These liposomes additionally incorporated 0.44 mol% (of total lipid) Lissamine rhodamine PE (Avanti Polar Lipids) in the lipid bilayer to provide the enhanced fluorescence of intact liposomes needed for microscopy applications.^[3] Adducts of the SRB-liposome-STV conjugates and the biotinylated antibodies mouse-anti-human CD81 (anell) were prepared by mixing 0.75 μl liposomes-STV (3.326 mM phospholipid) and 1.5 μl of the biotinylated antibodies (1 mg/ml) in buffer C (0.2 M sucrose, 0.2 M NaCl, 10 mM HEPES, pH 7.5, 0.01 % (w/v) sodium azide. After incubation for 15 minutes at room temperature the mixtures were

diluted to 500 nM with buffer B (20 mM Tris buffer, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.05 % (w/v) Tween-20 and 800 μ M biotin). Following incubation for another 15 minutes, the liposome-STV-IgG conjugates were diluted to a final concentration of 25 nM each corresponding to the STV-IgG conjugate in buffer B.

Preparation of DNA microarrays: For the attachment of the capture oligonucleotides (cF1-cF10 and dT12cF1-dT12cF10, Table 1) complementary to the DNA-STV-IgG conjugates, a solution of the 5' amino-modified oligonucleotides in water (0.4 nl, 10 μ M, Sigma-Aldrich; for sequences, see Table 1) was spotted onto dendrimer-activated slides, prepared as previously described,^[4] by using a piezo driven spotting device (GESIM, Dresden). The slides were incubated overnight and subsequently stored at -20°C until use.

DNA-directed immobilization (DDI): To reduce non-specific binding of reagents and cells to the glass substrate (see also Figure S1), the DNA microarray was pretreated for 2 h with 100 mM amino-dPEG₁₂-ODMT (30 μ l) (Quantas) and subsequently dried by centrifugation using a microscope slide holder (Erie Scientific). Adhesive hybridization chambers (VWR) were fixed on top of the slide, and 30 μ l of the DNA-STV-IgG conjugate solution (25 nM), prepared as described above, were allowed to hybridize for 120 minutes at room temperature in a humidity chamber (VWR). After removing the chambers the slides were washed once with double distilled water and sterile PBS under sterile conditions.

Cell cultivation and adhesion studies: HEK (Human Embryonic Kidney) 293 cells were cultured in D-MEM media (Pan-Biotech GmbH), supplemented with 4.5 g/l glucose, 3.7 g/l NaHCO₃, 1 % (v/v) sodium-pyruvate (100 mM, Sigma-Aldrich), 1 % (v/v) penicillin-streptomycin solution (100 mM, Sigma-Aldrich) and 10 % (v/v), FBS (Pan-Biotech GmbH) at 37°C and 5 % CO₂. L540cy cells were cultured in RPMI 1640 media (Pan-Biotech GmbH), supplemented 2.0 g/l NaHCO₃, 1 % (v/v) sodium-pyruvate (100 mM, Sigma-Aldrich), 1 % (v/v) penicillin-streptomycin solution (100 mM, Sigma-Aldrich) and 10 % (v/v) FBS (Pan-Biotech GmbH) at 37°C and 5 % CO₂. HEK cells were plated at a density of 10⁵ cells/ml in D-MEM containing 4.5 g/l glucose, 0.5 g/l NaHCO₃, 1 % (v/v) sodium-pyruvate and 25 mM HEPES on the above described microarray slides and incubated at 37°C, 3 rpm on a tumbling shaker (Polymax 1040, Heidolph). For time-dependent capturing and cultivation experiments of HEK cells on DNA-IgG-microarrays, the cells were incubated on the microarrays for variable times. Subsequent to incubation, adhered cells were either carefully

washed with sterile PBS to remove loosely attached cells and subsequently fixed and stained, or else fresh D-MEM was added to facilitate culturing of bound cells by incubation overnight at 37°C, 5 % CO₂.

Fixation and staining of HEK cells: Subsequent to growth, cells were washed two times with sterile PBS for 10 min and subsequently fixed with fixation buffer (100 mM K-Pipes, containing 37% (v/v) formaldehyde, 10 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 0.1 % (v/v) TX-100) in water for 20 min. The fixed cells were washed two times with PBS for 10 min and blocked with 2 % (w/v) BSA (Sigma) in TBS-T for one hour. After renewed washing with TBS-T, the cells were stained either with 50 µl 0.02 % (v/v) DAPI, 0.1 % (v/v) Oregon Green[®] 488 phalloidin (Invitrogen) for at least one hour, or else with 50 µl liposome-STV-IgG conjugates, prepared as described above, for three hours under slow agitation. To visualize focal adhesion points, the cells were also stained with rabbit-anti-Vinculin (5 µg/ml; Sigma) for 1 h and subsequently incubated for 30 min, 37°C with goat-anti-rabbit IgG-Cy5 (5 µg/ml; Rockland). The arrays were then washed either with PBS or HSS buffer, double distilled water and then dried by centrifugation. Glass slides were covered with coverslips using AquaPolymount (Polyscience Inc.) and imaged with an inverse fluorescence microscope (Olympus IX81). Images were taken with the software Cell[^]R version 2006 and processed with MacBiophotonics ImageJ software. For clarity the actin is shown in green, nuclei are stained with DAPI (blue) and focal adhesion points are shown in red (Cy5).

Preparation of PDMS substrates for microfluidic device: The PDMS substrate was generated by the replica casting technique using polydimethylsiloxane, similar as described earlier.^[5] In brief, the PDMS substrate containing the microfluidic channels were prepared using a prepolymer solution of Sylgard 184 (Dow Corning), which was poured onto the nickel master, evacuated in vacuum, and cured at 150°C for 20 min. After curing, the PDMS substrate was demolded from the master and treated with plasma (1 min, 0.2 mbar) for generation of siloxane-groups on the PDMS. Subsequently to plasma treatment, the PDMS substrate was fixed to the slide by a metal holder.

Microfluidic cell capturing: Immobilization of DNA-STV-IgG inside the microfluidic system was carried out, similar as described for the DDI experiments. After fixing the PDMS substrate to the surface of the spotted microarray, the microchannel was washed with sterile PBS using a syringe stepper pump (TSE Systems, Bad Homburg, Germany) with a flow rate

of 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ for 15 minutes. To allow for the bubble free filling, the microfluidic channel was initially filled with buffer solution and subsequently 10^6 cells/ml were added at a flow rate of 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ for about 30 min. Adhesion of cells was followed by observation with an inverse microscope (Observer.A1 Zeiss or Olympus IX81). Pictures were taken during a time period of 30 minutes. For cultivation inside the channel, the microfluidic system was filled with D-MEM containing 4.5 g/l glucose, 0.5 g/l NaHCO_3 , 1 % (v/v) sodium-pyruvate and 25 mM HEPES at a flowrate of 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ at 37°C over 14 h.

Figure S1:

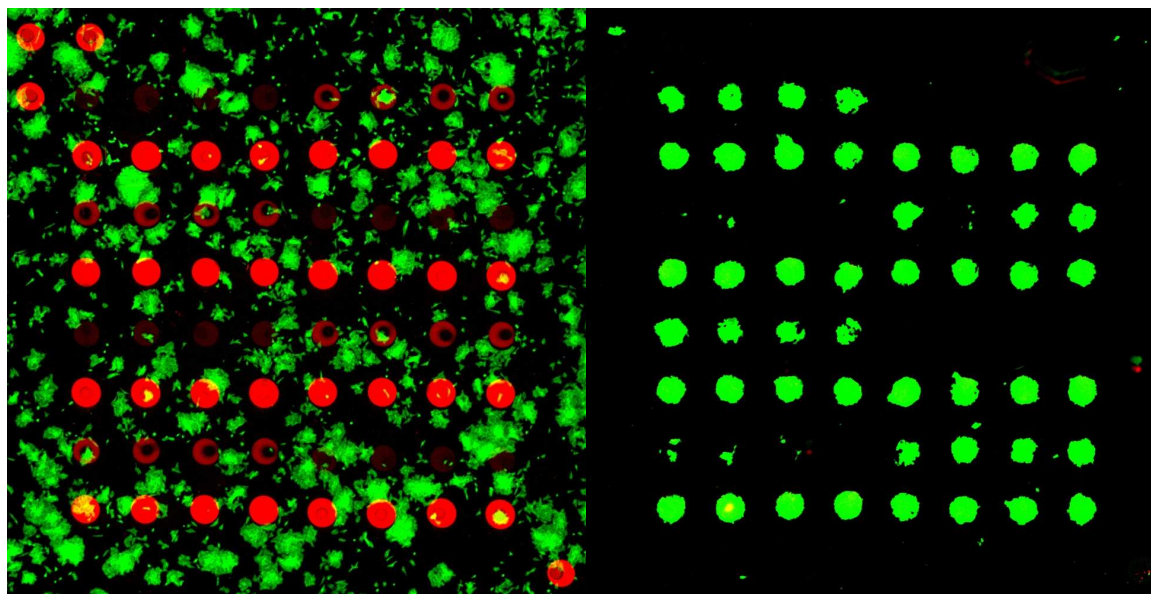


Figure S1: Optimization of blocking conditions of DNA microarrays used for cell immobilization. The images show representative slides after cell adhesion. The slide on the left hand side was blocked with conventional milk-powder/DNA buffer, while the slide on the right hand side was blocked with 100 mM amino-dPEG₁₂-ODMT. Note that the red color of the spots results from the Cy5-labeled DNA to indicate where the complementary DNA-STV-IgG conjugate was hybridized. The left image clearly indicates a high degree of non-specific binding of HEK293 cells on the entire surface. In contrast, cell binding exclusively occurred on spots containing the DNA-STV-IgG conjugates on the right hand image. The cells were stained with Oregon Green® phalloidin and imaged with a Genepix 4000B microarray scanner (Axon) with setting the PMT gain to 500 and 100 % laser power. The spot size is 250 μm .

Figure S2

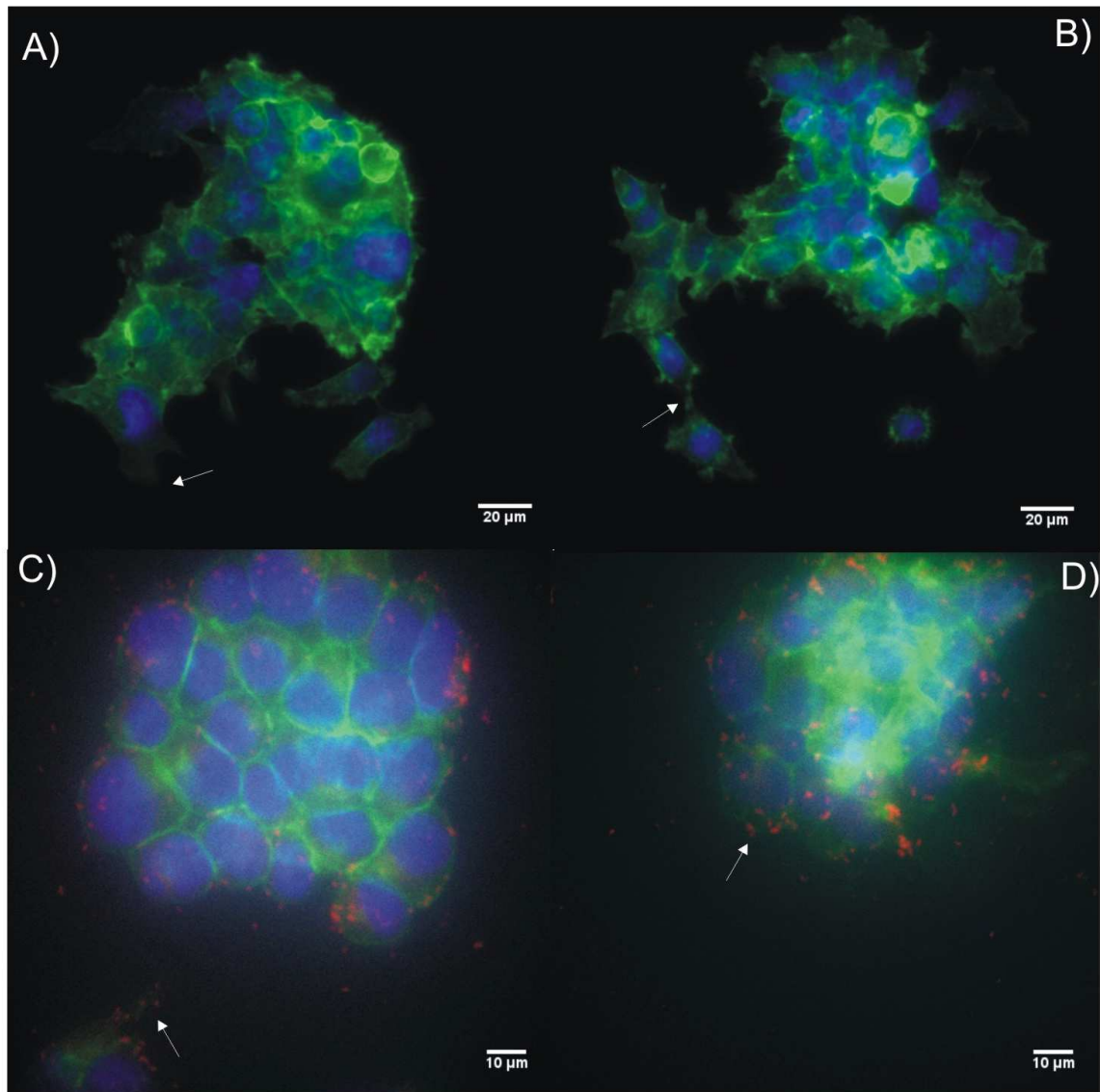


Figure S2: Representative images of captured human embryonic kidney cells after 24 hours of cultivation. In A) and B) cells were stained with DAPI and Oregon Green® phalloidin imaged by inverse fluorescence microscopy (40x). Note the typical flattened morphology and formation of lamellipodia of the adhered cells (white arrows). C, D: Cells were additionally stained with rabbit-anti-Vinculin and goat-anti-rabbit IgG-Cy5 (red), imaged by inverse fluorescence microscopy (60x) in order to visualize focal adhesion points.

Figure S3

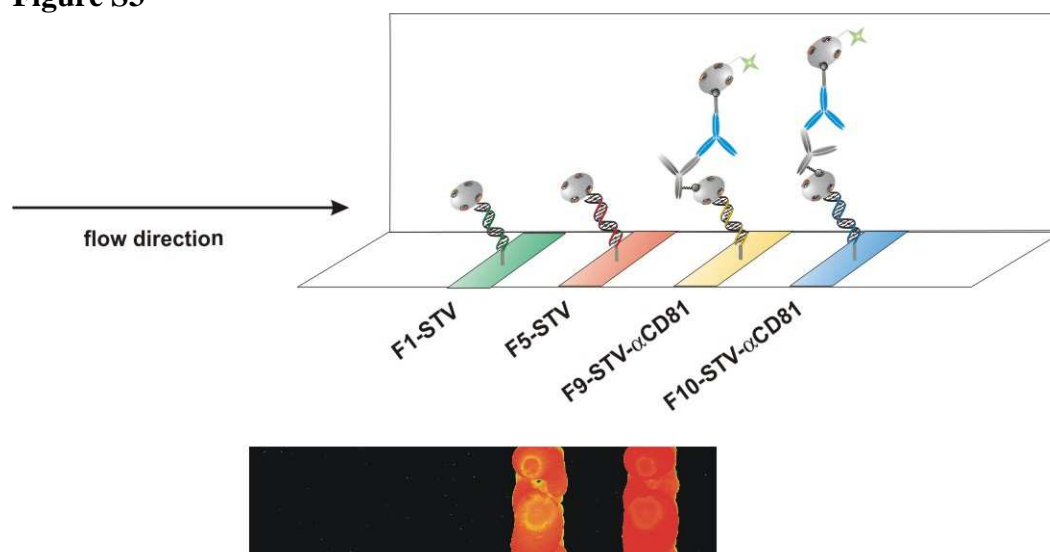


Figure S3: Illustration of the assembly of a microfluidic chip for cell capture experiments, depicted in Figures 4 and 5. Hybridization of the DNA-STV conjugates F1-STV ($c_f = 25$ nM), F5-STV ($c_f = 25$ nM), F9-STV- α CD81 (coupling ratio 1:4, $c_f = 25$ nM) and F10-STV- α CD81 (ratio: 1:4, $c_f = 25$ nM) under hydrodynamic flow conditions was followed by staining with an anti-mouse-IgG-STV-Cy3 ($c_f = 25$ nM) conjugate. Cy3 fluorescence was detected using a Genepix 4000B microarray scanner (Axon) with setting the PMT gain to 500 and 100 % laser power.

Figure S4

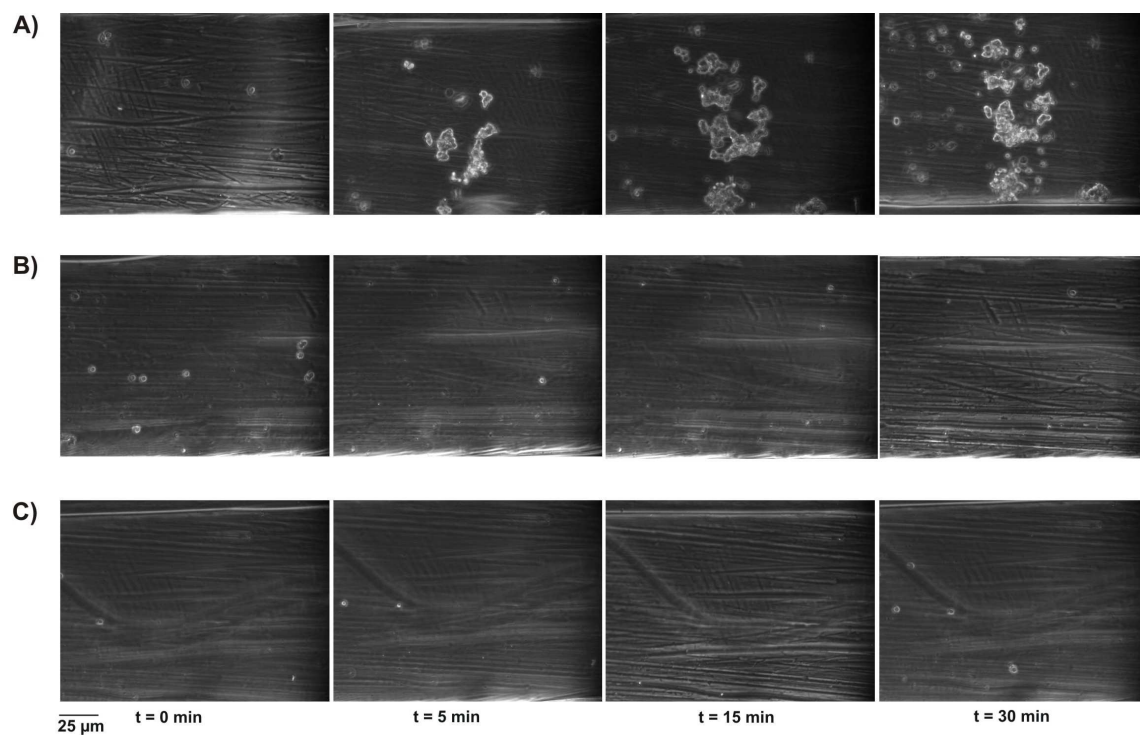


Figure S4: Cell capture experiments with living HEK cells by cell-specific IgG probes inside a microfluidic channel. The images were obtained in the course of experiments, similar as described for those in Figure 4 and 5. They illustrate the adhesion behaviour of HEK cells at patches containing F10-STV- α CD81 (panel A), F1-STV (B), or F9-STV (C).

Figure S5

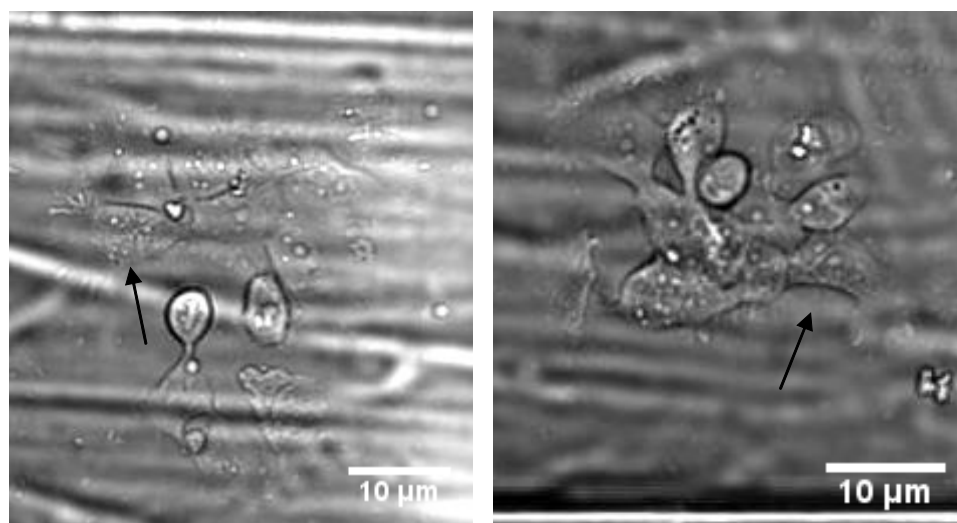


Figure S5: Cell capture experiments of living HEK cells subsequent to capturing inside a microfluidic channel. Captured HEK cells adhered on DNA-STV- α CD81 were cultivated in medium overnight and imaged by inverse microscopy. The cells show typical flattened cell bodies along with a spreading of the plasma membrane (black arrows). Note that the grooves and striations in the background stem from the glass substrate at the bottom of the microfluidic device.

References

- [1] R. Wacker, C. M. Niemeyer, in D. E. Bergstrom (Ed.): *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, Vol. Supplement 21*, John Wiley & Sons 2005, p. 12.17.11-12.17.15.
- [2] C. M. Niemeyer, T. Sano, C. L. Smith, C. R. Cantor, *Nucl. Acids Res.* **1994**, *22*, 5530-5539.
- [3] K. A. Edwards, K. L. Curtis, J. L. Sailor, A. J. Baeumner, *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 1689-1702.
- [4] R. Benters, C. M. Niemeyer, D. Wöhrle, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 686-694.
- [5] H. Schroeder, L. Hoffmann, J. Müller, P. Alhorn, M. Fleger, A. Neyer, C. M. Niemeyer, *Small* **2009**, *5*, 1547-1552.

7.3 Resum de les aportacions principals del capítol

- Ha quedat demostrat que *microarrays* d'anticossos, preparats mitjançant el seu direccionament en la superfície a través de la hibridació de cadenes d'oligonucleòtids, permeten capturar cèl·lules eucariotes vives de forma específica, essent possible la seva propagació un cop adherides en la superfície.
- Aquesta plataforma demostra la universalitat de l'estratègia DDI, ja que tot i que en aquest cas el *microarray* d'anticossos ha estat emprat per a la detecció de cèl·lules, també podria ser aplicat simultàniament per a la detecció d'altres proteïnes o molècules de baix pes molecular.
- La capacitat de poder separar de forma específica i localitzada diferents cèl·lules presents en una mostra complexa, i per tant identificar-les en funció de la seva posició, obre les portes a poder estudiar el comportament i reacció envers condicions externes de cada una d'elles de forma simultània. Aquesta plataforma, per tant, es presenta com una nova eina que pot ser de gran utilitat en estudis cel·lulars i en la búsqueda de nous fàrmacs.

8. CONCLUSIONS

- La combinació d'emprar els diferents perfils d'especificitat dels anticossos utilitzats en diferents ELISAs per a la multidetecció d'un més ampli nombre d'analits, juntament amb l'ús de tècniques quimiomètriques durant el tractament de dades, es presenta com una nova bona metodologia per facilitar la identificació de compostos estructuralment relacionats. Essent aquesta metodologia extrapolable a qualsevol mètode de detecció multiplexat on puguin haver-hi fenòmens de cooperativitat o reactivitat creuada degut a l'ús d'anticossos amb àmplis perfils d'especificitat.
- S'ha posat de manifest que l'ELISA en comparació amb el FLISA, és la tècnica immunoquímica en format microplaca, de les emprades en aquesta tesi, que ha donat millors valors de detectabilitat. Tot i que cal remarcar, que els valors de detectabilitat obtinguts en els FLISAs amb detecció indirecte fent ús d'un anticòs secundari marcat amb un fluoròfor orgànic, sense l'amplificació que dona l'enzim en l'ELISA, no han quedat gaire lluny dels valors obtinguts en els respectius ELISAs, i a més ha estat possible reduir el temps d'anàlisi al eliminar una etapa en l'assaig. Per tant, el FLISA amb detecció indirecte es presenta com una bona alternativa a l'ELISA per a la immunodetecció d'analits de baix pes molecular.
- D'igual forma, amb el *microarray* d'haptens desenvolupat i posteriorment emprat per a la immunodetecció fluorescent d'AAS, s'ha demostrat que tot i que els valors de detectabilitat obtinguts eren lleugerament superiors als obtinguts en l'ELISA multianalític, per contra, a més de permetre reduir el temps d'assaig considerablement envers l'ELISA,

aquesta plataforma permet l'anàlisi de moltes mostres a la vegada, i per a la detecció de molts analits simultàniament en cada una d'elles.

- La preparació de superfícies nanoestructurades i biofuncionals mitjançant el DDI de nanopartícules d'or biohíbrides i multifuncionals, ofereix una alternativa més econòmica i ràpida per a la creació de transductors òptics per a sensors LSPR, en comparació a les tècniques nanolitogràfiques generalment emprades. Amb l'avantatge de poder ser regenerats amb una simple etapa de deshibridació.
- Ha quedat demostrat que és possible la immobilització de cèl·lules eucariotes de forma selectiva sobre superfícies sòlides emprant un *microarray* d'anticossos específics contra proteïnes de membrana cel·lular, prèviament preparat mitjançant l'estratègia DDI. Amb aquesta estratègia, les cèl·lules un cop immobilitzades mantenen les seves funcions vitals, i ha estat possible el seu creixement controlat en base a les dimensions dels *spots* corresponents.
- La estratègia DDI ha demostrat la seva versatilitat ja que ens ha permès immobilitzar des d'haptens (conjugats haptè-oligonucleòtid) o anticossos biotinats (conjugats STV-ADN) a nanopartícules d'or (conjugats AuNP-ADN), sobre superfícies tan d'or en el primer cas, com de vidre en tots els tres casos, per a la preparació de plataformes universals cada una amb una finalitat totalment diferent. En el primer cas, per un costat s'ha desenvolupat un *microarray* d'haptens per a l'immunoanàlisi multiplexat d'AAS amb detecció fluorescent, i per l'altre s'ha demostrat la possibilitat de desenvolupar un sensor SPRi per a la multidetecció d'AAS, per tal d'evitar l'ús de marcadors; en el segon cas, s'ha desenvolupat un *microarray* d'anticossos per a la diferenciació cel·lular; i en el tercer i últim cas, s'han preparat transductors òptics basats en la ressonància del plasmó de les nanopartícules d'or immobilitzades en la superfície.
- La universalitat de l'estratègia DDI també s'ha posat de manifest al poder emprar el mateix *microarray* d'ADN (plataforma universal), pel desenvolupament d'un *microarray* d'haptens com pel desenvolupament d'un transductor òptic, simplement canviant el/s conjugat/s a hibridar en la plataforma.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Ekins, R., Ligand assays: from electrophoresis to miniaturized microarrays. *Clin Chem* **1998**, *44* (9), 2015-2030.
2. Kricka, L. J., Miniaturization of analytical systems. *Clin Chem* **1998**, *44* (9), 2008-2014.
3. Lipman, N. S., et al., Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. *ILAR Journal* **2005**, *46* (3), 258-268.
4. Hanly, W. C., et al., Review of Polyclonal Antibody Production Procedures in Mammals and Poultry. *ILAR Journal* **1995**, *37* (3).
5. Marco, M.-P., et al., Immunochemical techniques for environmental analysis II. Antibody production and immunoassay development. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **1995**, *14* (8), 415-425.
6. Marco, M. P.; Barcelo, D., Environmental applications of analytical biosensors. *Measurement Science and Technology* **1996**, *7*, 1547-1562.
7. Price, C. P.; Newman, D. J., *Principles and Practice of Immunoassay. 2nd Edition*. London: Macmillan, 1997.
8. Yalow, R. S.; Berson, S. A., Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *The Journal of Clinical Investigation* **1960**, *39* (7), 1157-1175.
9. Yalow, R. S., Radioimmunoassay: A Probe for Fine Structure of Biologic Systems (Nobel Lecture). **1977**.
10. Hammock, B. D.; Mumma, R. O., Potential of Immunochemical Technology for Pesticide Analysis. In *Pesticide Analytical Methodology*, American Chemical Society: 1980; Vol. 136, pp 321-352.
11. Hampl, J., et al., Upconverting Phosphor Reporters in Immunochromatographic Assays. *Analytical biochemistry* **2001**, *288* (2), 176-187.
12. Harma, H., et al., Europium Nanoparticles and Time-resolved Fluorescence for Ultrasensitive Detection of Prostate-specific Antigen. *Clin Chem* **2001**, *47* (3), 561-568.

13. Campbell, K., et al., Development and Validation of a Lateral Flow Device for the Detection of Nicarbazin Contamination in Poultry Feeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, 55 (6), 2497-2503.
14. Leuvering, J. H. W., et al., A sol particle agglutination assay for human chorionic gonadotrophin. *Journal of Immunological Methods* **1981**, 45 (2), 183-194.
15. Aldus, C. F., et al., Principles of some novel rapid dipstick methods for detection and characterization of verotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology* **2003**, 95 (2), 380-389.
16. Gabaldón, J. A., et al., Determination of atrazine and carbaryl pesticide residues in vegetable samples using a multianalyte dipstick immunoassay format. *Food Addit Contam* **2003**, 20 (8), 707-15.
17. Litos, I. K., et al., Multianalyte, dipstick-type, nanoparticle-based DNA biosensor for visual genotyping of single-nucleotide polymorphisms. *Biosensors and Bioelectronics* **2009**, 24 (10), 3135-3139.
18. Salvador, J.-P., et al., Application of bioassays/biosensors for the analysis of pharmaceuticals in environmental samples. In *Analysis, fate and removal of pharmaceuticals in the water cycle*, Barceló, D., Ed. 2007.
19. Hock, B., Antibodies for immunosensors a review. *Analytica Chimica Acta* **1997**, 347 (1-2), 177-186.
20. Marco, M.-P., et al., Immunochemical techniques for environmental analysis I. Immunosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **1995**, 14 (7), 341-350.
21. de la Escosura-Muñiz, A.; Merkoçi, A., Nanochannels Preparation and Application in Biosensing. *ACS Nano* **2012**, 6 (9), 7556-7583.
22. Doria, G., et al., Noble Metal Nanoparticles for Biosensing Applications. *Sensors* **2012**, 12 (2), 1657-1687.
23. Lei, J.; Ju, H., Signal amplification using functional nanomaterials for biosensing. *Chemical Society Reviews* **2012**, 41 (6), 2122-2134.
24. Matlock-Colangelo, L.; Baeumner, A. J., Recent progress in the design of nanofiber-based biosensing devices. *Lab on a Chip* **2012**, 12 (15), 2612-2620.
25. Tamayo, J., et al., Biosensors based on nanomechanical systems. *Chemical Society Reviews* **2013**, 42 (3), 1287-1311.
26. Campbell, C. T.; Kim, G., SPR microscopy and its applications to high-throughput analyses of biomolecular binding events and their kinetics. *Biomaterials* **2007**, 28 (15), 2380-2392.
27. Fan, X., et al., Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review. *Analytica Chimica Acta* **2008**, 620 (1-2), 8-26.
28. Homola, J., et al., Surface plasmon resonance sensors: review. *Sensors and Actuators B: Chemical* **1999**, 54 (1-2), 3-15.
29. Fernandez, F., et al., Portable Surface Plasmon Resonance Immunosensor for the Detection of Fluoroquinolone Antibiotic Residues in Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59** (9), 5036-5043.

30. Mizuta, Y., et al., Development of an oligo(ethylene glycol)-based SPR immunosensor for TNT detection. *Biosensors and Bioelectronics* **2008**, *24* (2), 191-197.
31. Boozer, C., et al., Looking towards label-free biomolecular interaction analysis in a high-throughput format: a review of new surface plasmon resonance technologies. *Current Opinion in Biotechnology* **2006**, *17* (4), 400-405.
32. Fernandez, F., et al., A label-free and portable multichannel surface plasmon resonance immunosensor for on site analysis of antibiotics in milk samples. *Biosensors and Bioelectronics* **26** (4), 1231-1238.
33. Yuan, J., et al., Sensitivity enhancement of SPR assay of progesterone based on mixed self-assembled monolayers using nanogold particles. *Biosensors and Bioelectronics* **2007**, *23* (1), 144-148.
34. Fernandez, F., et al., Nanogold probe enhanced Surface Plasmon Resonance immunosensor for improved detection of antibiotic residues. *Biosensors and Bioelectronics* **34** (1), 151-158.
35. Mitchell, J. S.; Lowe, T. E., Ultrasensitive detection of testosterone using conjugate linker technology in a nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* **2009**, *24* (7), 2177-2183.
36. Yuan, J., et al., Surface Plasmon Resonance Assay for Chloramphenicol. *Analytical Chemistry* **2008**, *80* (21), 8329-8333.
37. Li, Y., et al., Detection of Protein Biomarkers Using RNA Aptamer Microarrays and Enzymatically Amplified Surface Plasmon Resonance Imaging. *Analytical Chemistry* **2007**, *79* (3), 1082-1088.
38. Liu, Y., et al., Highly Sensitive Detection of Protein Toxins by Surface Plasmon Resonance with Biotinylation-Based Inline Atom Transfer Radical Polymerization Amplification. *Analytical Chemistry* **82** (9), 3679-3685.
39. Lisboa, P., et al., Sensitivity Enhancement of Surface-Plasmon Resonance Imaging by Nanoarrayed Organothiols. *Advanced Materials* **2008**, *20* (12), 2352-2358.
40. Bolduc, O. R.; Masson, J.-F., Advances in Surface Plasmon Resonance Sensing with Nanoparticles and Thin Films: Nanomaterials, Surface Chemistry, and Hybrid Plasmonic Techniques. *Analytical Chemistry* **83** (21), 8057-8062.
41. Wegner, G. J., et al., Characterization and optimization of peptide arrays for the study of epitope-antibody interactions using surface plasmon resonance imaging. *Analytical Chemistry* **2002**, *74* (20), 5161-5168.
42. Lee, H. J., et al., Surface Plasmon Resonance Imaging Measurements of Antibody Arrays for the Multiplexed Detection of Low Molecular Weight Protein Biomarkers. *Analytical Chemistry* **2006**, *78* (18), 6504-6510.
43. Ladd, J., et al., Hybrid Surface Platform for the Simultaneous Detection of Proteins and DNAs Using a Surface Plasmon Resonance Imaging Sensor. *Analytical Chemistry* **2008**, *80* (11), 4231-4236.
44. Rebe Raz, S., et al., Label-Free and Multiplex Detection of Antibiotic Residues in Milk Using Imaging Surface Plasmon Resonance-Based Immunosensor. *Analytical Chemistry* **2009**, *81* (18), 7743-7749.

45. Willets, K. A.; Van Duyne, R. P., Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing. *Annual Review of Physical Chemistry* **2007**, *58* (1), 267-297.
46. Mayer, K. M.; Hafner, J. H., Localized Surface Plasmon Resonance Sensors. *Chemical Reviews* **2011**, *111* (6), 3828-3857.
47. Murray, W. A.; Barnes, W. L., Plasmonic Materials. *Advanced Materials* **2007**, *19* (22), 3771-3782.
48. Jain, P. K., et al., Calculated Absorption and Scattering Properties of Gold Nanoparticles of Different Size, Shape, and Composition: Applications in Biological Imaging and Biomedicine. *The Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110* (14), 7238-7248.
49. Link, S.; El-Sayed, M. A., Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B* **1999**, *103* (21), 4212-4217.
50. Link, S.; El-Sayed, M. A., Simulation of the Optical Absorption Spectra of Gold Nanorods as a Function of Their Aspect Ratio and the Effect of the Medium Dielectric Constant. *The Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109* (20), 10531-10532.
51. Lee, K.-S.; El-Sayed, M. A., Gold and Silver Nanoparticles in Sensing and Imaging: Sensitivity of Plasmon Response to Size, Shape, and Metal Composition. *The Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110* (39), 19220-19225.
52. Miller, M. M.; Lazarides, A. A., Sensitivity of Metal Nanoparticle Surface Plasmon Resonance to the Dielectric Environment. *The Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109* (46), 21556-21565.
53. Chen, H., et al., Shape- and Size-Dependent Refractive Index Sensitivity of Gold Nanoparticles. *Langmuir* **2008**, *24* (10), 5233-5237.
54. Sherry, L. J., et al., Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy of Single Silver Nanocubes. *Nano Letters* **2005**, *5* (10), 2034-2038.
55. Nehl, C. L., et al., Optical Properties of Star-Shaped Gold Nanoparticles. *Nano Letters* **2006**, *6* (4), 683-688.
56. Sherry, L. J., et al., Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy of Single Silver Triangular Nanoprisms. *Nano Letters* **2006**, *6* (9), 2060-2065.
57. Liu, M.; Guyot-Sionnest, P., Mechanism of Silver(I)-Assisted Growth of Gold Nanorods and Bipyramids. *The Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109* (47), 22192-22200.
58. Bukasov, R.; Shumaker-Parry, J. S., Highly Tunable Infrared Extinction Properties of Gold Nanocrescents. *Nano Letters* **2007**, *7* (5), 1113-1118.
59. Kelly, K. L., et al., The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *The Journal of Physical Chemistry B* **2002**, *107* (3), 668-677.
60. McMahon, J. M., et al., Correlating the Structure, Optical Spectra, and Electrodynamics of Single Silver Nanocubes. *The Journal of Physical Chemistry C* **2009**, *113* (7), 2731-2735.
61. Haes, A. J., et al., Solution-Phase, Triangular Ag Nanotriangles Fabricated by Nanosphere Lithography. *The Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109* (22), 11158-11162.
62. Reinhard, B. r. M., et al., Calibration of Dynamic Molecular Rulers Based on Plasmon Coupling between Gold Nanoparticles. *Nano Letters* **2005**, *5* (11), 2246-2252.

63. Sonnichsen, C., et al., A molecular ruler based on plasmon coupling of single gold and silver nanoparticles. *Nat Biotech* **2005**, *23* (6), 741-745.
64. Haes, A. J., et al., A Localized Surface Plasmon Resonance Biosensor: First Steps toward an Assay for Alzheimer's Disease. *Nano Letters* **2004**, *4* (6), 1029-1034.
65. Fujiwara, K., et al., Measurement of antibody binding to protein immobilized on gold nanoparticles by localized surface plasmon spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2006**, *386* (3), 639-644.
66. Kreuzer, M., et al., Colloidal-based localized surface plasmon resonance (LSPR) biosensor for the quantitative determination of stanozolol. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2008**, *391* (5), 1813-1820.
67. Kreuzer, M. P., et al., Quantitative detection of doping substances by a localised surface plasmon sensor. *Biosensors and Bioelectronics* **2006**, *21* (7), 1345-1349.
68. Endo, T., et al., Multiple Label-Free Detection of Antigen–Antibody Reaction Using Localized Surface Plasmon Resonance-Based Core–Shell Structured Nanoparticle Layer Nanochip. *Analytical Chemistry* **2006**, *78* (18), 6465-6475.
69. Hall, W. P., et al., LSPR Biosensor Signal Enhancement Using Nanoparticle–Antibody Conjugates. *The Journal of Physical Chemistry C* **2011**, *115* (5), 1410-1414.
70. Ekins, R., et al., Development of microspot multi-analyte ratiometric immunoassay using dual fluorescent-labelled antibodies. *Analytica Chimica Acta* **1989**, *227*, 73-96.
71. Ekins, R.; Chu, F., Multianalyte microspot immunoassay--microanalytical "compact disk" of the future. *Clin Chem* **1991**, *37* (11), 1955-1967.
72. Hartmann, M., et al., Protein microarrays for diagnostic assays. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2009**, *393* (5), 1407-1416.
73. Pease, A. C., et al., Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1994**, *91* (11), 5022-5026.
74. Schena, M., et al., Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray. *Science* **1995**, *270* (5235), 467-470.
75. Ramsay, G., DNA chips: State-of-the art. *Nat Biotech* **1998**, *16* (1), 40-44.
76. Stears, R. L., et al., Trends in microarray analysis. *Nat Med* **2003**, *9* (1), 140-145.
77. Li, X., et al., Clinical Utility of Microarrays: Current Status, Existing Challenges and Future Outlook. *Current Genomics* **2008**, *9*, 466-474.
78. Angenendt, P., Progress in protein and antibody microarray technology. *Drug Discovery Today* **2005**, *10* (7), 503-511.
79. Sobek, J., et al., Microarray Technology as a Universal Tool for High-Throughput Analysis of Biological Systems. *Combinatorial Chemistry High Throughput Screening* **2006**, *9*, 365-380.
80. Arenkov, P., et al., Protein Microchips: Use for Immunoassay and Enzymatic Reactions. *Analytical biochemistry* **2000**, *278* (2), 123-131.

81. Rubina AY, D. E., Stomakhin AA, Darii EL, Pan'kov SV, Barsky VE, Ivanov SM, Konovalova EV, Mirzabekov AD, Hydrogel-based protein microchips: manufacturing, properties, and applications. *Biotechniques* **2003**, 34 (5), 1008-1022.
82. Afanassiev, V., et al., Preparation of DNA and protein micro arrays on glass slides coated with an agarose film. *Nucleic Acids Research* **2000**, 28 (12), 66.
83. Kersten, B., et al., Protein microarray technology and ultraviolet crosslinking combined with mass spectrometry for the analysis of protein-DNA interactions. *Analytical biochemistry* **2004**, 331 (2), 303-313.
84. Angenendt, P., et al., Toward optimized antibody microarrays: a comparison of current microarray support materials. *Analytical biochemistry* **2002**, 309 (2), 253-260.
85. Angenendt, P., et al., Next generation of protein microarray support materials: Evaluation for protein and antibody microarray applications. *Journal of Chromatography A* **2003**, 1009 (1-2), 97-104.
86. Kusnezow, W., et al., Antibody microarrays: An evaluation of production parameters. *PROTEOMICS* **2003**, 3 (3), 254-264.
87. Wacker, R., et al., Performance of antibody microarrays fabricated by either DNA-directed immobilization, direct spotting, or streptavidin-biotin attachment: a comparative study. *Analytical biochemistry* **2004**, 330 (2), 281-287.
88. Peluso, P., et al., Optimizing antibody immobilization strategies for the construction of protein microarrays. *Analytical biochemistry* **2003**, 312 (2), 113-124.
89. Wu, P.; Grainger, D. W., Comparison of Hydroxylated Print Additives on Antibody Microarray Performance. *Journal of Proteome Research* **2006**, 5 (11), 2956-2965.
90. Niemeyer, C. M., et al., DNA-Directed Immobilization: Efficient, Reversible, and Site-Selective Surface Binding of Proteins by Means of Covalent DNA-Streptavidin Conjugates. *Analytical biochemistry* **1999**, 268 (1), 54-63.
91. Zhang, J., et al., DNA-directed immobilisation of glycomimetics for glycoarrays application: Comparison with covalent immobilisation, and development of an on-chip IC50 measurement assay. *Biosensors and Bioelectronics* **2009**, 24 (8), 2515-2521.
92. Ladd, J., et al., DNA-Directed Protein Immobilization on Mixed Self-Assembled Monolayers via a Streptavidin Bridge. *Langmuir* **2004**, 20 (19), 8090-8095.
93. Boozer, C., et al., DNA Directed Protein Immobilization on Mixed ssDNA/Oligo(ethylene glycol) Self-Assembled Monolayers for Sensitive Biosensors. *Analytical Chemistry* **2004**, 76 (23), 6967-6972.
94. Jung, Y., et al., Self-Directed and Self-Oriented Immobilization of Antibody by Protein G-DNA Conjugate. *Analytical Chemistry* **2007**, 79 (17), 6534-6541.
95. Bier, F., et al., Changing Functionality of Surfaces by Directed Self-Assembly Using Oligonucleotides—The Oligo-Tag. *BioTechniques* **1999**, 27, 752-760.
96. Kuhn, C. M., Anabolic steroids. *Recent Progress in Hormone Research* **2002**, 57, 411-434.
97. Salvador, J.-P. Estratègies Analítiques per a la Detecció d'Hormones Anabolitzants basades en l'Ús de Receptors Específics. UB, Barcelona, 2007.
98. NIDA, Los Esteroides (Anabólico-Androgénicos). **2005**.

99. Kicman, A. T.; Gower, D. B., Anabolic steroids in sport: biochemical, clinical and analytical perspectives. *Annals of Clinical Biochemistry* **2003**, *40*, 321-356.
100. Mukhopadhyay, R., Out! Catching Doping Athletes. *Anal. Chem.* **2007**, (15), 5522-5528.
101. WADA The 2013 prohibited list international standard.
102. EC, Directive 96/22/EC *Off. J. Eur. Commun.* **1996**.
103. EC, Directive 2003/22/EC. **2003**.
104. EC, Directive 2008/97/CE. **2008**.
105. Van Thuyne, W., et al., Nutritional supplements: prevalence of use and contamination with doping agents. *Nutrition Research Reviews* **2006**, *19*, 147-158.
106. Anielski, P., et al., Detection of testosterone, nandrolone and precursors in horse hair. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2005**, *V383* (6), 903-908.
107. Fuh, M.-R., et al., Determination of residual anabolic steroid in meat by gas chromatography-ion trap-mass spectrometer. *Talanta* **2004**, *64* (2), 408-414.
108. EC, Directive 96/23/EC. *Off. J. Eur. Commun.* **1996**, *L 125*, 3.
109. Hall, R. C. W.; Hall, R. C. W., Abuse of Supraphysiologic Doses of Anabolic Steroids. *Southern Medical Journal*
Southern Medical Journal J1 - Southern Medical Journal **2005**, *98* (5), 550-555.
110. Maravelias, C., et al., Adverse effects of anabolic steroids in athletes: A constant threat. *Toxicology Letters* **2005**, *158* (3), 167-175.
111. Socas, L., et al., Hepatocellular adenomas associated with anabolic androgenic steroid abuse in bodybuilders: a report of two cases and a review of the literature
doi:10.1136/bjism.2004.013599. *Br J Sports Med* **2005**, *39* (5), e27-.
112. Marco Giammanco, G. T., Santo Giammanco,; Danila Di Majo, M. L. G., Testosterone and aggressiveness. *Med Sci Monit* **2005**, *11* (4), RA136-145.
113. McGinnis, M. Y., Anabolic Androgenic Steroids and Aggression: Studies Using Animal Models
doi:10.1196/annals.1330.024. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2004**, *1036* (1), 399-415.
114. Van Eenoo, P.; Delbeke, F. T., Metabolism and excretion of anabolic steroids in doping control--New steroids and new insights. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **2006**, *101* (4-5), 161-178.
115. Schanzer, W., Metabolism of anabolic androgenic steroids. *Clin Chem* **1996**, *42* (7), 1001-1020.
116. Schanzer, W.; Donike, M., Metabolism of Anabolic-Steroids in Man - Synthesis and Use of Reference Substances for Identification of Anabolic-Steroid Metabolites. *Analytica Chimica Acta* **1993**, *275* (1-2), 23-48.
117. Masse, R., et al., Studies on anabolic steroids : V. Sequential reduction of methandienone and structurally related steroid A-ring substituents in humans: gas chromatographic--mass

spectrometric study of the corresponding urinary metabolites. *Journal of Chromatography: Biomedical Applications* **1991**, 562 (1-2), 323-340.

118. Kuuranne, T., et al., Feasibility of a liquid-phase microextraction sample clean-up and liquid chromatographic/mass spectrometric screening method for selected anabolic steroid glucuronides in biological samples. *J. Mass Spectrom.* **2003**, 38, 16–26.

119. Poelmans, S., et al., Analytical possibilities for the detection of stanozolol and its metabolites. *Analytica Chimica Acta* **2002**, 473 (1-2), 39-47.

120. Van Poucke, C.; Van Peteghem, C., Development and validation of a multi-analyte method for the detection of anabolic steroids in bovine urine with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2002**, 772 (2), 211-217.

121. Levesque, J.-F., et al., Discovery, Biosynthesis, and Structure Elucidation of Metabolites of a Doping Agent and a Direct Analogue, Tetrahydrogestrinone and Gestrinone, Using Human Hepatocytes. *Anal. Chem.* **2005**, 77 (10), 3164-3172.

122. Reig, M.; Toldrá, F., Veterinary drug residues in meat: Concerns and rapid methods for detection. *Meat Science* 78 (1-2), 60-67.

123. WADA, Minimum required performance limits for detection of prohibited substances. **2013**.

124. EC, Community Reference Laboratories (CRL) guidance paper. **2007**.

125. Thieme, D., et al., Identification of anabolic steroids in serum, urine, sweat and hair: Comparison of metabolic patterns. *Analytica Chimica Acta, 4th International Symposium on Hormone and Veterinary Residue Analysis.* **2003**, 483 (1-2), 299-306.

126. Bresson, M., et al., Doping control for metandienone using hair analyzed by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2006**, 836 (1-2), 124-128.

127. Kintz, P., et al., Hair analysis for drug detection. *Therapeutic Drug Monitoring* **2006**, 28 (3), 442-446.

128. Kintz, P.; Samyn, N., Use of alternative specimens: Drugs of abuse in saliva and doping agents in hair. *Therapeutic Drug Monitoring* **2002**, 24 (2), 239-246.

129. Blokland, M. H., et al., Metabolism of methyltestosterone, norethandrolone and methylboldenone in a heifer. *Analytica Chimica Acta* **2005**, 529 (1-2), 317-323.

130. Samuels, T. P., et al., Study of the metabolism of testosterone, nandrolone and estradiol in cattle. *Analyst* **1998**, 123 (12), 2401-2404.

131. Li, X.-F., et al., Determination of testosterone and its metabolites using liquid chromatography with elevated column temperature and flow-rate gradient. *Analytica Chimica Acta* **2002**, 457 (2), 165-171.

132. Navajas, R., et al., Determination of Epitestosterone and Testosterone in Urine by High-Performance Liquid-Chromatography. *Journal of Chromatography B-Biomedical Applications* **1995**, 673 (2), 159-164.

133. Hewitt, S. A., et al., Screening and confirmatory strategies for the surveillance of anabolic steroid abuse within Northern Ireland. *Analytica Chimica Acta* **2002**, 473 (1-2), 99-109.

134. Buiarelli, F., et al., Excretion study of stanozolol in bovine by HPLC-tandem mass spectrometry. *Chromatographia* **2004**, *60* (9-10), 545-551.
135. Van Poucke, C., et al., Combination of liquid chromatography/tandem mass spectrometry and gas chromatography/mass spectrometry for the detection of 21 anabolic steroid residues in bovine urine. *Journal of Mass Spectrometry* **2005**, *40* (6), 731-738.
136. Stolker, A. A. M.; Brinkman, U. A. T., Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals--a review. *Journal of Chromatography A* **2005**, *1067* (1-2), 15-53.
137. Coyotupa, J., et al., Simultaneous radioimmunoassay of plasma testosterone and dihydrotestosterone. *Analytical Letters* **1972**, *5* (6), 329-&.
138. Furuyama, S., et al., A radioimmunoassay for plasma testosterone. *Steroids* **1970**, *16* (4), 415-&.
139. Brooks, R. V., et al., Detection of anabolic steroids by radioimmunoassay. *British Journal of Sports Medicine* **1975**, *9* (2), 89-92.
140. Hampl, R.; Stárka, L., Recent advances in immunoassay of steroid hormones. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **1989**, *8* (2), 72-75.
141. Hagedorn, H.-W., et al., Identification and verification of the anabolic steroid boldenone in equine blood and urine by HPLC/ELISA. *Biomedical Chromatography* **1994**, *8* (2), 63-68.
142. Lu, H., et al., Screening for testosterone, methyltestosterone, 19-nortestosterone residues and their metabolites in bovine urine with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Analytica Chimica Acta* **2006**, *570* (1), 116-123.
143. Fitzpatrick, J., et al., Enzyme-Linked Immunosorbent Assay-Based Detection of Free Trenbolone in Bovine Bile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, *52* (14), 4351-4354.
144. Sawaya, W. N., et al., Application of an enzyme-linked immunosorbent assay for screening of sheep urine and animal tissue for the androgenic steroid trenbolone acetate in the State of Kuwait. *Food Additives and Contaminants* **1998**, *15* (2), 151-156.
145. Hungerford, N. L., et al., Analysis of anabolic steroids in the horse: Development of a generic ELISA for the screening of 17 alpha-alkyl anabolic steroid metabolites. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **2005**, *96* (3-4), 317-334.
146. Brun, E. M., et al., Enzyme-linked immunosorbent assays for the synthetic steroid gestrinone. *Talanta* **2010**, *82* (4), 1581-1587.
147. Jiang, J. Q., et al., Production and Characterisation of Monoclonal Antibodies against 19-Nortestosterone. *Biomedical and Environmental Sciences* **2011**, *24* (2), 172-179.
148. Liu, L. Q., et al., Development and evaluation of a rapid lateral flow immunochromatographic strip assay for screening 19-nortestosterone. *Biomedical Chromatography* **2007**, *21* (8), 861-866.
149. Tian, Z., et al., Development and optimization of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for 19-nortestosterone. *Journal of Animal and Feed Sciences* **2008**, *17* (2), 253-267.

150. Salvador, J. P., et al., Simultaneous immunochemical detection of stanozolol and the main human metabolite, 3'-hydroxy-stanozolol, in urine and serum samples. *Analytical Biochemistry* **2008**, *376* (2), 221-228.
151. Salvador, J. P., et al., A high-throughput screening (HTS) immunochemical method for the analysis of stanozolol metabolites in cattle urine samples. *Journal of Chromatography B* **2009**, *878* (2), 243-252.
152. Salvador, J.-P., et al., Preparation of Antibodies for the Designer Steroid Tetrahydrogestrinone and Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Human Urine Analysis. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (10), 3734-3740.
153. Kramer, K., Hubauer, A., Lausterer, R., Salvador, J.-P. and Marco, M.-P., Production of Antibodies for the Quantitative Detection of the Anabolically Active Androgens 17 β -Boldenone and Methylboldenone. *Analytical Letters* **2007**, *40*, p. 1461.
154. Aqai, P., et al., High-Throughput Bioaffinity Mass Spectrometry for Screening and Identification of Designer Anabolic Steroids in Dietary Supplements. *Analytical Chemistry* **2013**, *85* (6), 3255-3262.
155. Du, H., et al., Preparation of Steroid Antibodies and Parallel Detection of Multianabolic Steroid Abuse with Conjugated Hapten Microarray. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (20), 6166-6171.
156. Adrián, J., et al., A multianalyte ELISA for immunochemical screening of sulfonamide, fluoroquinolone and β -lactam antibiotics in milk samples using class-selective bioreceptors. *Anal Bioanal Chem* **2008**, *391*, 1703-1712.
157. Jones, G., et al., A procedure for the immunoanalysis of samples containing one or more members of a group of cross-reacting analytes. *Analytica Chimica Acta* **1996**, *336* (1-3), 175-183.
158. Jones, G., et al., Extension of the four-parameter logistic model for ELISA to multianalyte analysis. *Journal of Immunological Methods* **1994**, *177* (1-2), 1-7.
159. Bhand, S., et al., Immuno-arrays for multianalyte analysis of chlorotriazines. *Talanta* **2005**, *65* (2), 331-336.
160. Van Ginkel, L. A., et al., Assay for trenbolone and its metabolite 17[alpha]-trenbolone in bovine urine based on immunoaffinity chromatographic clean-up and off-line high-performance liquid chromatography-thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A* **1988**, *445*, 385-392.
161. Van Ginkel, L. A., et al., Multi-immunoaffinity chromatography: A simple and highly selective clean-up method for multi-anabolic residue analysis of meat. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **1989**, *489* (1), 111-120.
162. Dubois, M., et al., GC-MS determination of anabolic steroids after multi-immunoaffinity purification[dagger]. *Analyst* **1998**, *123* (12), 2611-2616.
163. Machnik, M. D., P.; Horning, S.; Schaezner, W., Purification and concentration of anabolic steroids by immuno affinity chromatography (IAC). *Recent Adv. Doping Ana. (4)* **1997**.
164. Nichkova, M.; Marco, M. P., Development and evaluation of C18 and immunosorbent solid-phase extraction methods prior immunochemical analysis of chlorophenols in human urine. *Analytica Chimica Acta* **2005**, *533* (1), 67-82.

165. Sanvicens, N., et al., Determination of haloanisols in white wine by immunosorbent solid-phase extraction followed by enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54* (24), 9176-9183.
166. Lu, H., et al., Screening of boldenone and methylboldenone in bovine urine using disposable electrochemical immunosensors. *Steroids* **2006**, *71* (9), 760-767.
167. Conneely, G., et al., Development of an immunosensor for the detection of testosterone in bovine urine. *Analytica Chimica Acta* **2007**, *583* (1), 153-160.
168. Conneely, G., et al., Electrochemical immunosensors for the detection of 19-nortestosterone and methyltestosterone in bovine urine. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2007**, *121* (1), 103-112.
169. Conneely, G., et al., An Immunosensor for the Detection of Stanozolol in Bovine Urine. *Analytical Letters* **2007**, *40* (7), 1280 - 1293.
170. Calvo, D., et al., Multidetecion Of Anabolic Androgenic Steroids Using Immunoarrays and Pattern Recognition Techniques. In *Olfaction and Electronic Nose, Proceedings*, Amer Inst Physics: Melville, 2009; Vol. 1137, pp 547-550.
171. Lakowicz, J. R., In *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Second Edition ed.; Plenum Publishers: New York, 1983.
172. Weber, G., Polarization of the Fluorescence of Macromolecules *Biochem* **1951**, *51*, 155-167.
173. Goldman, E., et al., Luminescent quantum dots in immunoassays. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2006**, *384* (3), 560-563.
174. West, J. L.; Halas, N. J., Engineered nanomaterials for biophotonics applications: Improving Sensing, Imaging, and Therapeutics. *Annual Review of Biomedical Engineering* **2003**, *5* (1), 285-292.
175. Chan, W.; Nie, S., Quantum Dot Bioconjugates for Ultrasensitive Nonisotopic Detection. *Science* **1998**, *281* (5385), 2016-2018.
176. Han, M., et al., Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules. *Nature Biotechnology* **2001**, *19*, 631-635.
177. Mastichiadis, C., et al., Solid-phase fluoroimmunoassay for the determination of mesotrione —a novel triketone herbicide— in water with direct measurement of the fluorescence onto the solid support. *Analyst* **2003**, (128), 404 - 410.
178. Goldman, E. R., et al., Analysis of aqueous 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) using a fluorescent displacement immunoassay. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2003**, *375* (4), 471-475.
179. Fiet, J., et al., Development of a highly sensitive and specific new testosterone time-resolved fluoroimmunoassay in human serum. *Steroids* **2004**, *69* (7), 461-471.
180. Zhang, S. X., et al., Fluorescence polarisation immunoassay based on a monoclonal antibody for the detection of sulphamethazine in chicken muscle. *International Journal of Food Science and Technology* **2007**, *42* (1), 36-44.
181. Yu, Y. Y., et al., Study on the new fluorescence immunoassays for the 2,4,6-trichlorophenol in the environmental water. *Analytical Letters* **2006**, *39* (5), 937-946.

182. Goldman, E. R., et al., Multiplexed Toxin Analysis Using Four Colors of Quantum Dot Fluororeagents. *Analytical Chemistry* **2003**, 76 (3), 684-688.
183. Hahn, M. A., et al., Detection of Single Bacterial Pathogens with Semiconductor Quantum Dots. *Analytical Chemistry* **2005**, 77 (15), 4861-4869.
184. Sanvicens, N., et al., Quantum dot-based array for sensitive detection of Escherichia coli. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2011**, 399 (8), 2755-2762.
185. Watson, J. D. C., F.H.C., A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **1953**, 171, 737-738.
186. Franklin, R.; Gosling, R. G., Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Nature* **1953**, 171, 740-741.
187. Manson, M. M., *Immunochemical Protocols*. Humana Press: Totowa, New Jersey, 1992; Vol. 10.
188. Smith, D. S., et al., Principles and practice of fluoroimmunoassay procedures. In *Modern Fluorescence Spectroscopy*, Wehry, E. L., Ed. Vol. volume 3, pp 143-191.
189. Panchuk-Voloshina, N., et al., Alexa Dyes, a Series of New Fluorescent Dyes that Yield Exceptionally Bright, Photostable Conjugates. *J. Histochem. Cytochem.* **1999**, 47 (9), 1179-1188.
190. Mao, S.-Y., Conjugation of fluorochromes to antibodies. In *The Protein Protocols Handbook (2nd edition)*, Walker, J. M., Ed. Humana Press: 2002; pp 351-354.
191. Petrou, P. S., et al., Glycerin Suppression of Fluorescence Self-Quenching and Improvement of Heterogeneous Fluoroimmunoassay Sensitivity. *Analytical Chemistry* **2006**, 79 (2), 647-653.
192. Qu, Y., et al., An electrochemical enzyme immunoassay for chicken luteinizing hormone: Extension of the detection limit by adequate control of the nonspecific adsorption. *Analytical Biochemistry* **1998**, 259 (2), 167-175.
193. Tort, N., et al., Synthesis of Steroid-Oligonucleotide Conjugates for a DNA Site-Encoded SPR Immunosensor. *Bioconjugate Chemistry* **2012**, 23 (11), 2183-2191.
194. Tort, N., et al., Fluorescence site-encoded DNA addressable hapten microarray for anabolic androgenic steroids. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2009**, 28 (6), 718-728.
195. Campàs, M.; Katakis, I., DNA biochip arraying, detection and amplification strategies. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2004**, 23 (1), 49-62.
196. Wittmann, C., et al., Immobilization of DNA on Microarrays. In *Immobilisation of DNA on Chips II*, Springer Berlin / Heidelberg: 2005; Vol. 261, pp 1-25.
197. Sassolas, A., et al., DNA Biosensors and Microarrays. *Chemical Reviews* **2008**, 108 (1), 109-139.
198. Jonkheijm, P., et al., Chemical Strategies for Generating Protein Biochips. *Angew. Chem.* **2008**, 47, 9618-9647.
199. Belosludtsev, Y., et al., DNA Microarrays Based on Noncovalent Oligonucleotide Attachment and Hybridization in Two Dimensions. *Analytical biochemistry* **2001**, 292 (2), 250-256.

200. Lemesko, S. V., et al., Oligonucleotides form a duplex with non-helical properties on a positively charged surface. *Nucleic Acids Research* **2001**, 29 (14), 3051-3058.
201. Höök, F., et al., Characterization of PNA and DNA Immobilization and Subsequent Hybridization with DNA Using Acoustic-Shear-Wave Attenuation Measurements. *Langmuir* **2001**, 17 (26), 8305-8312.
202. Chu, L.-Q., et al., Plasma polymerized non-fouling thin films for DNA immobilization. *Biosensors and Bioelectronics* **2009**, 25 (2), 519-522.
203. Xu, Q.; Lam, K. S., Protein and Chemical Microarrays-Powerful Tools for Proteomics *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2003**, 5, 257-266.
204. Benters, R., et al., Dendrimer-Activated Solid Supports for Nucleic Acid and Protein Microarrays. *ChemBioChem* **2001**, 2 (9), 686-694.
205. Lim, S. Y., et al., Direct and nondestructive verification of PNA immobilization using click chemistry. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2008**, 376 (4), 633-636.
206. Sauer, U., et al., Signal enhancement of protein chips. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2005**, 107 (1), 178-183.
207. EC, Decision 2002/657/EC. **2002**.
208. CRLs, Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines. **2010**.
209. Graells, S. A., R.; Badenes, G. and Quidant, R. , Growth of plasmonic gold nanostructures by electron beam induced deposition. *Appl. Phys. Lett.* **2007**, 91 (), 121112-1/3.
210. Bhushan, B.; Matsui, S., Three-Dimensional Nanostructure Fabrication by Focused Ion Beam Chemical Vapor Deposition. In *Springer Handbook of Nanotechnology*, Springer Berlin Heidelberg: 2010; pp 211-229.
211. Jensen, T. R., et al., Nanosphere Lithography: Tunable Localized Surface Plasmon Resonance Spectra of Silver Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B* **2000**, 104 (45), 10549-10556.
212. Jensen, T. R., et al., Nanosphere Lithography: Surface Plasmon Resonance Spectrum of a Periodic Array of Silver Nanoparticles by Ultraviolet-Visible Extinction Spectroscopy and Electrodynamic Modeling. *The Journal of Physical Chemistry B* **1999**, 103 (13), 2394-2401.
213. Haes, A. J.; Van Duyne, R. P., A Nanoscale Optical Biosensor: Sensitivity and Selectivity of an Approach Based on the Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy of Triangular Silver Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, 124 (35), 10596-10604.
214. Haynes, C. L.; Van Duyne, R. P., Nanosphere Lithography: A Versatile Nanofabrication Tool for Studies of Size-Dependent Nanoparticle Optics. *The Journal of Physical Chemistry B* **2001**, 105 (24), 5599-5611.
215. Sepúlveda, B., et al., LSPR-based nanobiosensors. *Nano Today* **2009**, 4 (3), 244-251.
216. Grabar, K. C., et al., Preparation and Characterization of Au Colloid Monolayers. *Analytical Chemistry* **1995**, 67 (4), 735-743.
217. Turkevich, J., et al., A Study of the Nucleation and Growth processes in the Synthesis of Colloidal Gold. *Discussions of the Faraday Society* **1951**, 11, 55-75.

218. Pastoriza-Santos, I., et al., Environmental Optical Sensitivity of Gold Nanodecahedra. *Advanced Functional Materials* **2007**, *17* (9), 1443-1450.
219. Sánchez-Iglesias, A., et al., Synthesis and Optical Properties of Gold Nanodecahedra with Size Control. *Advanced Materials* **2006**, *18* (19), 2529-2534.
220. Haiss, W., et al., Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV-Vis Spectra. *Analytical Chemistry* **2007**, *79* (11), 4215-4221.
221. Satija, J., et al., Emerging use of nanostructure films containing capped gold nanoparticles in biosensors. *Nanotechnology, Science and Applications* **2010**, *3*, 171-188.
222. Brown, K. R., et al., Seeding of Colloidal Au Nanoparticle Solutions. 2. Improved Control of Particle Size and Shape. *Chemistry of Materials* **1999**, *12* (2), 306-313.
223. Wang, Z.; Ma, L., Gold nanoparticle probes. *Coordination Chemistry Reviews* **2009**, *253* (11-12), 1607-1618.
224. Yamamichi, J., et al., The mesoscopic effect on label-free biosensors based on localized surface plasmon resonance of immobilized colloidal gold. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2009**, *143* (1), 349-356.
225. Li, X., et al., Localized surface plasmon resonance (LSPR) of polyelectrolyte-functionalized gold-nanoparticles for bio-sensing. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2009**, *332* (2-3), 172-179.
226. Loweth, C. J., et al., DNA-Based Assembly of Gold Nanocrystals. *Angewandte Chemie International Edition* **1999**, *38* (12), 1808-1812.
227. Peschel, S., et al., Immobilization of gold nanoparticles on solid supports utilizing DNA hybridization. *Materials Science and Engineering: C* **2002**, *19* (1-2), 47-50.
228. Reichert, J. r., et al., Chip-Based Optical Detection of DNA Hybridization by Means of Nanobead Labeling. *Analytical Chemistry* **2000**, *72* (24), 6025-6029.
229. Wolfgang, F.; Taton, T. A., Metal nanoparticles as labels for heterogeneous, chip-based DNA detection. *Nanotechnology* **2003**, *14* (12), R63.
230. Taton, T. A., et al., Two-Color Labeling of Oligonucleotide Arrays via Size-Selective Scattering of Nanoparticle Probes. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123* (21), 5164-5165.
231. Taton, T. A., et al., Scanometric DNA Array Detection with Nanoparticle Probes. *Science* **2000**, *289* (5485), 1757-1760.
232. Frens, G., Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions *Nature Physical Science* **1973**, *241*, 20-22.
233. Taton, T. A., *Preparation of Gold Nanoparticle-DNA Conjugates*. John Wiley & Sons, Inc.: 2001.
234. Hill, H. D.; Mirkin, C. A., The bio-barcode assay for the detection of protein and nucleic acid targets using DTT-induced ligand exchange. *Nat. Protocols* **2006**, *1* (1), 324-336.
235. Salvador, J.-P., et al., Nanobiosensors for In Vitro and In Vivo Analysis of Biomolecules. In *Methods Mol Biol.* , 2012; Vol. 811, pp 207-21.

236. Demers, L. M., et al., Direct Patterning of Modified Oligonucleotides on Metals and Insulators by Dip-Pen Nanolithography. *Science* **2002**, 296 (5574), 1836-1838.
237. Nielsen, P. E.; Egholm, M., An Introduction to Peptide Nucleic Acid. *Current Issues Molec. Biol.* **1999**, 1 (2), 89-104.
238. Fernandes, T. G., et al., High-throughput cellular microarray platforms: applications in drug discovery, toxicology and stem cell research. *Trends in biotechnology* **2009**, 27 (6), 342-349.
239. Chen, D. S.; Davis, M. M., Molecular and functional analysis using live cell microarrays. *Current Opinion in Chemical Biology* **2006**, 10 (1), 28-34.
240. Campbell, C. J., et al., Cell Interaction Microarray for Blood Phenotyping. *Analytical Chemistry* **2006**, 78 (6), 1930-1938.
241. Bailey, R. C., et al., DNA-Encoded Antibody Libraries: A Unified Platform for Multiplexed Cell Sorting and Detection of Genes and Proteins. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, 129 (7), 1959-1967.
242. Douglas, E. S., et al., Self-assembled cellular microarrays patterned using DNA barcodes. *Lab on a Chip* **2007**, 7 (11), 1442-1448.
243. Chung, B. G., et al., Human neural stem cell growth and differentiation in a gradient-generating microfluidic device. *Lab on a Chip* **2005**, 5 (4), 401-406.
244. Gómez-Sjöberg, R., et al., Versatile, Fully Automated, Microfluidic Cell Culture System. *Analytical Chemistry* **2007**, 79 (22), 8557-8563.
245. Tourovskaia, A., et al., Differentiation-on-a-chip: A microfluidic platform for long-term cell culture studies. *Lab on a Chip* **2005**, 5 (1), 14-19.
246. Cheng, X., et al., A microfluidic device for practical label-free CD4+ T cell counting of HIV-infected subjects. *Lab on a Chip* **2007**, 7 (2), 170-178.
247. Wankhede, S. P., et al., Cell Detachment Model for an Antibody-Based Microfluidic Cancer Screening System. *Biotechnology Progress* **2006**, 22 (5), 1426-1433.
248. Wacker, R.; Niemeyer, C. M., Synthesis of Covalent Oligonucleotide-Streptavidin Conjugates and Their Application in DNA-Directed Immobilization (DDI) of Proteins. In *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc.: 2001.
249. Niemeyer, C. M., et al., Oligonucleotide-directed self-assembly of proteins: semisynthetic DNA-streptavidin hybrid molecules as connectors for the generation of macroscopic arrays and the construction of supramolecular bioconjugates. *Nucleic Acids Research* **1994**, 22 (25), 5530-5539.
250. Edwards, K. A.; Baeumner, A. J., Liposome-Enhanced Lateral-Flow Assays for the Sandwich-Hybridization Detection of RNA. 2008; Vol. 504, pp 185-215.
251. Edwards, K., et al., Universal liposomes: preparation and usage for the detection of mRNA. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2008**, 391 (5), 1689-1702.
252. Schröder, H., et al., Addressable Microfluidic Polymer Chip for DNA-Directed Immobilization of Oligonucleotide-Tagged Compounds. *Small* **2009**, 5 (13), 1547-1552.

ANNEX 1: Capítols de llibre

Capítol 1: *Immunochemical Analytical Methods for Monitoring the Aquatic Environment. Applications of immunoanalytics.* J. Adrián, F. Fernández, A. Muriano, R. Obregon, J. Ramón-Azcon, N. Tort and M.P. Marco. *Analytical Measurements in Aquatic Environments.* J. Namieśnik and P. Szefer, Editors. 2010, CRC Press. Taylor & Francis Group Ltd. p. 139-187.

Resum: Aquest capítol tracta dels nous mètodes immunoquímics que han aparegut en els darrers anys per a l'anàlisi mediambiental, concretament per a la determinació dels contaminants més importants en entorns aquàtics, incloent-hi diversos tipus d'ecosistemes. El principal objectiu ha estat el d'aportar una visió representativa dels diferents exemples de tècniques immunoquímiques que s'han aplicat i de les que podrien aplicar-se degut al gran potencial que ofereixen. Els contaminants mencionats s'han seleccionat en base al seu risc toxicològic i al seu ús.

8 Immunochemical Analytical Methods for Monitoring the Aquatic Environment

*Javier Adrian, Fátima Fernández, Alejandro Muriano,
Raquel Obregón, Javier Ramón, Nuria Tort,
and M.-Pilar Marco*

CONTENTS

8.1	Introduction	140
8.2	Immunochemical Determination of Industrial Contaminants	142
8.2.1	Polycyclic Aromatic Hydrocarbons	142
8.2.2	Surfactants	145
8.2.3	Organohalogenated Compounds	147
8.2.4	Heavy Metals and Metalloids	149
8.2.5	Other Industrial Pollutants: Bisphenol A	150
8.3	Immunochemical Methods for Pesticides	151
8.3.1	Insecticides	152
8.3.2	Herbicides And Plant Growth Regulators	154
8.4	Immunochemical Determinations of Pharmaceutical and Personal Care Products	158
8.4.1	Antibiotics	158
8.4.1.1	Sulfonides	160
8.4.1.2	Fluoroquinolones	161
8.4.1.3	Amphenicols	162
8.4.1.4	Tetracyclines	163
8.4.1.5	β -Lactams	164
8.4.1.6	Macrolides	165
8.4.1.7	Other Drugs	165
8.4.2	Steroid Hormones	166
8.4.2.1	Estrogens	166
8.4.2.2	Androgens	168
8.4.2.3	Gestagens	169
8.4.2.4	Corticosteroids	169
8.5	General summary	169
	Acknowledgments	170
	References	170

8.1 INTRODUCTION

In recent decades, efforts to better understand the occurrence, fate, and environmental effects of anthropogenic chemicals have focused largely on industrial compounds and agricultural pesticides. This emphasis has been in response to the increasing production of these chemicals, including the so-called emerging contaminants, such as pharmaceutical active ingredients and personal care products, their concentrated use, the potential risk of persistence, and their sometimes unknown acute and chronic toxic effects (see Table 8.1 for the most important groups of emerging pollutants).¹

Pollutants can enter the environment in a great many ways.² Some compounds, such as pesticides, are deliberately released during agricultural applications; others, like industrial by-products, get into our water and air resources during regulated and unregulated industrial discharges. On the other hand, pharmaceuticals and biogenic hormones are normally discharged into the environment through wastewater treatment plants (WWTPs), which are often not designed to remove them from the effluent. From there on, the transport, fate, and possible adverse consequences of these pollutants on human health and the ecosystem are frequently unknown or at best not clearly understood.³ Potential concerns include reproductive impairment,⁴⁻⁶ increased incidence of cancer,⁷ development of antibiotic-resistant bacteria,⁸ or the potentially elevated toxicity of chemical mixtures due to synergistic effects;⁹ these concerns demand extensive investigation of all possible situations.

The aim of regulations and regulatory methods to assess and control the impact of these substances in the aquatic environment is to protect the ecosystem and public health while keeping watch on their contamination levels and potential negative effects. In addition to the REACH (Registration, Evaluation, Authorization, and Restriction of Chemicals) law (EC 1907/2006) regarding chemicals and their safe use, which came into force on June 1, 2007, there are specific regulations for protecting health and ensuring the good quality of all water resources, such as the Drinking Water Directive (DWD, the Council Directive 98/83/EC), the Bathing Water Directive (2006/7/EC), or the Urban Waste Water Directives (91/271/EEC and 98/15/EC). Moreover, the intention of the Water Framework

TABLE 8.1
Some of the Most Important Contaminants Needed to be Monitored

Industrial Contaminants	Pesticides	Pharmaceuticals
<i>Surfactants and metabolites</i>	<i>Insecticides</i>	<i>Antibiotics</i>
Nonanionic	Organochlorines	Sulfonamides
Anionic	Organophosphorus	Fluoroquinolones
Cationic		Amphenicols
		Tetracyclines
		β-Lactams
		Macrolides
<i>Organohalogenated compounds</i>	<i>Herbicides/plant growth regulators</i>	<i>Other drugs</i>
Polychlorinated	Triazines	Diclofenac
Chlorophenols	Phenylurea compounds	Indomethacin
Dioxins	Chloroacetanilides	Nitrofurantion
Polybrominated biphenyl ethers	Sulfonylureas	Paclitaxel
Bromophenols		Spectinomycin
<i>Heavy metals and metalloids</i>		<i>Steroid hormones</i>
As, Cd, Cr, Cu, Pb, Hg, Ag, Se,		Estrogens
Zn, etc.		Androgens
		Gestagens
		Corticosteroids
<i>Industrial additives and others</i>		
Phthalate esters		
Bisphenol A		

Directive (WFD, 2000/60/EC) is to provide an overall framework for a cleaner and safer aquatic ecosystem, particularly with regard to surface freshwater and groundwater bodies (i.e., lakes, streams, rivers, estuaries, coastal waters, etc.). Thus, in line with this directive, the Marine Strategy Directive (2008/56/EC) aims to achieve a good environmental status of the EU's seawaters by 2021. Similarly, a River Basin Management Plan (RBMP) is being developed for implementation in each river basin district; each such plan must include knowledge of the particular pressures and impacts of human activities on the river basin in question, as well as protection programs, controls, and remediation measures. The first RBMP is scheduled to be published at the end of 2009; in parallel with it, the new Groundwater Directive (2006/118/EC) establishes a regime that sets underground water quality standards (QSS) and introduces measures to prevent or limit inputs of pollutants into groundwater.

The aim of all these directives is to maintain water quality in all its aspects, including chemical pollution, on which this chapter will focus. Community policy regarding dangerous or hazardous substances in European waters was introduced almost three decades ago by Council Directive 76/464/EEC. This Directive is now integrated in the WFD (codified as 2006/11/EC). The main strategy against the pollution of surface waters involves the identification of substances and development of control measures. More than 100,000 existing chemicals have been identified in the European Inventory of Existing Commercial Chemical Substances (EINECS). Data collection on the potential adverse effects of these chemicals has led to 141 of them being classified as priority substances. The latest list of priority substances presenting a significant risk to or via the aquatic environment was published in Council Decision No 2455/2001/EC. The list identifies a further 33 substances or groups of substances that have been shown to be of major concern. Moreover, in July 2006, the EC adopted proposals for a new Directive to protect surface water from pollution by setting up Environmental Quality Standards (EQS, concentrations of pollutants which should not be exceeded) and measures to monitor pollution (COM(2006)397 final). Although for surface waters the WFD aims to ensure at least a minimum chemical quality, particularly in relation to very toxic substances, the case regarding groundwater is somewhat different: the assumption is that groundwater should not be polluted at all. Therefore, the WFD strategy includes a prohibition on direct discharges to groundwater and, to cover indirect discharges, requires groundwater bodies to be monitored so that any change in chemical composition can be detected.

In order to achieve these objectives, more efficient analytical techniques need to be developed. This is so that the public health can be protected by ensuring that levels of pollutants remain below EQS concentrations and by providing, on a continuous basis, information on the fate of existing chemicals. A variety of multiresidue analytical procedures capable of analyzing an important number of chemicals¹⁰⁻¹⁴ in a single run have been reported in recent years. Most of them combine the high resolution of chromatographic methods (gas chromatography (GC), HPLC, and UPLC) with the excellent detectability of sophisticated detectors like those based on mass spectrometry. In spite of this, these procedures lack the requisite sample throughput for a really effective assessment of the health of aquatic environments. The main limitations are due to the sequential nature of these analytical methods as well as the need to clean up and preconcentrate samples prior to analysis. In this context, immunochemical methods, which are based on the affinity of an antibody for an antigen (Figure 8.1), should be looked at as an interesting alternative for a number of reasons.

Firstly, measurements are performed by default in aqueous media, which makes these methods excellent tools for the analysis of aqueous samples. Secondly, owing to high specificity and detectability of certain substances or groups of substances, it is often possible to analyze them directly in the same matrix without having to purify, extract, and preconcentrate the sample. It is also possible to develop a variety of immunochemical configurations targeted to particular analytical requirements. Thus, a great number of immunochemical methods for the on-site analysis of environmental pollutants have been reported or are commercially available.¹⁵⁻¹⁹ On the other hand, simultaneous analysis of many samples is possible by incorporating the immunoreagents on formats using 96- or 384-well microplates and developing formats with high sample-throughput capacities.²⁰⁻²² Selective sample treatments based on immunosorbents yield very clean aqueous extracts; such techniques can then be applied in tandem with some other type of immunochemical or chromatographic analysis.²³⁻²⁶

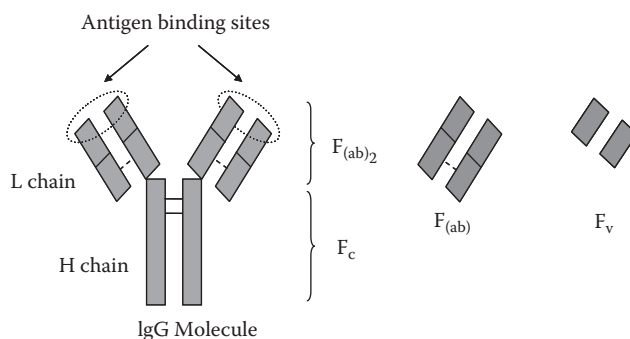


FIGURE 8.1 Basic H_2L_2 structure of the G immunoglobulins (IgG). It is formed by two pairs of polypeptide chains interlinked by disulfide bonds. The F_c fragment is the constant region and is involved in immune regulation, whereas the $F_{(ab)}$ (antibody binding fraction) fragment is the region that contains the variable fraction (F_v) with specific binding sites that allow interaction with Ag.

Recent years have witnessed interesting advances in the incorporation of selective immunoreagents into electronic devices, which emit optical or electrical signals in response to the presence of an analyte. Immunosensors have made it possible to develop integrated devices capable of handling data and of taking automated remedial action when the analyte is present.^{3,27–33} Since the reader will find extensive information in recent reviews on the fundamentals^{34–38} of these immunochemical analytical methods and examples of their application in environmental analysis,^{29,30,33,39–44} we will now concentrate our attention on the applicability of these methods to the determination of some of the most important pollutants in aquatic environments—specifically, marine and freshwater ecosystems and their biota. The chapter does not pretend to be an exhaustive review of what has been reported in the literature; rather, its aim is to provide the reader with representative examples of immunochemical analytical technologies that have either been applied to the aquatic environment or exhibit great potential in this respect. Examples of the several groups of chemicals have been selected according to their toxicological risk, relevance, and regular use or production.

8.2 IMMUNOCHEMICAL DETERMINATION OF INDUSTRIAL CONTAMINANTS

Worldwide industrial activity generates vast amounts of chemical residues such as metals, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polyhalogenated biphenylethers, and surfactants. One of the main concerns regarding the contamination caused by such activity is the enormous amount of unknown substances generated as by-products during the manufacture of other chemicals. The highly toxic dioxins, for example, are released into the environment largely as the unwanted by-products of industrial processes. In addition, there is the risk of major accidents, like the Seveso accident in 1976, with dramatic consequences for the population. Immunochemical methods for following up and monitoring the emissions of some of these pollutants into the aquatic environment have been reported.

8.2.1 POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS

PAHs are chemical compounds consisting of fused aromatic rings without any heteroatoms or substituents. They are formed mainly from the incomplete combustion of organic carbon-containing fuels such as wood, coal, diesel fuel, fat, or tobacco. PAHs can be found airborne in the gaseous phase or adsorbed to particles,⁴⁵ in aqueous matrices like groundwater, wastewater, drinking water, or river water,⁴⁶ and even adsorbed to solids in sediments or soils.⁴⁷ The U.S. Environmental Protection Agency (EPA) includes 16 PAHs in the list of priority pollutants in wastewater to be

TABLE 8.2
Immunochemical Techniques Developed for the Detection of PAHs

Target Analyte	Technique	Matrix	Sensitivity		Reference
			LOD	IC ₅₀	
PAHs					
Benzo(a)pyrene ^a	ELISA	Water and sediments	0.7 µg L ^{-1b}	20.5 µg L ^{-1b}	50
	ELISA	Tap, lake, and river water	24 µg L ^{-1b}	65 µg L ^{-1b}	51
	ELISA ^c (SDI, Newark, USA)	Soil		3.2 µg L ^{-1b}	54
	ELISA ^c (SDI, Alton, UK)	Sediment	5.5 µg kg ⁻¹	255 µg kg ⁻¹	55
PAHs	ELISA ^c (Ohmicron, PA, USA)	River water		0.1–37 µg L ^{-1b}	57
	Immunsorbent-LC	Surface water	0.002 µg L ⁻¹		48
	Immunoaffinity and GC-MS	Corals	25 µg kg ⁻¹		62
Phenanthrene ^a	Amperometric immunosensor	River water	5.0 µg L ⁻¹	18.0 µg L ⁻¹	58
		Tap water	6.3 µg L ⁻¹	26.0 µg L ⁻¹	
	Amperometric immunosensor	Sea, river, and tap water	1.4 µg L ^{-1b}	29.3 µg L ^{-1b}	59

^a Indicator of total PAHs.

^b LODs and IC₅₀ calculated in buffer solution.

^c Commercial kit.

monitored⁴⁸ because of their carcinogenic, mutagenic, and toxic properties.⁷ The European Council Directive 98/83/EC concerning the quality of water intended for human consumption (WIHC) established a limit of 0.01 µg L⁻¹ for benzo(a)pyrene, the lowest limit set for any individual chemical parameter in this directive.

As can be seen in Table 8.2, several immunochemical techniques, principally enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs), have been developed and applied to environmental samples such as water, soil, and sediments with very good limits of detection (LOD).^{49–51}

EPA has included commercially available ELISA kits in its list of official methods (Method 4035)⁵² capable of detecting PAH concentrations >1 mg kg⁻¹ in soil samples.^{53–56} The usual ELISA configurations for the analysis of small molecules are shown in Figure 8.2.

Most of the antibodies described were produced against one particular PAH congener, but because of their structural similarities they are in fact able to detect several PAHs. For this reason, different assays employ distinct target analytes as indicators of total PAH content, for example, phenanthrene,^{53,56} benzo(a)pyrene,^{50,51,54,55} or pyrene.⁴⁹ When real samples are immunoassayed, PAH levels have often been overestimated due to cross-reactivity with other congeners in the same sample.^{50,54,57} In contrast, the underestimated PAH levels reported following the analysis of sediments⁵⁵ or contaminated soil samples⁵⁶ can be explained by the low extraction efficiency of the methods recommended in most commercial kits, where samples are merely shaken manually in the presence of an organic solvent. Nevertheless, the possibility must also be entertained that the sample contains PAHs with a low response factor to the particular antibody employed in the kit.^{49,53} Amperometric immunosensors employing electrodes directly printed with an immobilized competitor of the target analyte have also been investigated to detect phenanthrene in environmental samples. Following this approach, Fahrnich et al.⁵⁸ achieved detection limits of 5 µg L⁻¹ in river water and 6 µg L⁻¹ in tap water samples. Moore et al.⁵⁹ applied the same transducing principle to

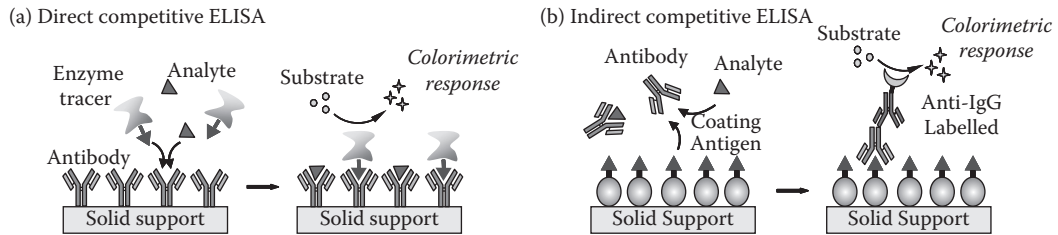


FIGURE 8.2 Scheme of the ELISA formats most frequently used for the analysis of low-molecular-weight analytes. Direct competitive ELISA: the Ab is coated on the surface and a competition is established between the analyte and the enzyme tracer. After the washing step, a substrate is added to produce a chromogen product that is easily quantified. Indirect competitive ELISA: a coating antigen is immobilized on the solid support while the specific IgG and the analyte are in solution during the competition step. After the removal of unbound reagents, a secondary IgG labeled with the enzyme (IgG-enzyme), which specifically recognizes the Ab, is added. Finally, after another washing step, the amount bound is also quantified by the addition of the substrate solution.

analyze phenanthrene in sea, river, and tap water samples, obtaining an LOD of $1.4 \mu\text{g L}^{-1}$. These biosensors have great potential in field assays, where simple, quick detection systems are required: unlike the microplate ELISA methods, the measurements do not involve many operational steps. Biosensors based on surface plasmon resonance (SPR) have also been reported, although they have not often been used to analyze PAHs in real environmental samples. Figure 8.3 illustrates both the SPR principle and the schematic representations of a typical sensogram obtained with this technique. Gobi et al.⁶⁰ used this methodology to analyze benzo(a)pyrene in buffer with promising results (LOD = $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$). Liu et al.⁶¹ report the use of an immunosensor based on piezoelectric signal transduction for the analysis of benzo(a)pyrene, pyrene, and naphthalene compounds; when measuring buffered samples, this device can achieve an LOD in the nM range.

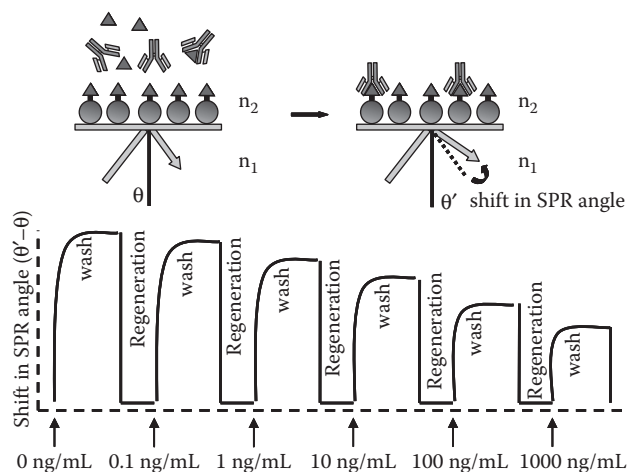


FIGURE 8.3 Sensogram generated by SPR principle for the constant concentration of antigen and antibody, and the varying concentration of analyte. Surface plasmons are excited by the light energy at a critical angle (θ) causing an oscillation and the generation of an evanescent wave. Under this condition a decrease in the reflected light intensity is observed. The angle θ depends on the dielectric medium close to the metal surface and is therefore strongly affected by molecules directly adsorbed on the metal surface. This principle allows the direct detection of the interaction between the analyte and the antibody.

As an alternative, immunoaffinity procedures have been developed to selectively extract PAHs from environmental samples. Thomas and Li⁶² demonstrated the greater efficiency of immunoaffinity methods in comparison with conventional extraction procedures. Bouzige et al.⁴⁸ prepared an immunosorbent for use in an on-line analytical procedure, followed by liquid chromatography coupled to fluorescence detection, to monitor surface water samples. The sensitivity of the fluorescence detection in combination with the selectivity of the immunoextraction (IS-HPLC-UV) enabled PAH compounds to be detected at levels between 2 and 10 ng L⁻¹.

8.2.2 SURFACTANTS

Surfactants are very common water pollutants, mainly because of their extensive use in detergent formulations that are directly discharged into the environment via wastewater.⁶³ They are usually organic compounds described as being amphiphilic, that is, containing both hydrophobic and hydrophilic groups. The most commonly accepted and scientifically sound classification of a surfactant is based on the charge present in the hydrophilic portion of the molecule after its dissociation in aqueous solution. Anionic surfactants are based mainly on sulfate, sulfonate, or carboxylate compounds: examples include linear alkylbenzene sulfonates (LAS), fatty alcohol sulfates (FAS), alkyl sulfonates (AS), alkyl ether sulfates (AES), and sodium dodecyl sulfate (SDS).⁶⁴ Commercial LAS, which represent more than 40% of all surfactants, consist of a mixture of at least 20 compounds, including isomers.⁶⁵ Residues of LAS, as well as their metabolites, the sulfophenyl carboxylates (SPCs), have been found in marine sediments⁶⁶ and in surface waters from the low $\mu\text{g L}^{-1}$ up to the 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ range.⁶⁷⁻⁶⁹ On the one hand, the toxicity of these compounds is low, but on the other, they may assist the permeation of other pollutants into aquatic biota.⁷⁰ Nonionic surfactants, such as alkylphenol ethoxylates (APEs) and alkyl ethoxylates (AEs), do not ionize in aqueous solution; they are extensively used in detergent formulations or as stabilizers in plastics. The main components of APEs are isomers of nonylphenol ethoxylate (NPE) and to a lesser extent, compounds related to octylphenol ethoxylate (OPE). Alkylphenols (APs), APE metabolites, and their halogenated derivatives are much more persistent in the aquatic environment and thus give reason for concern. Nonylphenol (NP) and octylphenol (OP) are listed as surface water priority substances; they are endocrine disruptors with powerful estrogenic effects.^{71,72} Accordingly, the OSPAR commission (from the Oslo and Paris conventions),⁷³ whose brief it is to protect the marine environment of the North-East Atlantic, decided to phase out the use of APEs by the year 2000.⁷⁴ Nevertheless, monitoring of APEs will still be necessary in the coming years. Finally, the class of cationic surfactants includes nitrogen compounds such as fatty amine and quaternary ammonium salts (QAC), in which the hydrophobic groups are attached to positively charged nitrogen. These surfactants, which also have a biocide effect, are in general more expensive than the anionic ones and therefore less often used.⁶⁴ Their poor solubility and tendency to adsorb to solids or to form complexes with anionic substances reduce the risk to the aquatic environment. The application of immunoassays to the analysis of surfactants started in 1982 with the determination of Triton X, one of the best known APEs, with ELISA achieving detection limits in the $\mu\text{g L}^{-1}$ range.⁷⁵ Since then, numerous immunochemical techniques have been developed, mainly to detect anionic and nonionic surfactants in the environment (Table 8.3).

With regard to anionic surfactants, Ramón-Azcón et al.^{76,77} reported an immunoassay for LAS determination in wastewater samples (LOD = 2 $\mu\text{g L}^{-1}$). The assay also identified, with a high level of cross-reactivity, the long SPC chain that is formed after LAS degradation. Analyses can be performed directly in wastewater merely by diluting the samples 10-fold to eliminate matrix interferences. Similarly, Estevez and co-workers recently reported an immunoassay for short alkyl chain SPCs, which are the final degradation products of LAS.⁷⁸ Because these products are highly polar, it is quite difficult to analyze SPCs if an extraction/preconcentration step is necessary. In contrast, immunochemical methods allow the direct determination of these chemical markers in aqueous samples. Thus, Zhang et al.⁷⁹ developed a sequential injection analysis (SIA) combined with a

TABLE 8.3
Immunochemical Techniques Developed for the Detection of Surfactants

Target Analyte	Technique	Matrix	Sensitivity		Reference
			LOD	IC ₅₀	
Surfactants					
AEs	ELISA (tube assay)	Tap and river water	2 µg L ^{-1a}	12 µg L ^{-1a}	89
	ELISA (plate assay)	Tap and river water	20 µg L ⁻¹	71 µg L ⁻¹	89
APEs	ELISA	River water	16 µg L ^{-1a}	79 µg L ^{-1a}	63
	ELISA	Polluted and tap water	10 µg L ^{-1a}	246 µg L ^{-1a}	72
	Sequential injection CL assay	River water	10 µg L ⁻¹	30 µg L ^{-1a}	86
APs	ELISA	Surface river water	µg L ⁻¹ range		87
	SPR	Marine products, shellfish	10 µg kg ⁻¹		90
LASs	ELISA	Wastewater	1.8 µg L ^{-1a}	28,1 µg L ^{-1a}	76
	IS fluorescence detection assay	Waste- and groundwater	7 µg L ⁻¹		81
	FPIA	Waste- and groundwater	30 µg L ⁻¹		394

^a LODs and IC₅₀ calculated in buffer solution.

chemiluminescence detector and neodymium magnet to perform magneto-immunoassay experiments for the analysis of LAS; they achieved an LOD of 25 µg L⁻¹. Moreover, Sánchez-Martínez et al.⁸⁰ developed a very sensitive fluorescence polarization immunoassay (FPIA) for analyzing LAS in wastewater and groundwater samples. Previously, the same authors had developed an immunoaffinity chromatography procedure followed by fluorescence detection to analyze LAS in tap water, groundwater, and wastewater samples.⁸¹ Recoveries were between 86% and 111% with dodecylbenzenesulfonate (LDS) as analyte (LOD = 7 µg L⁻¹).

The immunochemical determination of APEs and AP has been undertaken by several research groups^{63,72,82,83} (for further details, see the review by Estevez-Alberola and Marco⁸⁴), although the detectability achieved is not good enough to analyze NP at the EQS value established for all surface waters (0.33 µg L⁻¹).⁸⁵ An LOD of 10 µg L⁻¹ has recently been reported for a chemiluminescent immunoassay of APE.⁸⁶ Previously, a highly sensitive and reproducible ELISA method had been described for NP, but the LOD obtained (2.3 µg L⁻¹) was again still insufficient.⁸² This is why it is often necessary to include a preconcentration step prior to immunochemical analysis. The precision and accuracy of most of these ELISAs have therefore been evaluated by measuring these surfactants in spiked river samples, following a solid-phase extraction (SPE) procedure; recoveries have been good: 85–118%.^{63,87} The validation studies carried out by several groups have also shown good correlation with chromatographic methods,^{72,76,88} although some samples analyzed were clearly overestimated. The accuracy of the APE immunoassay mentioned above⁸⁶ was also successfully evaluated by measuring spiked river samples. Usually, a wide cross-reactivity pattern is observed, in which APEs with a distinct number of ethoxylate units are detected in addition to AP and certain carboxylate metabolites. A highly selective ELISA for AEs has also been developed and evaluated by measuring different spiked water matrices, such as distilled, tap, and river water samples, with recoveries reported to be in the 75–134% range.⁸⁹ Furthermore, an SPR Biacore sensor was applied by Samsonova et al.⁹⁰ to detect NPs in different shellfish matrices like mussels, oysters, cockles, and scallops.

The detection limits obtained for all the aquatic biota samples were around 10 µg kg⁻¹,⁹⁰ which is good enough considering the QS estimated for aquatic biota [10 mg NP kg⁻¹ food (wet weight)].⁹¹ Several amperometric biosensors have been described, but none which might be suitable for aquatic

environment monitoring. Rose et al.,⁹² for example, analyzed APE and AP in buffer using a capillary immunoassay with subsequent amperometric detection, and Evtugyn et al.⁹³ developed another amperometric immunosensor for the analysis of NP with an LOD of $10 \mu\text{g L}^{-1}$.

Several ELISA methods for determining cationic surfactants have been reported although we have not found any examples of their application to real environmental samples. The detectability obtainable by these methods is very good: an LOD of $0.04 \mu\text{g L}^{-1}$ has been reported for benzyldodecylammonium chloride (BDD12AC), a component of benzalkonium chloride (BAK).⁹⁴

8.2.3 ORGANOHALOGENATED COMPOUNDS

The toxicity, bioaccumulative potential, and ecological impact of organohalogenated substances such as polychlorinated biphenyls (PCBs), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs), polychlorinated dibenzo-*para*-dioxins (PCDDs), or polybrominated diphenylethers (PBDEs) have been extensively reviewed.^{95–98} All are referred to as persistent organic pollutants (POPs), that is, chemical substances that remain in the environment, bioaccumulate through the food chain, and pose a risk to human health and the environment. The international community is calling for action to reduce and then eliminate the production or formation of these substances and to monitor their emission. In this case, the detectability obtainable by analytical methods should be very low, since the limits established for these residues are in the ng per liter range.

PCBs, which have been commonly used as lubricants, immersion oils, or fire retardants, are normally formed by the chlorination of biphenyl in the presence of an FeCl_3 catalyst. PCB production was banned in the 1970s because of the high toxicity of most PCB congeners and mixtures. The number and the location of chlorine atoms in a specific PCB congener determine its physicochemical properties, environmental pathways, and toxicity. Isomers with a higher chlorine content bind preferentially to organic matter present in the solid phase; consequently, they are not easily degraded and are also poorly leached from sediments by water.⁹⁹ On the other hand, some PCBs are more mobile, hence their tendency to volatilize, and therefore to circulate, in gaseous form, through different environmental compartments.¹⁰⁰ PCBs are classified as a probable human carcinogen by EPA, which has established a maximum contaminant level goal of zero and a maximum contaminant level and practical quantification limit of $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ in drinking water.¹⁰¹ In the USA, regulatory limits for soil remediation vary according to state and site, but in general are 5 or $10 \mu\text{g g}^{-1}$ for industrial restricted access areas and 1 or $2 \mu\text{g g}^{-1}$ for residential access areas.¹⁰² For this reason, EPA has established method 4020, a procedure for screening soils and nonaqueous waste liquids, to determine when total PCBs are present at concentrations above 5 , 10 , or 50 mg kg^{-1} .¹⁰³ Table 8.4 shows other results regarding the analysis of organohalogenated compounds in environmental matrices. A commercially available ELISA test (PCB RAPID Assay[®]) has also been used to analyze these compounds; an LOD of $0.6 \mu\text{g g}^{-1}$ was obtained in mussel tissues.¹⁰⁴ Lawruk et al. applied the same kit but with super paramagnetic particles as the solid support to analyze soil and water samples; they obtained detection limits of $0.2 \mu\text{g L}^{-1}$ and $500 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectively.¹⁰⁵ Another commercial ELISA kit (EnBioTec Laboratories) was evaluated for PCB 118 determination in retail fish samples (LOD = $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$).¹⁰⁶

Now let us take a brief look at other approaches. Zhao et al.¹⁰⁷ developed an optical immunosensor consisting of a quartz crystal fiber coated with partially purified polyclonal antibodies to detect PCBs in soil and water samples. The optical signal was generated by the fluorescence produced when the 2,4,5-trichlorophenoxybutyrate fluorescein conjugate binds to the previously coated antibody.¹⁰⁷ Electrochemical immunosensing strategies using carbon-based screen-printed electrodes as transducers in a direct competitive immunoassay have also been applied in the analysis of PCBs in marine sediment extracts^{108,109} (LOD = $<1 \mu\text{g L}^{-1}$). Pribyl et al.¹¹⁰ developed a piezoelectric quartz crystal (PQC) immunosensor for the *in situ* determination of different PCB congeners in soil toluene extracts without any additional purification step. Also, a high-performance immunochromatographic (HPIAC) procedure has been successfully used as a cleanup method to isolate PCBs from water samples.¹¹¹

TABLE 8.4
Immunochemical Techniques Developed for the Detection of Organohalogenated Compounds

Target Analyte	Technique	Matrix (Pretreatment)	Sensitivity		Reference
			LOD	IC ₅₀	
Organohalogenated Compounds					
PCBs	PQC immunosensor	Soil samples		6 µg L ⁻¹	110
118	ELISA (EnBioTec Labs)	Fish muscle tissue		0.05 µg L ^{-1a}	106
Aroclor [®] 1248	Immunomagnetic	Marine sediment extracts	24 µg L ⁻¹	0.4 µg L ⁻¹	108,109
Aroclor [®] 1242	amperometric		8 µg L ⁻¹	0.5 µg L ⁻¹	
Aroclor [®] 1016	immunosensor		94 µg L ⁻¹	0.8 µg L ⁻¹	
Aroclor [®] 1254	ELISA ^a (PCB Assay [®])	Mussel tissue		600 µg kg ⁻¹	104
	MAG particle IA	Water Soil		0.2 µg L ⁻¹	105
	(PCB RaPID Assay [®] kit)			500 µg L ⁻¹	
Aroclor [®] 1242	Fiber optic immunosensor	Soil, river, and bay water		10 µg L ⁻¹	107
PCDDs (TMDD)	ELISA	Soil	0.123 µg kg ⁻¹	0.028 µg kg ⁻¹	121

^a Commercial kit.

Other immunochemical techniques, not applied to environmental samples as yet, could be interesting for the future analysis of these residues.^{112,113}

Immunochemical methods have also been reported for PCDDs and PCDFs. These substances are unintentionally formed during combustion processes and in the synthesis of chlorine gas and other chemicals used in the bleaching procedures of the pulp or paper industry.^{114,115} PCDDs have 75 positional congeners with different grades of toxicity, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) being the most toxic. The extremely low water solubility of these compounds,¹¹⁶ which is approximately 1000-fold lower than that of PCBs and PAHs, has significant downstream effects on the development of immunoassays because they are applied in aqueous media. EPA has established an official immunoassay method (4025) based on a commercially available ELISA kit that uses polyclonal antibodies for the analysis of these compounds in soil samples at 0.5 µg kg⁻¹ levels.¹¹⁷ Harrison and Carlson developed both a tube test and a microplate assay using one of Stanker's monoclonal antibodies^{118,119} and obtained detection limits of 167 and 50 pg L⁻¹ for TCDDs in soil samples.¹²⁰ The use of accelerated solvent extraction (ASE) followed by ELISA for the rapid screening of dioxin-contaminated soils has been reported recently.¹²¹ An immunoaffinity chromatography method for the purification of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and furans from biological samples was explored with the aim of simplifying the cleanup procedure and thereby reducing the time and cost of analysis.¹²² A study of the effect of organic solvents on the development of an ELISA has also been reported; an IC₅₀ of 0.24 µg L⁻¹ for TCDD was obtained.¹²³ Additionally, a piezoelectric immunosensor system was developed for the rapid detection of PCDDs primarily in buffer. In this case, the antibodies deposited in the quartz crystal resonator were able to quantitatively detect concentrations between 0.01 and 1.30 µg L⁻¹.¹²⁴

Finally, PBDEs—mainly three commercial mixtures known as Penta-BDE, Octa-BDE, and Deca-BDE—are still widely used as flame retardants in products such as polymers, resins, electronic devices, building materials, textiles, and the polyurethane foam padding used in furniture and carpets. The intensive production and use of these compounds has made them ubiquitous in the environment and in biota.^{125,126} EPA is working with industry, governments, and environmental and public health groups to research and better understand the potential health risks posed by these substances.¹²⁷ The European Commission is also aware of these risks to the environment and public health and has established EQS in the low ppt level. Thus, for Penta-BDE, the annual average (AA) EQS is 0.0005 µg L⁻¹ for inland surface waters and 0.0002 µg L⁻¹ for other surface waters. There

have been a few attempts to develop immunochemical methods for polybrominated flame retardant compounds. An ELISA kit for the analysis of PBDE is commercially available from Abraxis LLC. Based on the use of magnetic particles, this kit is addressed to the 47th and 99th congeners that compose the Penta-BDE formulation; LOD for the 47th congener is $<25 \text{ ng L}^{-1}$. Shelver et al.¹²⁸ have reported an ELISA with an IC_{50} value of $28 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ for BDE-47 in buffer.

8.2.4 HEAVY METALS AND METALLOIDS

Heavy metals are also considered dangerous and persistent environmental contaminants. At least 20 are known to be toxic in some way and fully half of these, including As, Cd, Cr, Cu, Pb, Hg, Ni, Ag, Se, or Zn, are released into the environment in sufficient quantities to constitute a risk to human health. Metals bind easily to soils or sediments, and in this form they are relatively nontoxic; but changes in the weather or medium pH in combination with other environmental factors can mobilize them, thereby increasing their availability and effective toxicity. For this reason, sites contaminated with heavy metals must be monitored regularly. By way of example, mercury exceeds the 1 mg kg^{-1} action level, established by the U.S. Food and Drug Administration (FDA), in many marine and freshwater fish samples. For mercuric chloride used in medicine, the minimum risk level for Hg exposure is 0.007 mg kg^{-1} per day.¹²⁹ EPA has therefore certified an immunoassay (Method 4500) that provides a screening procedure for the determination of mercury in soils at concentrations up to 0.5 mg kg^{-1} . On the other hand, the Lead and Copper Rule (LCR), introduced by the EPA in 1991, established an action level of 0.015 mg L^{-1} for lead and 1.3 mg L^{-1} for copper based on the 90 percentile level of tap water samples.¹³⁰ Another method (4510), again proposed by EPA, also determines lead in water and soil by means of an immunoassay.¹³¹ Nowadays, many of the heavy metals mentioned above are also regulated by the European Union; in water for human consumption, the permitted levels of chromium and mercury are 50 and $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, respectively.¹³² Moreover, cadmium and its compounds are among the 33 priority substances with an EQS of $0.08 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ in water listed in the proposal for a Directive [COM(2006)398 final] presented by the European Commission.

Basically, there are two ways of producing antibodies against heavy metals. Firstly, when the immunogen consists of a heavy metal bound to a chelator like EDTA, the antibodies raised do not recognize the metal itself but identify the entire structure.^{133–135} On the other hand, if the antibodies are produced directly against the heavy metal attached to a suitable immunogen,^{136,137} the free metal can be recognized instead of the cage-like chelate structure. Wylie et al.¹³⁷ developed highly specific antibodies for mercury using a glutathione complex, which is the basis of the only commercially available metal ion immunoassay (BiMelyze[®] Mercury Immunoassay). Alternatively, Lerner et al.¹³⁸ reported the isolation of recombinant antibody fragments that preferentially recognize certain metals complexed to iminodiacetic acid. Some examples of immunochemical techniques applied to detect heavy metals in environmental samples are given in Table 8.5. ELISAs for detecting cadmium(II),

TABLE 8.5
Immunochemical Techniques Developed for the Detection of Heavy Metals

Target Analyte	Technique	Matrix	Sensitivity		Reference
			LOD	IC_{50}	
Heavy Metals					
Cd(II)	ELISA	Environmental water samples	$7 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$	—	134
Hg(II)	ELISA	Water (EPA samples)	$0.5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$	—	137
	ELISA ^a (BiMelyze [®])	Scallop tissue extract	$100 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$	—	395
Pb(II)	FPIA	Soil	20 ng kg^{-1}	—	140

^a Commercial kit.

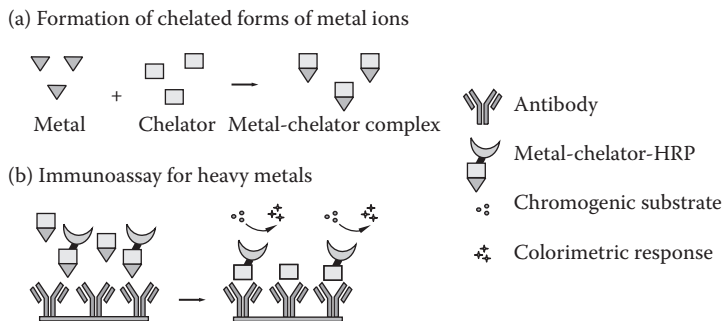


FIGURE 8.4 Scheme of the ELISA format most commonly used for the analysis of heavy metals, where antibodies recognize chelated forms of metal ions.

nickel(II), lead(II), and mercury(II) in water samples have also been reported.^{134,139} The most common ELISA format used for the analysis of these compounds can be seen in Figure 8.4.

Similarly, an FPIA used polyclonal antibodies raised against the lead(II)-EDTA chelate to detect the metal in soils, solid waste leachates, airborne dust, and drinking water samples.¹⁴⁰ Moreover, the Kin ExA™ 3000 automated immunoassay instrument was adapted to analyze Cd(II), Co(II), Pb(II), and U(VI) metals in groundwater samples.¹⁴¹ On the other hand, monoclonal antibodies, raised against the Cd-EDTA complex, have been used to develop an immunochromatography (IC) procedure for the quick testing of Cd in food (LOD = 0.3 $\mu\text{g kg}^{-1}$).¹³⁵ The development and validation of a one-step immunoassay for the determination of Cd(II) in human serum with an LOD of 0.24 $\mu\text{g L}^{-1}$ has also been described,¹³³ as has the optimization and validation of an immunoassay that measures soluble indium at 0.005 $\mu\text{g L}^{-1}$ in buffer.¹⁴² An alternative way of detecting the presence of heavy metals is to use molecular biomarkers such as the diagnostic and prognostic tools used in marine pollution monitoring. Metallothioneins (MTs) are synthesized by toxic metals such as Cd, Hg, and Cu by chelation through cysteine residues and act as biomarkers of metal exposure in both vertebrates and invertebrates. These biomarkers are used with a range of molecular approaches to evaluate the exposure of various sentinel marine organisms, for example, mussels, clams, oysters, snails, and fishes, to metal contaminants.

The demonstration that MTs from a wide variety of fish species are recognized by an antiserum raised against one piscine MT has enabled the development of immunotechniques based on ELISA¹⁴³ and radioimmunoassay (RIA) procedures¹⁴⁴ for the quantification of these compounds. A competitive solid-phase assay based on dissociation-enhanced lanthanide fluoroimmuno-detection (DELFI) of anti-MT monoclonal antibody bound to a solid phase has been reported.¹⁴⁵ An electrochemical determination of MTs by square wave cathodic stripping voltammetry has also been developed and optimized.¹⁴⁶

8.2.5 OTHER INDUSTRIAL POLLUTANTS: BISPHENOL A

Among the emerging pollutants of industrial origin, Bisphenol A [2,2 bis(4-hydroxydiphenyl)propane] (BPA) has special relevance since it was one of the first chemicals discovered to mimic estrogens as endocrine disrupters.¹⁴⁷ This compound was first reported by Dianin et al.¹⁴⁸ in 1891. BPA is produced in large quantities worldwide, mainly for the preparation of polycarbonates, epoxy resins, and unsaturated polyester-styrene resins.¹⁴⁹ The final products are used in many ways, such as coatings on cans, powder paints, additives in thermal paper, in dental composite fillings, and even as antioxidants in plasticizers or polymerization inhibitors in PVC. To a minor extent, BPA is also used as precursor for flame retardants such as tetrabromobisphenol A or tetrabromobisphenol-S-bis(2,3-dibromopropyl) ether.¹⁵⁰ This substance can enter the environment via the effluent from the factories

TABLE 8.6
Immunochemical Techniques Developed for the Detection of Bisphenol A

Target Analyte	Technique	Matrix	Sensitivity		Reference
			LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	IC ₅₀ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
Bisphenol A	TIRF immunosensor	Water	0.005 ^a	—	163
	SPR immunosensor	MilliQ water	0.014	0.86	162
		Groundwater	0.168	5.12	
		River water	0.292	8.38	

^a LODs and IC₅₀ calculated in buffer solution.

producing it because it is not completely removed during wastewater treatment.^{151,152} Several studies have demonstrated that BPA released to ground or surface water may be strongly adsorbed to soil or sediments.^{153–155} Several ELISA applications have been developed to determine BPA in environmental and industrial waste samples.^{56,157} Zhao et al.¹⁵⁸ obtained an LOD of $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ in real water samples. Recently, immunosensors have appeared on the market to complement conventional immunoassays for the analysis of this compound (Table 8.6). Optical SPR immunosensors have been reported to analyze BPA in buffer,^{159–161} while a fully automated sensor called River ANALyzer (RIANA), based on a combination of fluorescent labels and the evanescent wave principle, achieved an LOD of 14 ng L^{-1} in natural water samples.^{162,163} Moreover, an impedimetric immunosensor, based on label-free direct detection of BPA with a quartz crystal microbalance, has been reported to obtain a detection limit of *ca.* $0.3 \mu\text{g L}^{-1}$ in human serum.¹⁶⁴

Park et al. demonstrated the effectiveness of piezoelectric immunosensors as a valuable alternative screening method for BAP environmental monitoring, achieving an LOD of $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$, although so far, only in buffer.¹⁶⁵ Further immunoaffinity chromatographic methods have been developed with the aim of improving the analytical procedure of BPA in biological fluid samples¹⁶⁶ and in canned food.¹⁶⁷ The same approach could be used to shorten cleanup steps, as well as the cost and time of analysis of other environmental samples.

8.3 IMMUNOCHEMICAL METHODS FOR PESTICIDES

Pesticides are chemical substances used for preventing or limiting the damage caused by pests. Thus, unlike other groups of chemicals, pesticides are intentionally released into the environment. Moreover, there is a high risk of these chemicals turning up in the food chain: foodstuffs may become contaminated during agricultural production, processing, packaging, and storage. Owing to the sheer volume of their usage, coupled with their universal distribution, environmental persistence, and toxicological properties, pesticides are considered a major public health hazard. Agricultural pesticides may lead to contamination of surface and groundwaters by drift, runoff, drainage, and leaching.¹⁶⁸ Surface water contamination may have ecotoxicological effects on aquatic flora and fauna as well as on human health.^{169,170} In the aquatic ecosystem, there is a continuous interchange of these compounds between the land, sediment, sediment–water interface, interstitial waters, aquatic organisms, and air–water interface. The distribution of pesticides between water and biotic materials can affect their dynamics in the ecosystem. Thus, their mobility, possible transformation, and biomagnification constitute a real threat to human health, wildlife, and the entire environment. This situation is reflected by the number of analyses on the influence of pesticides on particular aquatic ecosystems,^{171–179} and also by the presence of these biocides on most governmental priority lists of compounds that should be monitored. Intensive research has been carried out during the last 20 years aiming to develop analytical immunochemical technologies with improved

capabilities regarding detectability and sample-throughput capabilities for pesticide analysis in environmental matrices.^{41,180–185} In the following, we will take a brief look at some of the most important of these methodologies and their application to the aquatic environment; the reader will find more detailed information in recent reviews.^{25,41,43}

8.3.1 INSECTICIDES

Used in agriculture to combat insect pests since the 1940s, insecticides include several chemical families that constitute a serious environmental risk. Thus, organochlorine (OC) or organophosphorus (OP) insecticides, the first generation of pesticides, are known to be highly persistent in the environment, unlike the pyrethroids that break down quickly in direct sunlight, usually just a few days after application. Nowadays, the use of OC has been banned in most developing countries because of concerns about their environmental impact and human health effects; nevertheless, their residues are still present in many environmental and biological compartments. The most important immunochemical techniques developed to analyze these compounds are listed in Table 8.7.

In a recent study, we reported on how the general population is still exposed to these substances, as evidenced by the excretion of chlorophenols and bromophenols in urine.¹⁸⁶ The study used antibodies developed for trichlorophenol,^{187–189} an insecticide used as a wood and textile preservative, to extract these analytes from urine and to analyze them by combining immunosorbent cartridges¹⁹⁰ and an ELISA on a 96 setup, in such a way that 96 samples could be immunoextracted and analyzed in parallel. The results obtained from the immunochemical analyses were validated by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), showing excellent correlation.¹⁸⁶ One of the best known OC pesticides is dichloro-diphenyl-trichloroethane (DDT), and many research groups have attempted to develop antibodies to detect this compound.^{191,192} Beasley et al.,¹⁹³ in 1998, were the first to apply a DDT ELISA to environmental samples (LOD = 0.3 $\mu\text{g L}^{-1}$). Later, Amitarani et al.¹⁹⁴ reported on another ELISA where DDT was detected in river water samples at levels close to 1 $\mu\text{g L}^{-1}$. An FPIA for the detection of DDT and its isomers in drinking water was developed by Eremin et al.,¹⁹⁵ who achieved LODs of 12 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 30 ng L^{-1} , respectively. Several immunochemical analytical methods have also been developed for chlorinated cyclodienes (CCDs), such as endosulfan, heptachlor, chlordane aldrin, endrin, and dieldrin, since the pioneering work of Langone and Van Vunakis,¹⁹⁶ who designed a RIA for dieldrin and aldrin in 1975. Manclus et al.¹⁹⁷ produced monoclonal antibodies against endosulfan (α/β), which recognized almost all structurally related cyclodiene insecticides with good detectability. On the other hand, Stanker et al.¹⁹⁸ adapted a commercially available ELISA kit for the analysis of endosulfan in environmental water samples with very good results. Lee and Kennedy¹⁹⁹ produced polyclonal antibodies to develop an ELISA to detect endosulfan in runoff water and soil extracts with an LOD of 0.2 $\mu\text{g L}^{-1}$. A direct ELISA was also developed for screening aldrin, dieldrin, and endrin compounds in tap and Nile river water samples: LODs of 5 and 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ were obtained for aldrin and dieldrin, respectively.²⁰⁰ Finally, a fiber optic immunosensor was developed, which can detect most of the cyclodiene congeners at ppb levels in soil extracts and environmental water samples, using rabbit polyclonal antibodies raised against the chlorendic caproic acid hapten.²⁰¹

Several qualitative and quantitative immunochemical methods and their application to the analysis of environmental samples have been described for OP insecticides, a family that includes widely used pesticides such as azinphos-ethyl/methyl, dichlorvos, fenitrothion or fenthion, malathion, mevinphos, and parathion. Mercader and Montoya²⁰² produced monoclonal antibodies against azinphos-methyl and developed an ELISA that was used for the analysis of water samples from different sources, reaching detectability levels near 0.05 $\mu\text{g L}^{-1}$. Watanabe et al.²⁰³ reported the production of polyclonal antibodies and ELISA procedures to analyze fenitrothion in river, tap, and mineral water (LOD = 0.3 $\mu\text{g L}^{-1}$). Banks et al.²⁰⁴ produced polyclonal antibodies against dichlorvos, an organophosphate insecticide used for stored grain, which also cross-reacts with fenitrothion. Nishi et al.²⁰⁵ reported the first immunoassay for malathion. Residues of this insecticide have

TABLE 8.7
Immunochemical Techniques Developed for the Detection of Insecticides

Target Analyte	Technique	Matrix	Sensitivity		Reference
			LOD	IC ₅₀	
Insecticides					
Aldrin	ELISA	Tap and river water	5 µg L ⁻¹		200
	Optical immunosensor	Soil and water samples		5 µg L ⁻¹	201
Azinphos-ethyl/ methyl	ELISA	Well, tap, channel, cistern, and drinking water	0.05 µg L ⁻¹	0.33 µg L ⁻¹	202
Carbaryl	ELISA	Cucumber and strawberry		0.13 µg L ⁻¹	396
	SPR	Ground, river, and tap water	0.86 µg L ⁻¹	3.97 µg L ⁻¹	397
Carbofuran	Magneto-ELISA	Water and soil	5 µg L ⁻¹	0.056 µg L ⁻¹	213
	Planar array evanescent immunosensor	Ground and river water	0.1 µg L ⁻¹		222
	SPR immunosensor	Drinking water	0.03 µg L ⁻¹	1.06 µg L ⁻¹	223
Deltamethrin	ELISA	River sample	1.1 µg L ⁻¹	17.5 µg L ⁻¹	398
Endosulfan	ELISA ^a	Environmental water		2 µg well ⁻¹	198
	ELISA	Soil and runoff water	0.2 µg L ⁻¹		399
Esfenvalerate	ELISA	Tap and river water		30 µg L ⁻¹	400
	Fluorescence immunoassay	River water	0.04 µg L ⁻¹	0.8 µg L ⁻¹	233
Fenitrothion	ELISA	Fruit extracts	40 ng well ⁻¹	297 ng well ⁻¹	401
	ELISA	River and tap water	0.3 µg L ⁻¹	6 µg L ⁻¹	402
	ELISA	Rice extracts	3 µg L ⁻¹	14 µg L ⁻¹	403
Fenthion	Dipstick immunoassay	Food samples	0.5 µg L ⁻¹	15 µg L ⁻¹	404
Flucythrinate	ELISA	River water and soil	10, 0.2 mg L ⁻¹		405
Malathion	Sol-gel	Surface water	0.50 µg L ⁻¹	0.10 µg L ⁻¹	406
	immunosorbent				
Mevinphos	ELISA	Buffer	52 ng well ⁻¹	3700 µg L ⁻¹	407
Parathion	ELISA	Buffer		600 µg L ⁻¹	407
Parathion- methyl	Commercial kit	Water		0.3 µg L ⁻¹	408
Triazophos	ELISA	Buffer	0.11 µg L ⁻¹	5.51 µg L ⁻¹	409
	ELISA	Buffer	0.10 µg L ⁻¹	0.65 µg L ⁻¹	410

^a Commercial kit.

been detected in ground and surface water at levels up to 6.1 µg L⁻¹.^{206,207} Brun's group²⁰⁸ recently developed an assay with an LOD of *ca.* 0.1 µg L⁻¹ that was successfully applied to the analysis of river and groundwater samples. In contrast, monoclonal antibodies have been produced to develop an ELISA for the analysis of parathion and parathion-methyl compounds in water and milk samples at levels around 1 µg L⁻¹.²⁰⁹ Similarly, a commercially available ELISA kit (EnviroGard Parathion Plate Kit) has been validated for application in water samples: LODs of 0.03 and 0.05 µg L⁻¹ were obtained for parathion and parathion-methyl, respectively.

Since their commercial introduction in the early 1960s, *N*-methylcarbamate pesticides (carbaryl, carbofuran (CF), methiocarb, etc.) have been used worldwide as substitutes for OCs because of their excellent efficiency as insecticides and nematicides, their relatively low mammalian toxicities in

many cases, and their low bioaccumulation potentials. In recent years, several ELISAs have become commercially available or have been developed to determine these pesticides in water samples,^{210–215} as well as in fruits and vegetables.^{214,216–219} For example, the performance of two ELISA formats (microtiter plates and magnetic particles) were compared with the EPA method 531.1 (liquid chromatography-postcolumn derivatization-fluorescence detection, LC-PCR-FD) for the determination of carbaryl in groundwater samples of the Campo de Nijar aquifer (Almeria, Spain).²¹² A close correspondence was found for the results obtained when spiked and well water samples were split for analysis by ELISA and by LC-PCR-FD, but the absence of a matrix effect and the high throughput capability of the ELISA formats pointed to the superiority of these immunochemical methods for screening purposes. The presence of CF during a year in lake, well, and irrigation ditch water in an agricultural area south of Milan has been evaluated using a fluorescent immunoassay with a time-resolved revelation system. Results show that CF peaked at around 87 ng mL⁻¹ in September and October.²²⁰ Another interesting approach is the homogenous immunoassay developed for CF by the same group. In this case, the determination used liposomes and a mastoparan (Mast)-hapten conjugate as cytolytic agent. Dipicolinic acid (DPA) was used as fluorescent chelating agent. Liposome lysis was proportional to the standard concentrations in a dynamic range between 10 pg and 10 ng. The assay was applied to the analysis of tap water and environmental water samples taken from the same agricultural area, with recoveries of between 90% and 105%.²²¹ Automated methods and immunosensors have also been reported.^{215,220,222–227} Mauriz et al.²²⁶ described the application of a commercial optical sensor system based on SPR detection to the direct analysis of carbaryl in different environmental water samples without any sample pretreatment. Detection limits obtained for ground, river, and tap water were 1.3, 1.2, and 0.9 µg L⁻¹, respectively, whereas the IC₅₀ values obtained were in the 4.0–4.6 µg L⁻¹ range.

Immunochemical analytical methods have also been developed for pyrethroid insecticides. Lee et al.^{228,229} developed an immunoassay for analyzing pyrethroids of the second group that was applied to detect deltamethrin and bifenthrin in water and soil samples as well as deltamethrin in wheat grain. Watanabe et al.²³⁰ and Mak's group²³¹ developed a class-specific immunoassay for the first and second group of pyrethroids respectively, obtaining very good detection limits. A competitive ELISA has recently been developed for the detection of the pyrethroid insecticide cyhalothrin, giving an LOD of 4.7 µg L⁻¹; it was evaluated using fortified tap water, well water, and wastewater samples with recoveries between 80% and 114%.²³² Another interesting example is the fluorescence-quenching competitive immunoassay in microdroplets reported for the sensitive detection of the pyrethroid insecticide esfenvalerate using laser-induced fluorescence from a rhodamine hapten conjugate. The competitive immunoreaction was performed in microdroplets generated by a vibrating orifice aerosol generator system with a 10 µm diameter orifice. The fluorescence emitted from the droplets was detected by a 1/8 inch imaging spectrograph with a 512 × 512 thermoelectrically cooled, charged-coupled device. A very small mass of analyte could be detected with this method; thus, monitoring of a picoliter droplet sample enabled detection down to ~0.1 nM. Matrix interferences were negligible when this technique was applied to the analysis of river water samples.²³³ Sasaki et al.²³⁴ developed a novel SPR biosensor chip by using a plasma-polymerized ethylene diamine film over a gold layer sputtered onto glass. Antietofenprox antibody was immobilized on the glass surface using glutaraldehyde, and the response of the SPR biosensor was compared to that of a commercial chip. The result was not so different from that obtained with the commercial chip, but the fact that the plasma polymerized membrane is optically homogeneous might have helped to produce a higher response.

8.3.2 HERBICIDES AND PLANT GROWTH REGULATORS

Herbicides are used to get rid of unwanted plants like weeds, brush, unproductive trees, and other vegetation that may deprive crops and other “useful” plants of nutrients. Numerous immunological techniques for the analysis of triazines, such as atrazine, propazine, simazine, ametryn, and cyanazine, have been developed recently (Table 8.8).^{185,235–237} Owing to their environmental persistence and their

TABLE 8.8
Immunochemical Techniques Developed for the Detection of Herbicides

Target Analyte	Technique	Matrix	Sensitivity		Reference	
			LOD	IC ₅₀		
Herbicides						
2,4-D	Optical immunosensor	River and lake water	0.1 µg L ⁻¹		248	
	Dipstick immunoassay	Pond water	0.5 µg L ⁻¹	6 µg L ⁻¹	249	
2,4,5-T	ELISA	Soil and water samples		11.6 µg L ⁻¹	246	
Acetochlor	Polarization fluoroimmunoassay	Drinking water	9 µg L ⁻¹		271	
Atrazine	ELISA	Soil, ground, and water	1 ng L ⁻¹	20 ng L ⁻¹	238	
	ELISA	River, lake, and tap water		5 µg L ⁻¹	411	
	ELISA	Creek and drinking water	0.2 µg L ⁻¹		412	
	ELISA ^a	River, estuarine, and sea water	0.05 µg L ⁻¹	0.3 µg L ⁻¹	239	
	FIIA	Estuarine and sea water	75 ng L ⁻¹	470 ng L ⁻¹	413	
	ELISA		60 ng L ⁻¹	9 ng L ⁻¹		
	Amperometric immunosensor	Drinking water	6 ng L ⁻¹	0.17 µg L ⁻¹	240	
Isoproturon	SPR immunosensor	Well, river, and tap water	26 ng L ⁻¹	0.18 µg L ⁻¹	243	
	Optical immunosensor	River and estuarine water	0.14 µg L ⁻¹	1.65 µg L ⁻¹	255	
Metsulfuron-methyl	ELISA	Drinking water	40 ng L ⁻¹	1.4 µg L ⁻¹	274	
Propanil	RIANA	Drinking water	0.6 ng L ⁻¹	52 µg L ⁻¹	163	
Simazine	ELISA	Ground and tap water	50 ng L ⁻¹	0.1 µg L ⁻¹	414	
	ELISA	Lake, rain, and mineral water	0.01 µg L ⁻¹	0.07 µg L ⁻¹	415	
	ELISA	Ground and well water		2.03 µg L ⁻¹	416	
	ELISA	Tap water		0.75 µg L ⁻¹	417	
	Magneto-ELISA		Putah creek water			
			Bay water			
			Distilled water	0.349 µg L ⁻¹	1.76 µg L ⁻¹	418
	FIIA		Groundwater	0.402 µg L ⁻¹	2.09 µg L ⁻¹	
			Estuarine water	0.416 µg L ⁻¹	2.10 µg L ⁻¹	
			Drinking water	0.02 µg L ⁻¹		419
Optical immunosensor		Drinking water	0.026 µg L ⁻¹		420	
Sol-gel immunosorbent		Surface water	0.25 µg L ⁻¹	0.05 µg L ⁻¹	406	
m-ISLMA_1		Surface water	1 × 10 ⁻⁵ µg L ⁻¹	0.25 µg L ⁻¹	421	
m-ISLMA_2			2 × 10 ⁻² µg L ⁻¹	1 × 10 ⁻⁴ µg L ⁻¹		
m-ELISA			1 × 10 ⁻¹ µg L ⁻¹	13.8 µg L ⁻¹		
µ-IA		Mineral water	0.2 ng L ⁻¹		244	
µ-ISLMA			0.1 ng L ⁻¹			
Trifluralin	ELISA	Surface water	0.85 µg L ⁻¹	5.78 µg L ⁻¹	422	
Linuron	ELISA (OWLS)	Surface water	0.8 µg L ⁻¹	2.87 µg L ⁻¹	278	
	RIANA	River and MilliQ water	0.01 µg L ⁻¹	1.03 µg L ⁻¹	255	

water solubility (33 mg L^{-1}), triazines are distributed mainly in groundwaters and surface waters. For this reason, a large number of reported immunoassays have focused on the analysis of natural water samples.

Wittmann and Hock²³⁸ measured atrazine in drinking and groundwater samples, reaching detection limits close to 1 ng L^{-1} without using any preconcentration or cleanup step. The presence of atrazine has also been analyzed in estuarine and seawater samples using other immunological techniques like magneto ELISA and FIHA with very low detection limits—close to 50 ng L^{-1} .²³⁹ Several electrochemical immunosensors have been described for atrazine detection in food and aquatic matrices, like the one presented by Zacco et al.,²⁴⁰ who developed an amperometric immunosensor based on modified magnetic particles with antibodies that are captured by a graphite-epoxy magneto composite, also used as the transducer for the electrical immunosensing; the LOD for drinking water samples was 6 ng L^{-1} . Figure 8.5 shows a schematic representation of the biosensor.

Several authors^{185,237,241} developed an impedimetric immunosensor based on interdigitated electrodes without the use of any label; this system achieved detection limits of 0.04 and $0.19 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ in buffer and wine samples, respectively. Following up the same idea, but exploring a conductometric transduction system, Valera et al.²⁴² produced an immunosensor using antibodies labeled with gold nanoparticles; the LOD in buffer was $0.1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. Both systems should be easily adaptable for the analysis of environmental samples. Recently, Farré et al.²⁴³ developed another immunosensor based on the SPR principle to analyze atrazine in well, river, and drinking water; detection limits were *ca.* 26 ng L^{-1} in all cases. A micro-immune-supported liquid membrane assay (μ -ISLMA) based on chemiluminescent detection has been developed to detect simazine in a single miniaturized cartridge system.²⁴⁴ This chapter also discusses the influence of using different SAMs and different kinds of antibodies (polyclonal, affinity purified polyclonal, and monoclonal) on extraction parameters and assay sensitivity. LODs obtained for mineral water samples were at the ng L^{-1} level. Tschmelak et al.^{163,245} applied the RIANA biosensor to detect propanil, a selective postemergent herbicide, in water samples without any pretreatment ($\text{LOD} = 0.6 \text{ ng L}^{-1}$).

Chlorophenoxy acid herbicides are also widely used to control broadleaf weeds and grass plants. Several immunoassays have been reported for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T).^{246,247} Several immunosensors have been described using a transducing principle similar to the RIANA system already described in this chapter. Thus, Meusel et al.²⁴⁸ reported the use of monoclonal antibodies in a sensor chip to analyze river and lake water samples, obtaining detection limits of $0.1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. Moreover, monoclonal antibodies, produced by Cuong et al.,²⁴⁹ were used in a dipstick immunoassay format to analyze pond water samples. When applied to the 2,4-D compound, this semiquantitative method yielded for an IC_{50} of $6 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ and an LOD of $0.5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$.

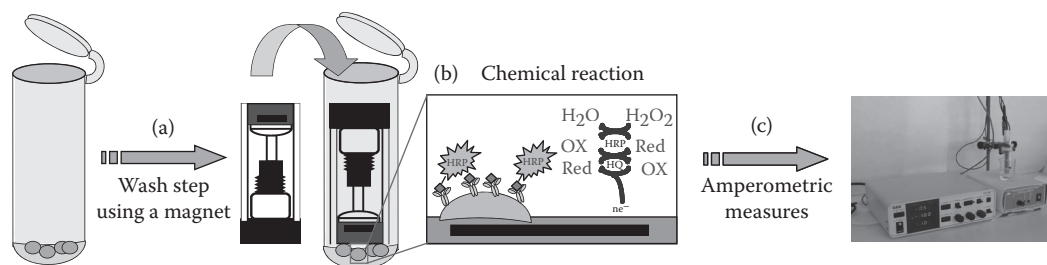


FIGURE 8.5 Schematic representation of an electrochemical magneto immunosensing strategy for the detection of low-molecular-weight compounds. After the immunoreaction, the antibody-modified magnetic beads are captured by the m-GEC electrode. Chemical reactions occurring at the m-GEC surface polarized at -0.150 V (versus Ag/AgCl) upon the addition of H_2O_2 in the presence of mediator (hydroquinone) are recorded. (From Zacco, E. et al. 2006. *Anal. Chem.* 78: 1780–1788.)

Immunochemical methods have also been reported for the analysis of phenylurea herbicides in different matrices, including food and environmental samples.^{250–254} Thus, recombinant antibodies have been applied to the analysis of the phenylurea herbicide diuron with very good detectability ($IC_{50} = 2$ and $12 \mu\text{g L}^{-1}$ in the indirect and direct ELISA formats, respectively).²⁵¹ Similarly, isoproturon has been analyzed in soil extracts using an ELISA.²⁵⁴ An ultrasensitive time-resolved fluorescence immunoassay (TR-FIA) for diuron in water samples has been recently reported. This assay was performed using the diuron-specific polyclonal antibody raised in sheep; rabbit antisheep IgG was used as fluorescent marker, conjugated with a chelating molecule complexed with Eu^{3+} . Even though the sensitivity of the lanthanide chelate was up to 10 times better than in other techniques, this level was 20 ng L^{-1} below the European Community limits. Water samples collected monthly from an agricultural area showed that peak diuron concentrations were 65 pg mL^{-1} in ditch water samples in June and 180 pg mL^{-1} in lake water samples in September.²²⁰ On the subject of immunosensors, it is worth mentioning the work by Mallat et al.,²⁵⁵ who again applied the RIANA system to monitor isoproturon, diuron, and linuron in Ebro delta waters (Tarragona, Spain) ($\text{LOD} = 0.01 \mu\text{g L}^{-1}$). A flow-through fluoroimmunosensor has also been developed for isoproturon in well water with a detectability in the $\mu\text{g L}^{-1}$ range.²⁵⁶ The use of antibodies in SPE methods against phenylurea herbicides has been investigated by immobilizing the antibodies on different solid supports^{257–259} or encapsulating them in sol-gel matrices.²⁶⁰ These immunosorbents have been applied as both a cleanup and a preconcentration step of these herbicides from ground,²⁵² drinking,²⁵⁹ and surface^{258,259} water samples, using on- and off-line procedures. Thus, with the immunosorbent conveniently packed in a C18 column coupled to a liquid chromatography (LC) system, about 10 phenylureas were monitored from the Seine River.²⁵⁹ The class-selectivity profile demonstrated by these immunosorbents makes them useful for multiresidue analysis procedures of this particular family of herbicides.

Several immunoanalytical techniques have been developed for the analysis of chloroacetanilides, another important family of herbicides, such as alachlor,^{261,262} metolachlor,^{263–265} and their metabolites²⁶⁶ in various matrices. Immunoassays for detecting butachlor and acetochlor have received less attention than the above-mentioned analogs, although some immunochemical developments have also been reported.^{267–269} An electrochemical immunosensor²⁷⁰ and a fluororimmunoassay²⁷¹ have also been described for acetochlor. Interesting are the interlaboratory collaborative field experiments²⁶⁴ carried out to compare solid-phase extraction-gas chromatography (SPE-GC), solid-phase microextraction-gas chromatography (SPME-GC), and ELISA tests for the analysis of metolachlor. Runoff water samples were collected during the first rain event following herbicide application and analyzed using different methods. Larger metolachlor concentrations were found in surface runoff ($1.4\text{--}54.9 \mu\text{g L}^{-1}$) than in tile drainage ($0.01\text{--}8.5 \mu\text{g L}^{-1}$). The results demonstrated that although ELISA overestimated the concentration of this chloroacetanilide herbicide, correlation with the chromatographic methods was very good. An amperometric immunosensor for acetochlor detection²⁷⁰ based on screen-printed electrodes has been reported, although the detectability achieved was not sufficient for the direct analysis of drinking water. The LOD described were around 25 and $60 \mu\text{g L}^{-1}$ for drinking and surface water, respectively.

Several ELISAs have been developed for the analysis of sulfonylurea herbicides like chlorsulfuron,²⁷² triasulfuron,²⁷³ and metsulfuron methyl.²⁷⁴ Schlaeppli et al.,²⁷³ for example, developed an immunoassay using monoclonal antibodies for the analysis of fortified soil samples. The sensitivity of the assay, after an optimized extraction procedure, was 0.1 pg kg^{-1} . Eremin et al.¹⁹⁵ developed a FPIA for chlorsulfuron detection in MilliQ water samples; the LOD obtained in $50 \mu\text{L}$ of sample was $10 \mu\text{g L}^{-1}$. Another example of a fluoroimmunoassay was the one developed by Wang et al.²⁷⁵ consisting of a time-resolved fluoroimmunoassay (TR-FIA) method for bensulfuron-methyl based on fluorescence resonance energy transfer (FRET) from a Tb^{3+} fluorescent chelate to an organic dye, Cy3 or Cy3.5; this method achieved a detection limit of $2.1 \mu\text{g L}^{-1}$. The same author²⁷⁶ developed a new immunoassay method by using graphite furnace atomic absorption spectrometry with an EDTA- Cd^{2+} chelate as the label; bensulfuron-methyl was analyzed using this technique ($\text{LOD} = 0.95 \mu\text{g L}^{-1}$). Dzantiev et al.²⁷⁷ developed an electrochemical immunosensor for analyzing chlorsulfuron herbicide

in just 15 min. The working range for the quantitative detection of chlorsulfuron was from 0.01 to 1 $\mu\text{g L}^{-1}$. Finally, Szekacs et al.²⁷⁸ developed a highly sensitive immunosensor using optical waveguide lightmode spectroscopy (OWLS) to detect trifluralin, a selective pre-emergence herbicide, with an IC_{50} of 1.0 $\mu\text{g L}^{-1}$. The principle is based on the precise measurement of the resonance angle of polarized laser light, diffracted by grating and coupled onto a thin waveguide.

8.4 IMMUNOCHEMICAL DETERMINATIONS OF PHARMACEUTICAL AND PERSONAL CARE PRODUCTS

The term “pharmaceutical and personal care products (PPCPs)” refers to any product used for personal health or cosmetic reasons or used in agriculture to enhance the growth or health of livestock;²⁷⁹ it comprises a diverse collection of thousands of chemical substances.⁴⁰ The overall pharmaceutical production in Europe, Japan, and the United States amounted to USD373 billion in 2005.²⁸⁰ PPCPs have probably been present in the environment and water for as long as humans have been using them. While an important number of these substances enter the environment directly from industry, treated and untreated domestic sewage containing excreted PPCPs and their metabolites following human use is a major source of these compounds in the environment.³⁹ Nowadays, sewage systems and municipal WWTPs are still not equipped for the complete removal of PPCPs or other unregulated contaminants.²⁸¹ In addition to the framework provided by the Water Directive mentioned in the introduction, Directive 2001/82/EC regulates the requirements for the ecotoxicity testing of pharmaceuticals. With the advances in technologies that have improved the ability to detect, control, and quantify these chemicals, we can now begin to identify what effects, if any, these chemicals have on human and environmental health.

8.4.1 ANTIBIOTICS

Antibiotics are chemical substances extremely active at low doses that kill or slow the growth of bacteria. Since their discovery, antimicrobials have been an essential part of modern human and veterinary medicine as well as in aquaculture or even in plants for the treatment of infectious diseases produced by bacteria. In the last decade, the general misuse of antibiotics as growth promoters or for prophylactic purposes²⁸² has become a decisive factor favoring the increase of bacterial resistance. This risk situation may spread from animals to humans through the food chain⁸ but may also have a crucial impact on the ecosystem itself by producing adverse effects in animals and plants. At present, WWTP effluents and confined animal feeding operations (AFOs) represent the prime sources of antibiotics entering the environment;^{281,283} the greatest percentage of antibiotics are excreted after consumption, and thousands of tonnes of them reach the terrestrial and aquatic environment every year.¹ Governmental agencies have therefore set limitations on the levels of residues in accordance with available toxicological data by laying down specific regulations or proposals that are to complement the restrictions already in place with respect to animal foods destined for human consumption. Antibiotics are classified into several families, for example, penicillins, fluoroquinolones (FQs), sulfonamides (SAs), tetracyclines (TCs), macrolides, and chloramphenicols (CAPs). In general, all these compounds are quite resistant to biodegradation since they were designed to demonstrate a certain metabolic stability during their pharmacological action; they are likely to remain in the environment in unchanged form or as persistently active metabolites.²⁸⁴ In this context, different techniques based on wholly divergent principles have been developed to deal with the problems relating to antibiotic residues.^{286,287} Most of them, like growth inhibition tests, take advantage of their antibacterial activity. Others, such as chromatographic methods, are highly specific and sensitive but require extensive sample preparation, sophisticated and therefore expensive equipment, and skilled laboratory staff. On the other hand, immunochemical techniques can be excellent tools for assessing antibiotic contamination in different environmental matrices as a result of their excellent detectability, specificity, and throughput capacities.^{44,287} Table 8.9 summarizes some of these techniques reported for the detection of several families of antibiotics.

TABLE 8.9
Immunochemical Techniques Developed for the Detection of Antibiotics

Target Analyte	Technique	Matrix	Sensitivity		Reference
			LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	IC ₅₀ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
Antibiotics					
Sulfonamides	ELISA	Fish muscle	<100 ^a		303
	Charm II RIA test	Drinking water sources	0.05		310
	RIANA	Water samples	0.01	100	311
Sulfamethazine	RIA	Lagoon and river samples	5.00		309
	SPIE with MALDI-TOF MS	Drinking water	0.10		313
		Soil	1.00		
		Manure	1.00		
Sulfamethizole	AWACSS	River water samples	0.02		312
Fluoroquinolones	ELISA	Shrimp tissues	~4.00		323
	ELISA	Fish and shrimp sample	0.70 ^b	<10 ^c	322
Ciprofloxacin	ELISA	Milk, chicken, and pork		0.32 ^a	324
Enrofloxacin	RIA	Lagoon and river samples	5.00		309
Tetracyclines	Charm II RIA test	Hog lagoon	1.00	1–20 ^d	348
		Surface water			
		Groundwater			
Tetracycline	Charm II RIA test	Drinking water sources	0.05		310
	ELISA ^e (IDS Corporation)	Surface and groundwater	0.20		345
	ELISA ^e (Ridascreen)		0.10		
Tetracycline	ELISA ^e (R-Biopharm	Manure samples from	0.38 ^a	1.02 ^a	346
Anhydrotetracycline	GmH)	hog lagoons and cattle	0.25 ^a	5.40 ^a	
Chlortetracycline		feedlots	0.01 ^a	0.21 ^a	
Anhydrochlor-TC			0.01 ^a	6.92 ^a	
Oxytetracycline			0.05 ^a	0.97 ^a	
Chloramphenicol	ELISA ^e	Shrimp tissue	0.10	0.22 ^c	334
	(5091CAP1p, EDiagnostica)		0.13 ^b		
	SPR Biosensor (Biacore Q)	Prawn samples	1.00 ^a	0.07 ^d	336
	Membrane-based CL sensor	Shrimp samples	0.04 ^b		339
Chloramphenicol CAP succinate	TR-FIA	Shrimp samples	0.05		423
			0.10		
Thiamphenicol	SPR Biosensor	Shrimp tissue	0.5 ^b	0.13 ^a	337
Florefenicol	(Biacore Q, sensor chip		0.2 ^b	0.47 ^a	
Florefenicol amine	CM5)		250 ^b	887 ^a	
Chloramphenicol			0.1 ^b	1.26 ^a	
Chloramphenicol CAP glucuronide	SPR Biosensor	Prawn	0.04 ^b	0.07 ^c	338
	(Biacore Q and Qflex [®] Kit)			76% CR	
Pencillin G	RIA	Lagoon and river samples	1.00		309
Pencillin G	Fluoro immunoassay	Wastewater	2.40	30.0	354
Amoxicillin		Sewage water	~5.00	58.0	
Tylosin	ELISA (IDS Corporation)	Surface and groundwater	0.20		345
	ELISA (Ridascreen)		0.10		
Erythromycin	RIA	Lagoon and river samples	10.0		309

^a LODs and IC₅₀ calculated in buffer solution.^b General decision limit.^c Detection capacity.^d Linear range.^e Commercial kit.

A significant number of immunochemical methods for antibiotic residue analysis with narrow or broad specificity, or even possessing multianalyte capabilities, have been described, and some of them are commercially available.^{39,40,287,288} We recently reported a microplate-based ELISA method that can detect 25 antibiotics from the β -lactam (BL), SA, and FQ families.²² Moreover, the assay based on a dipstick platform is becoming the new simple, rapid and easy-to-use sensing device for on-site measurements. The biological recognition elements normally used in this user-friendly technology are the receptors;^{289–292} applications using antibodies have appeared in recent years²⁵⁴ but have so far been implemented only in the analysis of food samples, not yet in environmental samples.

8.4.1.1 Sulfonamides

SAs are an important group of broad-spectrum synthetic bacteriostatic antibiotics, whose chemical structure contains a 4-aminobenzensulfonamide functional group with different heterocycles attached to the N1-position of the SA bridge. This antibiotic family is widely used in animal husbandry in most European countries.²⁹⁴ The pharmacokinetic profile of SAs ensures that they are quickly eliminated from the organism (40–90%), usually as the parent compound or as bioactive metabolites.²⁹⁵ As with many other pharmaceuticals, SAs are fairly water-soluble, polar compounds that ionize depending on the pH of the matrix. In addition to hydrophobic partitioning, these compounds can adsorb to soils via cation exchange, cation bridging, surface complexes, and hydrogen bonding.²⁹⁶ Hence, SAs will persist in the environment and, because of their relatively high mobility, will enter groundwater and be transported to aquifers and surface waters;²⁸⁴ relevant methodologies for monitoring environmental samples are therefore necessary. Besides the large number of chromatographic methods reported,^{294,297–300} several immunochemical techniques have been developed for the analysis of water samples. Several ELISAs with broad^{301–304} or narrower selectivity profiles^{305–308} within the SA family have been applied to the analysis of these residues in various food matrices in compliance with legislation. Campagnolo et al.³⁰⁹ studied the presence of different antimicrobials in wastewater samples from pig and poultry farms using a commercial radioimmunoassay (Charm II RIA). Prior to the analysis, samples were simply filtered through a 0.45 μm glass fiber filter; an LOD of 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ was obtained for sulfamethazine. In order to achieve lower detection limits, Yang and Carlson³¹⁰ coupled SPE cartridges to the same RIA test as a preconcentration technique. This method was optimized to detect SA and TC (see below) compounds in water samples from rivers and the influent/effluent of a WWTP. The detection limit for sulfamethazine was 0.05 $\mu\text{g L}^{-1}$ using the SPE/RIA method; quantification of sulfamethoxazole, sulfadimethoxazole, and sulfathiazole was also possible. Initially developed for biochemical studies, RIA has the disadvantage of handling and producing radioactive residues, so their use should be avoided whenever possible. On the other hand, the already-mentioned RIANA immunosensor was used to detect SAs in drinking, ground, and surface water samples.³¹¹ With this biosensor and a mixture of antibodies, it was possible to achieve detection limits $<10 \text{ ng L}^{-1}$, limits of quantification (LOQ) $<100 \text{ ng L}^{-1}$, and IC_{50} values between 0.5 and 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ for five SAs without sample pretreatment. The automated water analyser computer supported system (AWACSS) instrument represents a development of the RIANA sensor in that the multianalyte analysis capability has been expanded, theoretically permitting simultaneous measurements of up to 30 analytes from the groups of modern pesticides, endocrine disrupting compounds, and pharmaceuticals. With this system, Tschmelak et al.^{184,312} achieved an LOD of $<0.02 \mu\text{g L}^{-1}$ for sulfamethoxazole in river water samples. On the other hand, Grant et al.³¹³ described a method for detecting residues of sulfamethazine and its major metabolite N_4 -acetylsulfamethazine in water, aqueous suspensions of soil, and composted manure samples, using solid-phase immunoextraction (SPIE) coupled with MALDI-TOF MS. The LODs for both compounds in all kinds of samples were $<1 \mu\text{g L}^{-1}$. No further immunochemical methods for the direct detection of SAs in environmental samples were found; nonetheless, the application to environmental water samples of those currently applied in complex biological matrices^{305,314–316} is predicted to be straightforward. Several novel immunosensing strategies for detecting SAs have been developed by our group. Zacco et al.³¹⁷ immobilized class-specific anti-SA antibodies to magnetic

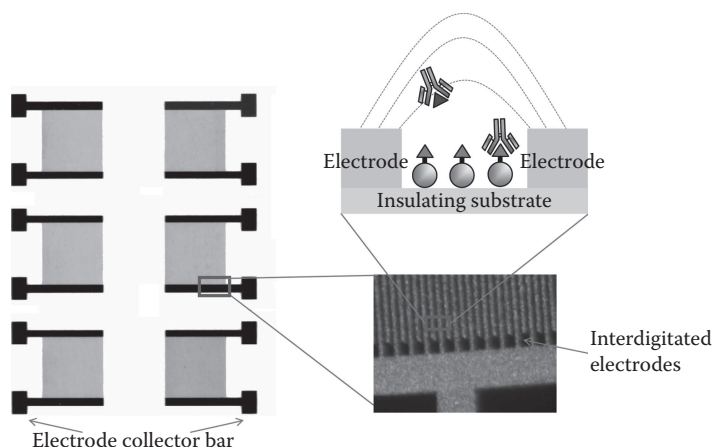


FIGURE 8.6 Schematic representation of a new transducer for biosensor application based on a three-dimensional IDEA. Binding of molecules to the chemically modified and biofunctionalized transducer surface induces important conductivity changes between the electrodes, which can be monitored. (From Ramón-Azcón, J. et al. 2008. *Biosens. Bioelectron.* 23: 1367–1373.)

particles to be captured, after the immunochemical reaction, by a magneto sensor made of graphite-epoxy composite (m-GEC) that is also used as the transducer for the electrochemical detection. The LOD obtained for sulfapyridine in milk was $1.4 \mu\text{g L}^{-1}$. Another example, using the same immunoreagents, is presented by Ramón-Azcón et al.:³¹⁸ a new transducer for biosensor applications based on a three-dimensional interdigitated electrode array (IDEA) with electrode digits, separated by an insulating barrier. The binding of molecules to the chemically modified surface of the transducer induces important changes in conductivity between the electrodes; impedance measurements with this immunosensor detected sulfapyridine with an IC_{50} of $5.6 \mu\text{g L}^{-1}$ in buffer. As can be seen in Figure 8.6, using this strategy, it was possible to place the immunoreaction where most of the electric field is, instead of using just a small percentage.

Finally, class-selective immunoreagents for SA detection were implemented in a waveguide interrogated optical system (WIOS). The label-free sensor, developed by the Swiss Center for Electronics and Microtechnology (CSEM), is based on the evanescent wave principle, where changes in the refractive index of the modified chip surface are detected by scanning the resonance condition at which a light wave is coupled in the waveguide through a conveniently designed grating.³¹⁹ Monitoring of the resonance wavelength allows real-time monitoring of the binding of nonlabeled molecules to the waveguide grating surface, previously modified with the immunoreagents by means of a photopolymerizable dextran layer. The LOD obtained with this methodology for sulfapyridine in milk was $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$.

8.4.1.2 Fluoroquinolones

FQs are a synthetic class of antibiotics widely used for both prevention and treatment of various diseases in animal husbandry and aquaculture, as well as in humans. The environmental concern regarding FQs is evinced not only by their potential to promote antibiotic resistance, but also by their unfavorable ecotoxicity profile.³²⁰ FQs are excreted as parent compounds, as conjugates, or as oxidation, hydroxylation, dealkylation, or decarboxylation products. FQs bind strongly to topsoils, thereby reducing the threat of surface water and groundwater contamination; this implies, however, that the terrestrial environment is a further relevant exposure pathway.⁴⁰ The strong binding of FQs to soils and sediments delays their biodegradation and explains their persistence in the environment. Wastewater treatment eliminates 79–87% of FQs before their arrival in rivers; adverse effects on the

aquatic habitats of surface waters are thus rather unlikely. On the other hand, these compounds are also susceptible to photodegradation in water: this involves the oxidation, dealkylation, and cleavage of the piperazine ring.³²¹ Fluoroquinolone residues in marine products are an important analytical target because they are regarded as good indicators of environmental quality. In this context, Huet et al.³²² reported the development of an ELISA for the detection of 15 fluoroquinolones in fish and shrimps, as well as in other samples (kidney, eggs, and muscle). The pretreatment required for the analysis of the marine products involved sample centrifugation and solvent extraction prior to 10-fold dilution. The assay was characterized in accordance with the recommendations of the European Commission (Commission Decision 2002/657/EC) by calculating the general decision limit ($CC\alpha$) and detection capacity ($CC\beta$). $CC\alpha$ was calculated to be $0.70 \mu\text{g L}^{-1}$, whereas $CC\beta$ for most of these compounds was $<10 \mu\text{g L}^{-1}$, except in the case of sarafloxacin, oxolinic acid, flumequine, and cinoxacin, the detection capacities of which did not exceed 4, 25, 100, and $200 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively. An ELISA using monoclonal antibodies with a broad specificity for fluoroquinolone antibiotics (12 FQ congeners) was described by Wang et al.³²³ for chicken, honey, egg, and shrimp samples: IC_{50} in buffer varied from $2.1 \mu\text{g L}^{-1}$ (norfloxacin) to $4.4 \mu\text{g L}^{-1}$ (lomefloxacin). Shrimp samples were fortified at different levels (50, 100, and $200 \mu\text{g L}^{-1}$), separately with fluoroquinolones such as enrofloxacin, ciprofloxacin, norfloxacin, ofloxacin, flumequine, and danofloxacin; recoveries were between 63% and 90%. The last example found of an immunoassay applied to the analysis of fluoroquinolones in environmental samples is the already-mentioned immunosensor developed by Campagnolo et al.;³⁰⁹ these authors achieved an LOD for enrofloxacin of $5.0 \mu\text{g L}^{-1}$. Other immunoassays performed to detect FQs in complex biological samples^{322,324–326} should a priori be easily adaptable for monitoring these substances in environmental water samples. The polyclonal antibodies developed and evaluated by Pinacho et al.³²⁷ have been implemented in different immunochemical techniques to analyze a wide range of fluoroquinolone congeners. The same authors developed an ELISA capable of analyzing milk samples after a very simple dilution step, obtaining detection limits for most important fluoroquinolones of $<0.4 \mu\text{g L}^{-1}$.³²⁸ Other uses of these immunoreagents have focused on electrochemical devices.^{329,330} One example is an amperometric immunosensor that follows the same format as the one described in the sulfonamide section;³¹⁷ with this instrument LODs of 5.3 ng L^{-1} for ciprofloxacin in whole milk were obtained.³³¹ Impedance spectroscopy combined with immunosensor technology has been used to detect ciprofloxacin at 10 ng L^{-1} levels in buffer.³³² In this approach, the sensor electrode was based on the immobilization of the antibodies by chemical binding onto a poly(pyrrole-NHS) film electrogenerated on a solid gold substrate. The final immunoreaction triggers a signal via impedance spectroscopy measurements. Again, the application of these new analytical approaches to environmental samples should be straightforward.

8.4.1.3 Amphenicols

CAP, a bacteriostatic antimicrobial originally derived from the bacterium *Streptomyces Venezuelae*, was the first antibiotic to be manufactured synthetically on a large scale. Although CAP is effective against a wide variety of microorganisms, its use has been banned in the EU since 1994 because of certain toxicological side effect problems such as aplastic anemia, brown marrow suppression, or the so-called gray baby syndrome.³⁹ For this reason, a zero tolerance was established for the presence of these residues in any kind of animal products. On the other hand, this antibiotic has been widely used in the last 10 years by many low-income Asian countries for aquaculture disease treatment, because of its exceedingly low price. Although the use of this antibiotic in animal production has recently been prohibited in these countries too, CAP residues have been detected in marine products intended for the EU market.³³³ According to several European Commission Decisions (2001/699/EC, 2001/705/EC, 2002/249/EC, 2002/250/EC, and 2002/251/EC), certain fishery and aquaculture products imported for human consumption must be subjected to a test in order to ensure the absence of CAP residues.³³⁴ Thus, the main efforts have focused on the study of CAP residues in marine food products to control the problems mentioned above. Impens et al.³³⁴ described the use

of a commercial ELISA kit (5091CAP1p) to detect CAP in shrimp tissue after organic/aqueous extraction, obtaining an LOD of $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$. The method was revalidated according to Commission Decision 2002/657/EC,³³⁵ which has been more commonly used for chromatographic techniques; $\text{CC}\alpha$ and $\text{CC}\beta$ values of 0.13 and $0.22 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively, were obtained. On the other hand, a commercial SPR immunosensor (Biacore Q) has been used by several authors to detect CAP residues in different kinds of matrices.^{336–338} For example, Ferguson et al.³³⁸ reported the implementation of a commercial detection kit (Qflex) in the cited biosensor to accurately determine CAP residues in milk, poultry muscle, honey, and prawn. $\text{CC}\alpha$ and $\text{CC}\beta$ values for prawn samples, after a tedious pretreatment, were 0.04 and $0.07 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively, while the glucuronide form of CAP cross-reacted 76% in this matrix. Using the same biosensor, Ashwin et al.³³⁶ obtained similar parameters for CAP detection in prawn samples but with a simpler sample pretreatment procedure. Furthermore, the immunoreagents developed by Dumont et al.³³⁷ were implemented in the same SPR sensor as described above for the simultaneous residue detection of several fenicol antibiotic congeners in shrimps from a single sample extract. The IC_{50} values obtained for thiamphenicol (TAP), florefenicol (FF), and CAP were 0.13 , 0.47 , and $1.26 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively. $\text{CC}\beta$ values were also estimated for each compound in this study (TAP: 0.13 , FF: 0.47 , and CAP: $1.26 \mu\text{g L}^{-1}$). In a different context, Park and Kim described the development of a membrane-based chemiluminescent immunosensor for the analysis of very low levels of CAP residues in different samples of animal food for human consumption, such as pork, beef, chicken, milk, and shrimps.³³⁹ The shrimp samples were simply filtered through Whatman paper to avoid undesirable matrix effects (LOD = ca. $3 \mu\text{g L}^{-1}$). Alternatively, a large number of immunoassay screening methods for CAP detection in foods (e.g., milk, eggs, and meat) and other related complex matrices have been reported in the literature.^{339–341} Despite the use of immunochemical methods to analyze residues in marine biota, we have not found examples of their application to analyze CAP residues in environmental samples, although these methodologies should be readily adaptable to the analysis of these types of matrices.

8.4.1.4 Tetracyclines

TCs are an important group of broad-spectrum antibiotics used against *Gram*-negative and *Gram*-positive microorganisms in modern human and veterinary medicine practice for both prevention and treatment of diseases, as well as additives in animal foodstuffs to promote growth in concentrated animal feeding operations (CAFOs). As with most types of antibiotics, only small portions of the tetracyclines administered are actually metabolized or absorbed in the body, and most of the drug is eliminated in feces and urine in unchanged form.³⁴² Normally, tetracyclines are not found at high levels in the environment: because of their chelation properties, they readily precipitate in the presence of divalent cations (i.e., Ca^{2+} , Mg^{2+} , or Zn^{2+}) and are accumulated in sewage sludge or sediments.³⁴³ On the other hand, tetracycline residues have also been detected in many surface water resources that receive discharges from municipal WWTPs and agricultural runoff.^{2,344} Besides the demonstrated persistence of TCs in agricultural soils that have received manure containing antibiotics, the biodegradation of these compounds to even more toxic substances must activate new strategies to improve their control and the efficiency of their removal in wastewater plants. To this end, a commercially available ELISA kit (RIDASCREEN®), commonly used for detecting tetracycline residues in meat and milk samples, was easily adapted for the ultratrace analysis of surface and groundwaters.³⁴⁵ The assay was found to be highly sensitive to tetracycline and chlortetracycline with detection limits of $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ in lake waters, runoff samples, and soil saturation extracts. Furthermore, Aga et al.³⁴⁶ evaluated another commercial ELISA kit (R-Biopharm GmbH) for investigating the occurrence and fate of tetracyclines in the environment. In this case, the potential use of class generic antibodies led to the multiple recognition of several TCs such as tetracycline, chlortetracycline, and oxytetracycline, and also their epimers and corresponding dehydration by-products with IC_{50} values from 0.2 to $6.9 \mu\text{g L}^{-1}$. Subsequently, the same immunochemical detection kit was evaluated by measuring the presence of tetracyclines in samples from different manured

soil surface layers (0–5 cm).³⁴⁷ Only trace amounts ($<1 \mu\text{g L}^{-1}$) of oxytetracycline were recorded in these samples and none was detected in water samples from field lysimeters; tetracyclines thus have a low mobility in soil, as suggested before.³⁴² The Charm II RIA method was applied to environmental samples but with the focus on tetracycline detection.³⁴⁸ This Charm II RIA, previously developed as a screening tool for detecting tetracycline residues in serum, urine, milk, and tissues, was adapted for the analysis of water samples by Meyer et al.³⁴⁸ who achieved an LOD of $1 \mu\text{g L}^{-1}$ and a semiquantitative analytical range of $1\text{--}20 \mu\text{g L}^{-1}$. In this study, liquid waste samples were obtained from several hog lagoons, and the surface and groundwater samples were from areas given over to intensive poultry production; the analytical results were well correlated with those acquired by means of liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) techniques. The same RIA technique, again applied by Campagnolo et al.³⁰⁹ to different aqueous environmental samples, was able to detect chlortetracycline at sensitivity levels of $1 \mu\text{g L}^{-1}$. Yang and Carlson³¹⁰ used SPE as a pre-concentration technique in conjunction with Charm II RIA to obtain lower detection limits for tetracycline measurements in water matrices. In this case, detection limits of $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$ for tetracycline, oxytetracycline, and chlortetracycline were obtained in the analysis of different wastewater samples. Other immunochemical methods developed to analyze manifold tetracycline residues, mainly in honey, milk, and animal tissues intended for human consumption,³⁴⁹ could be adapted to analyze water samples.

8.4.1.5 β -Lactams

The BL group is one of the most important families of antibiotics used in veterinary medicine for the treatment of septicemia, urinary infections, and pulmonary infections. The presence of penicillin residues in food of animal origin, such as milk or meat, can have the same drawbacks as other antibiotics: unfavorable microbiological effects in the dairy industry, possible hypersensitivity reactions in consumers, and antibiotic resistance.³⁵⁰ On the other hand, their persistence in environmental samples should be very low, mainly because of the chemically unstable BL ring, which is highly sensitive to pH, heat, and β -lactamase enzymes.³⁵¹ Some authors therefore point out the absence of this kind of antibiotic residue in water samples, but aim to detect their degradation products in order to evaluate possible future environmental risks. Several immunochemical techniques, based on different detection principles, have thus been developed to detect BL compounds in food samples of animal origin.^{309,352–354} Many of these technologies are applied to the analysis of milk samples, because this antibiotic family is the most frequently used for the treatment of mastitis in dairy cows. Gaudin et al.³⁵² applied the Biacore SPR sensor, described previously for chloramphenicol detection, to detect ampicillin in milk samples using commercial monoclonal antibodies. Samples were pretreated to facilitate the opening of the BL ring; final detection limits of 5.9 and $12.5 \mu\text{g L}^{-1}$ for ampicillin in buffer and in milk, respectively, were obtained. This immunoassay revealed high cross-reaction values for other BL antibiotics such as penicillin G and M. The same biosensor was also used by Gustavsson et al.³⁵³ to assay the activity of a carboxypeptidase and antibodies against the enzymatic product generated in milk samples. Detection limits for penicillin G were *ca.* $1 \mu\text{g L}^{-1}$, and seven BL compounds were detected below their MRLs. It can be assumed that, as in the case of the antibiotic analyses mentioned earlier, application of immunoassays originally developed for other biological samples to environmental water samples should produce even fewer matrix effects. Benito-Pena et al.³⁵⁴ prepared polyclonal antibodies to develop an automated flow-through fluoroimmunosensor for the analysis of penicillin antibiotics in wastewater samples from influent and effluent sewage water; LOD and IC_{50} values for penicillin G and amoxicillin in buffer were 2.4 , 5.0 , and 30 , $58 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively. This immunosensor was applied to the analysis of both compounds in wastewater samples passed through $0.45 \mu\text{m}$ glass fiber filters; the technique was validated by chromatography. Moreover, as in the case of SAs, fluoroquinolone, tetracycline, and chloramphenicol compounds, Campagnolo et al.³⁰⁹ measured BLs in water samples taken from the vicinity of a farm; they obtained a detection limit of $2 \mu\text{g L}^{-1}$ for penicillin G.

8.4.1.6 Macrolides

Macrolide antibiotics, such as tylosin, roxithromycin, and erythromycin, are an important group of pharmaceuticals used in human and veterinary medical practice. Their activity stems from the presence of a large macrocyclic lactone ring containing 14, 15, or 16 atoms, with deoxy sugars, usually cladinose and desosamine, linked via glycosidic bonds. After application, a certain fraction of these macrolides is metabolized to inactive compounds, but a significant amount is excreted as active metabolites.³⁵⁵ Most macrolide structures enter the environment via animal manure, which limits their mobility and bioactivity. In any case, control of these residuals in the environment is necessary so as to avoid future negative impacts on public health. Kumar et al.³⁴⁵ reported on the detection of tylosin, used extensively in pig production for both growth promotion and therapeutic purposes, using two commercial ELISAs for surface and groundwater samples. Samples were diluted twice in buffer prior to their analysis; an LOD of $0.2 \mu\text{g L}^{-1}$ was obtained. Several antibiotic growth promoters, including tylosin, were analyzed in ground feed samples using a multianalyte ELISA after a cleanup step on OASIS cartridges by Situ et al.³⁵⁶ Polyclonal antibodies were developed for this purpose. With this method, LOD and CCB values for five banned substances in animal feeds were respectively 0.28 and 0.30 mg kg^{-1} for bacitracin, 1.02 and 1.50 mg kg^{-1} for olaquinox, 0.21 and 0.60 mg kg^{-1} for spiramycin/tylosin, and 0.09 and 0.20 mg kg^{-1} for virginiamycin. Campagnolo et al.³⁰⁹ measured erythromycin macrolides along with five other antibiotics, achieving RIA detection limits of around $10 \mu\text{g L}^{-1}$.

8.4.1.7 Other Drugs

This section deals with immunochemical methods developed to determine drugs that do not belong to any of the most common antibiotic family groups described above, but because of their importance and general use require to be considered, too. Table 8.10 shows a few examples of ELISAs for the analysis of these compounds in environmental samples.

A highly sensitive and specific ELISA for the determination, in different types of water samples, of diclofenac, a commonly used nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID), has been developed by Deng et al.³⁵⁷ This analyte belongs to the most frequently detected, pharmaceutically active compounds in the water cycle. The immunoassay was able to measure tap water samples directly—respective LOD and IC_{50} values were 6 and 60 ng L^{-1} . On the other hand, surface water samples required fivefold dilution and the wastewater samples 10-fold dilution in buffer to be analyzed correctly; the LODs were then 20 and 60 ng L^{-1} , respectively. Recently, the development and validation of a highly sensitive and specific ELISA for the detection of pharmaceutical indomethacin in

TABLE 8.10
Immunochemical Techniques Developed for the Detection of Other Drugs

Target Analyte	Technique	Matrix	Sensitivity		Reference
			LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	IC_{50} ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
Other Drugs					
Diclofenac	ELISA	Tap water	6×10^{-3}	60×10^{-3}	357
		Surface water	19×10^{-3}		
		Wastewater	60×10^{-3}		
Indomethacin (acemetacin 92% CR)	ELISA	Tap water	0.01	<0.25	358
		Drinking water	0.01	<0.25	
		Surface water	0.01	<0.25	
		Wastewater	0.10	<2.50	
Nitrofurantoin	ELISA	Animal fed water	0.20	3.20	359

water samples from different sites in the Chengdu area was presented by Huo et al.³⁵⁸ This commonly used compound is also included in the NSAID group. Although indomethacin is considered stable in the environment, its long-term presence in aquatic systems may increase chronic toxicity and more insidious effects, like endocrine disruption, growth inhibition, and cytotoxicity, in aquatic animals. The study measured tap water and drinking water samples directly (LOD = 0.01 $\mu\text{g L}^{-1}$); the same LOD was obtained for surface water samples after these had been filtered through a 0.45 μm nylon cartridge. Wastewater samples required a 10-fold dilution step prior to analysis with the immunoassay (LOD = 0.1 $\mu\text{g L}^{-1}$). In all cases, around 90% of acetaminophen cross-reacted. Liu et al.³⁵⁹ prepared polyclonal antibodies for the immunochemical detection of nitrofurantoin residues in water samples. Nitrofurans are a group of synthetic broad-spectrum antibiotics frequently employed in animal production to treat and prevent gastrointestinal infections caused by *Escherichia coli* and *Salmonella*. They are also used as growth promoters in pig, poultry, and fish production. Using the relevant ELISA, LOD and IC_{50} values of 0.20 and 3.20 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively, were obtained in drinking water fed to animals. A fluorescence-based continuous-flow immunosensor for the sensitive, precise, accurate, and fast determination of paclitaxel was developed by Sheikh and Mulchandani.³⁶⁰ A natural product, this compound is known to be one of the most active anticancer agents approved by FDA for application in clinical oncology practice. The assay is based on the displacement and detection downstream of rhodamine-labeled paclitaxel by a flow-through spectrofluorometer, as a result of the competition with paclitaxel introduced as a pulse into the stream of carrier buffer flowing through the system. The detection limit found in buffer and human plasma samples was around 4 $\mu\text{g L}^{-1}$. Finally, a fluorescence immunoassay to detect spectinomycin, which is used as an oral treatment to control bacterial enteritis in pigs and to prevent and control losses due to chronic respiratory disease in chickens, was developed by Medina et al.³⁶¹ The antibodies and secondary immunoreagents implemented in the assay enabled an LOD of ca. 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ in buffer to be obtained.

8.4.2 STEROID HORMONES

Steroid hormones are a group of biologically active compounds controlling human body functions related mainly to the endocrine and immune systems. Synthesized from cholesterol, they have a cyclopenta-*o*-perhydrophenanthrene ring in common.⁴⁰ Mammalian steroid hormones, which are secreted by the adrenal cortex, testicles, ovary, and placenta, can be classified into different groups, such as estrogens, gestagens, androgens, and glucocorticoids, depending on the intracellular receptor to which they bind in order to become active.⁶ Apart from the endogenous hormones, many synthetic steroids have been produced for their high bioactivity. Thus, the consumption of natural and synthetic steroids in human medicine and animal farming has increased steadily in recent decades. On the other hand, humans and animals excrete hormone steroids from their bodies, which readily enter the aquatic environment through sewage discharge and animal waste disposal, mainly via effluents from WWTPs.^{4,6} Once in waterways, they may adsorb to solid particles, like bed sediments or soils, where steroids may persist for long periods.³⁶³ The increasing number of steroid hormones in the environment may interfere with the normal functioning of endocrine systems, thus affecting reproduction and development in wildlife.³⁶³ Apart from the standard chromatographic techniques, many examples can be found in the literature of the immunochemical determination of steroid residues, mainly in biological samples, but also in environmental matrices.^{364,365} Table 8.11 shows some examples of the immunological methods described for these compounds.

8.4.2.1 Estrogens

Estradiol is one of the main female sexual hormones; it is also the structural backbone for the engineering of some synthetic estrogens, such as ethynyl estradiol or mestranol, used in human hormone treatments. Both natural and synthetic estrogens are classified as endocrine disrupting chemicals (EDCs).^{6,362} Many of these substances and their metabolites end up in the environment where

TABLE 8.11
Immunochemical Techniques Developed for the Detection of Steroid Hormones

Target Analyte	Technique	Matrix	Sensitivity		Reference
			LOD	IC ₅₀	
Steroid Hormones					
Estradiol	ELISA ^a (Abraxis, USA)	Urban wastewater River and groundwater	0.05 µg L ⁻¹		370
	SPEOptical sensor	Seawater (sewage plants)	1.5 µg L ⁻¹		372
		Seawater	0.16 µg L ⁻¹		
	SPE-CLEIA	Tap and wastewater	1.5 µg L ⁻¹		369
	TIRF	Wastewater	0.16 µg L ⁻¹	1.84 µg L ⁻¹	371
	ETIA	Wastewater	0.85 µg L ⁻¹	1.2 µg L ⁻¹	371
Estriol	ELISA ^a (Abraxis, USA)	Urban wastewater River and groundwater	0.05 µg L ⁻¹		370
Estrone	ELISA ^a (Abraxis, USA)	Urban wastewater River and groundwater	0.05 µg L ⁻¹		370
	TIRF	River water	0.08 µg L ⁻¹	0.53 µg L ⁻¹	424
		Groundwater	0.08 µg L ⁻¹	0.56 µg L ⁻¹	
	TIRF	Wastewater	0.01 µg L ⁻¹	0.51 µg L ⁻¹	371
	ETIA	Wastewater	0.50 µg L ⁻¹	0.81 µg L ⁻¹	371
Ethinylestradiol	ELISA ^a (Abraxis, USA)	Urban wastewater River and groundwater	0.05 µg L ⁻¹		370
	TIRF	Wastewater	0.07 µg L ⁻¹	1.07 µg L ⁻¹	371
	ETIA	Wastewater	0.01 µg L ⁻¹	2.70 µg L ⁻¹	371
Noresthindrone	EIA	River and potable water	10 ng L ⁻¹		386
Progesterone	RIA	River and potable water	5 ng L ⁻¹		386
	CLEIA	River and potable water	15 pg per tube		385
	TIRF	MilliQ water	0.96 ng L ⁻¹		364
Testosterone	RIANA	Drinking water	0.2 ng L ⁻¹		375
		River water	0.2 ng L ⁻¹		

^a Commercial kit.

Notes: SPE, solid-phase extraction; SFE, supercritical fluid extraction; and GHD, glucose dehydrogenase.

they can have adverse effects on wildlife organisms even at very low concentrations.^{366–368} Thus, environmental monitoring programs on estrogens call for analytical techniques capable of achieving very low detection limits. With regard to immunochemical methods, there are several commercial tests on the market, addressed mainly to food residue analysis. Nevertheless, application to the analysis of aquatic ecosystems should be easy to implement. Zhao et al.³⁶⁹ developed a chemiluminescence enzyme immunoassay (CLEIA) for the determination of 17β-estradiol in wastewater samples; the working linear range obtained was from 2.5 to 1600 ng L⁻¹, with a detection limit of 1.5 ng L⁻¹. Recoveries of spiked tap water and wastewater samples at 0, 2.5, 10, and 50 ng L⁻¹ were in the 80–110% range. Results were compared with the commercially available radioimmunoassay kit (MARCA): a good correlation ($R^2 = 0.997$) was obtained. Farré et al.⁷⁶ evaluated four different commercially available ELISAs for the rapid screening of estrogens in different water matrices, including natural and spiked samples from urban wastewater, river water, and groundwater from the vicinity of Barcelona. ELISA kits³⁷⁰ were configured to measure 40 samples per plate with sufficient sensitivity, high cross-reactivity with other congeners, and reproducibility. All the samples extracted

by SPE yielded recoveries from 79% to 86%; assay validation was carried out by comparison with HPLC-MS/MS using a triple quadrupole (QqQ) instrument. Coille et al.³⁷¹ described the use of two fluorescence immunochemical methods to detect different estrogenic compounds in synthetic wastewater. In the first one, the immunosensor is based on the TIRF principle (LOD for estradiol = 0.16 $\mu\text{g L}^{-1}$ and for estrone and ethynylestradiol = 0.07 $\mu\text{g L}^{-1}$). The other method is an energy transfer immunoassay (ETIA), in which the specific antibody is labeled to a donor fluorescent dye, while the antigen is coupled to an acceptor dye via a BSA molecule. The fluorescence is quenched as a consequence of the biorecognition reaction. In this case, the respective detection limits obtained were 0.5, 0.85, and 0.01 $\mu\text{g L}^{-1}$ for estrone, estradiol, and ethylestradiol. Recovery rates for both techniques when measuring spiked wastewater samples were between 70% and 112%. Recently, Zhang et al.³⁷² have developed a sensitive and simple immunoassay based on the SPR technique for monitoring 17 β -estradiol. Previous to their analysis, seawater samples were hydrolyzed with HCl/methanol solution and preconcentrated using C18 SPE; recovery values were *ca.* 92%. Subsequent studies showed that the precision and repeatability of the SPR assay were good; cross-reactivity with other estrogens was very low.

8.4.2.2 Androgens

The main applications of immunochemical techniques for androgens are in the doping control of athletes, forensic chemistry, farm animals for human consumption, and food analysis.^{373,374} However, there have been a few applications in the environmental field for natural or synthetic androgens. For example, Barel-Cohen et al.⁴ monitored natural steroids in sewage and fishpond effluents, finding levels of testosterone between 2.1 and 7.8 ng L^{-1} at different collecting points along a river. A TIRF immunosensor has been developed for reliable sub- ng L^{-1} detection of testosterone in aquatic environmental matrices without sample pretreatment. Thus, direct analysis of spiked lab water, drinking water, and river water samples gave an LOD of 0.2 ng L^{-1} with recovery rates between 70% and 120%.³⁷⁵ This sensor system was therefore shown to be a suitable warning tool in environmental analysis, in addition to the standard analytical methods. On the other hand, several ELISA procedures have been developed for the analysis of testosterone and related compounds in biological samples.^{365,376} In the case of performance-enhancing anabolic steroids, such as stanozolol, nandrolone, and the recently designed steroid known as tetrahydrogestrinone, immunochemical assays have also been performed on equine and human urine samples during doping controls.³⁷⁷⁻³⁷⁹ Additionally, powerful techniques combining multiresidue immunoaffinity chromatography with GC-MS or ELISAs are available for the simultaneous identification and semiquantification of various androgens in samples of urine and feces.^{39,378,379} Figure 8.7 shows a scheme of a multi-IAC procedure.

Immunosensors have made a great contribution in the field of androgenic steroid detection, giving detection limits comparable to those obtained with standard ELISA procedures. Several electrochemical immunosensors have been developed for detecting testosterone, methyltestosterone,

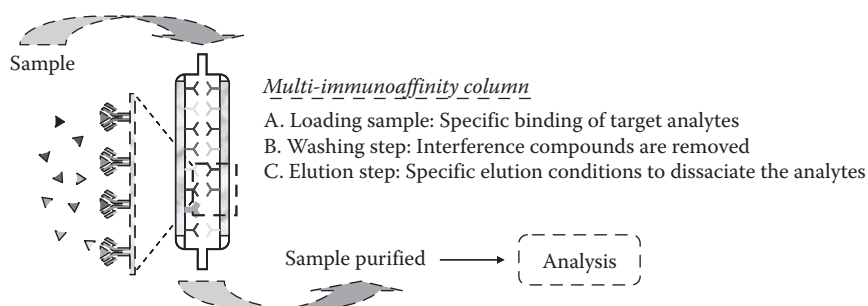


FIGURE 8.7 Schematic sequential step procedure for chromatographic determination after multiimmunoaffinity column purification.

19-nortestosterone, boldenone, and methylboldenone in spiked bovine urine using screen-printed electrodes.^{380–382} Once again, the techniques already used to analyze these compounds in complex biological matrices can be adapted for the analysis of environmental samples.

8.4.2.3 Gestagens

Gestagens are hormones that produce similar effects to those of endogenous progesterone, which is excreted from the ovary to act as a balancer in the menstrual cycle, pregnancy, and embryogenesis. As with estrogens, most of the immunochemical techniques described in the literature have been developed to analyze these compounds in biological matrices.^{383–385} On the other hand, Aherne et al. described a RIA for progesterone and norethindrone detection in water samples, obtaining LODs of 6 and 17 ng L⁻¹, respectively.³⁸⁶ This group also reported that norethindrone underwent 28% biodegradation in an activated sludge system in 6 h and was completely degraded in one day, which is the time required to purify river water for drinking purposes. Furthermore, Käppel et al.³⁶⁴ developed an immunosensor based on TIRF detection to analyze progesterone in spiked MilliQ water. The assay was optimized to obtain results in 5 min with an LOD of 0.96 ng L⁻¹. All these results show fairly well the usefulness of immunochemical techniques for the determination of micro- and nanogram per liter quantities of gestagens in aqueous samples.³⁸⁷

8.4.2.4 Corticosteroids

Endogenous corticosteroids are produced by the adrenal glands in response to stressors such as exercise, illness, and starvation.⁵ Synthetic cortisone derivatives were synthesized in the late 1940s for therapeutic purposes. Lately, these products have found their way into the world of sports because of their anti-inflammatory properties, but they are now on the list of substances banned by the International Olympic Committee (IOC). Moreover, corticosteroids like dexamethasone are used not only in veterinary practice for the treatment of respiratory and gastrointestinal disorders, but also as illegal growth promoters in animal feedstuffs. To control this undesirable situation, efficient screening procedures, based mainly on ELISA methods, have been described for the analysis of most important corticosteroids in biological matrices,^{388–390} but they have not yet been applied to environmental samples. Pujos³⁹⁰ reported the analysis of 18 human corticosteroids, both endogenous and synthetic, in spiked urine samples. The samples required a pretreatment based on simple 1/50 dilution. ELISA is a suitable technique for the systematic detection of corticosteroids by the food and agriculture industries in many different sample matrices;^{391–393} their implementation in the analysis of aquatic environmental samples seems appropriate.

8.5 GENERAL SUMMARY

In recent decades, immunochemical techniques have been widely demonstrated to be an interesting alternative to the more conventional analytical methodologies in many areas, but additional work is still necessary to completely adapt them to the analysis of environmental contaminants. On the other hand, considering that the analysis of very complex biological samples with these methods has been successful, the prospects for their application to the analysis of water and soil samples seem highly promising. In this relatively new situation, where data on the occurrence, risk assessment, and environmental toxicity of most of these emerging pollutants are not available, collaboration and interchange of expertise between analytical and immunochemists are needed to achieve this objective. The benefits accruing from these methods (i.e., high sensitivity, selectivity, cost-effectiveness, high sample processing capabilities vis-à-vis target analytes) are nowadays available for assessing risk and protecting public health from the adverse effects of these types of pollutants. From now on, research efforts should focus on the development of multianalyte immunochemical systems, in which more than one compound or group of compounds can be detected simultaneously, and on the design of new analytical user-friendly devices (i.e., immunosensors) for continuous or on-site measurements. Technical development should be accompanied by some officially organized efforts

to find ways of validating screening immunoassay techniques and recognizing them as practicable routine methods in environmental monitoring laboratories. For the time being, directives are issued, regulations enacted, and conferences held to ensure water quality, protect water resources, and ensure the good health of the entire environment.

ACKNOWLEDGMENTS

This work has been supported by the Ministry of Science and Technology (Contract numbers ALG2005-07700-C06-01, NAN2004-09195-C04-04, and NAN2004-09415-C05-02). The AMR group is a Group de Recerca de la Generalitat de Catalunya and has support from the Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya (expedient 2005SGR 00207).

REFERENCES

1. Xia, K., A. Bhandari, K. Das, et al. 2005. Occurrence and fate of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in biosolids. *J. Environ. Qual.* 34: 91–104.
2. Kolpin, D.W., E.T. Furlong, M.T. Meyer, et al. 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: A national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* 36: 1202–1211.
3. Rodriguez-Mozaz, S., M.J.L. de Alda, and D. Barceló. 2006. Biosensors as useful tools for environmental analysis and monitoring. *Anal. Bioanal. Chem.* 386: 1025–1041.
4. Barel-Cohen, K., L.S. Shore, M. Shemesh, et al. 2006. Monitoring of natural and synthetic hormone in polluted river. *J. Environ. Manage.* 78: 16–23.
5. Nozaki, O. 2001. Steroid analysis for medical diagnosis. *J. Chromatogr. A* 935: 267–278.
6. Ying, G.-G., R.S. Kookana, and Y.-J. Ru. 2002. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environ. Int.* 28: 545–551.
7. IARC (International Agency for research on cancer). 1985. Polynuclear Aromatic compounds: Bituminous, coal tar and derived products, shale oils and soots. *Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks of Chemicals to Humans*, 35: 4.
8. Wegener, H.C. 2003. Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 439–445.
9. Sumpter, J.P. and S. Jobling. 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ. Health Perspect.* 103: 174–178.
10. Gowik, P., B. Jülicher, and S. Uhlig. 1998. Multi-residue method for non-steroidal anti-inflammatory drugs in plasma using high-performance liquid chromatography-photodiode-array detection: Method description and comprehensive in-house validation. *J. Chromatogr. B* 716: 221–232.
11. Cohen, E., R.J. Maxwell, and D.J. Donoghue. 1999. Automated multi-residue isolation of fluoroquinolone antimicrobials from fortified and incurred chicken liver using on-line microdialysis and high-performance liquid chromatography with programmable fluorescence detection. *J. Chromatogr. B* 724: 137–145.
12. Koole, A., J.-P. Franke, and R.A. de Zeeuw. 1999. Multi-residue analysis of anabolics in calf urine using high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *J. Chromatogr. B* 724: 41–51.
13. Petrovic, M., M. Gros, and D. Barceló. 2006. Multi-residue analysis of pharmaceuticals in wastewater by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1124: 68–81.
14. Krue, A., A. Künnapas, K. Herodes, et al. 2008. Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1187: 58–66.
15. Gerlach, R.W., M.S. Gustin, and J.M. Van Emon. 2001. On-site mercury analysis of soil at hazardous waste sites: by immunoassay and ASV. *Appl. Geochem.* 16: 281–290.
16. Shan, G., W.R. Leeman, S.J. Gee, et al. 2001. Highly sensitive dioxin immunoassay and its application to soil and biota samples. *Anal. Chim. Acta* 444: 169–178.
17. Bogdanovic, J., M. Koets, I. Sander, et al. 2006. Rapid detection of fungal [alpha]-amylase in the work environment with a lateral flow immunoassay. *J. Allergy Clin. Immunol.* 118: 1157–1163.
18. Kim, S.J., K.V. Gobi, R. Harada, et al. 2006. Miniaturized portable surface plasmon resonance immunosensor applicable for on-site detection of low-molecular-weight analytes. *Sens. Actuat. B: Chem.* 115: 349–356.

19. Centi, S., E. Silva, S. Laschi, et al. 2007. Polychlorinated biphenyls (PCBs) detection in milk samples by an electrochemical magneto-immunosensor (EMI) coupled to solid-phase extraction (SPE) and disposable low-density arrays. *Anal. Chim. Acta* 594: 9–16.
20. Zhao, L.X. and J.M. Lin. 2005. Development of a micro-plate magnetic chemiluminescence enzyme immunoassay (MMCLEIA) for rapid- and high-throughput analysis of 17 beta-estradiol in water samples. *J. Biotechnol.* 118: 177–186.
21. Nichkova, M., M. Germani, and M.P. Marco. 2008. Immunochemical analysis of 2,4,6-Tribromophenol for assessment of wood contamination. *J. Agric. Food Chem.* 56: 29–34.
22. Adrian, J., D.G. Pinacho, B. Granier, et al. 2008. A multianalyte ELISA for immunochemical screening of sulfonamide, fluoroquinolone and β -lactam antibiotics in milk samples using class-selective bioreceptors. *Anal. Bioanal. Chem.* 391: 1703–1712.
23. Li, Z., S. Wang, N. Alice Lee, et al. 2004. Development of a solid-phase extraction-enzyme-linked immunosorbent assay method for the determination of estrone in water. *Anal. Chim. Acta* 503: 171–177.
24. Situ, C., E. Grutters, P. van Wichen, et al. 2006. A collaborative trial to evaluate the performance of a multi-antibiotic enzyme-linked immunosorbent assay for screening five banned antimicrobial growth promoters in animal feeding stuffs. *Anal. Chim. Acta* 561: 62–68.
25. Farré, M., M. Kuster, R. Brix, et al. 2007. Comparative study of an estradiol enzyme-linked immunosorbent assay kit, liquid chromatography-tandem mass spectrometry, and ultra performance liquid chromatography-quadrupole time of flight mass spectrometry for part-per-trillion analysis of estrogens in water samples. *J. Chromatogr. A* 1160: 166–175.
26. Jeon, M., J. Kim, K.-J. Paeng, et al. 2008. Biotin-avidin mediated competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect residues of tetracyclines in milk. *Microchem. J.* 88: 26–31.
27. Badihi-Mossberg, M., V. Buchner, and J. Rishpon. 2007. Electrochemical biosensors for pollutants in the environment. *Electroanalytical* 19: 2015–2028.
28. Daniels, J.S. and N. Pourmand. 2007. Label-free impedance biosensors: Opportunities and challenges. *Electroanalytical* 19: 1239–1257.
29. Gonzalez-Martinez, M.A., R. Puchades, and A. Maquieira. 2007. Optical immunosensors for environmental monitoring: How far have we come? *Anal. Bioanal. Chem.* 387: 205–218.
30. Marco, M.-P. and D. Barceló. 2000. Immunosensors for environmental analysis. In: D. Barceló (ed.), *Sample Handling and Trace Analysis of Pollutants Techniques, Applications and Quality Assurance*, pp. 1075–1103. Amsterdam: Elsevier.
31. Merkoci, A. 2007. Electrochemical biosensing with nanoparticles. *FEBS J.* 274: 310–316.
32. Rodriguez-Mozaz, S., M.P. Marco, M.J.L. de Alda, et al. 2004. Biosensors for environmental monitoring of endocrine disruptors: A review article. *Anal. Bioanal. Chem.* 378: 588–598.
33. Shankaran, D.R., K.V. Gobi, and N. Miura. 2007. Recent advancements in surface plasmon resonance immunosensors for detection of small molecules of biomedical, food and environmental interest. *Sens. Actuat. B: Chem.* 121: 158–177.
34. Grego, S., J.R. McDaniel, and B.R. Stoner. 2008. Wavelength interrogation of grating-based optical biosensors in the input coupler configuration. *Sens. Actuat. B: Chem.* 131: 347–355.
35. Leung, A., P.M. Shankar, and R. Mutharasan. 2007. A review of fiber-optic biosensors. *Sens. Actuat. B: Chem.* 125: 688–703.
36. Li, X.-M., X.-Y. Yang, and S.-S. Zhang. 2008. Electrochemical enzyme immunoassay using model labels. *Trends Anal. Chem.* 27: 543–553.
37. Pingarrón, J.M., P. Yáñez-Sedeño, and A. González-Cortés. 2008. Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. *Electrochim. Acta* 53: 5848–5866.
38. Pumera, M., S. Sánchez, I. Ichinose, et al. 2007. Electrochemical nanobiosensors. *Sens. Actuat. B: Chem.* 123: 1195–1205.
39. Salvador, J.-P., J. Adrian, R. Galve, et al. 2007. Application of bioassays/biosensors for the analysis of pharmaceuticals in environmental samples. In: M. Petrovic and D. Barceló (eds), *Analysis, Fate and Removal of Pharmaceuticals in the Water Cycle*, pp. 279–334. Amsterdam: Elsevier.
40. Estévez, M.C., H. Font, M. Nichkova, et al. 2005. Immunochemical determination of pharmaceuticals and personal care products as emerging pollutants. In: D. Barceló (ed.), *Emerging Organic Pollutants in Waste Waters and Sludge*, pp. 181–244. Berlin: Springer.
41. Jiang, X., D. Li, X. Xu, et al. 2008. Immunosensors for detection of pesticide residues. *Biosens. Bioelectron.* 23: 1577–1587.
42. Oubiña, A., B. Ballesteros, P. Bou, et al. 2000. Immunoassays for environmental analysis. In: D. Barceló (ed.), *Sample Handling and Trace Analysis of Pollutants Techniques, Applications and Quality Assurance*, pp. 289–340. Amsterdam: Elsevier.

43. Picó, Y., M. Fernández, M.J. Ruiz, et al. 2007. Current trends in solid-phase-based extraction techniques for the determination of pesticides in food and environment. *J. Biochem. Biophys. Methods* 70: 117–131.
44. Farré, M., L. Kantiani, and D. Barcelo. 2007. Advances in immunochemical technologies for analysis of organic pollutants in the environment. *Trends Anal. Chem.* 26: 1100–1112.
45. Schnelle-Kreis, J., I. Gebefugi, G. Welzl, et al. 2001. Occurrence of particle-associated polycyclic aromatic compounds in ambient air of the city of Munich. *Atmos. Environ.* 35(Suppl.): 71–81.
46. Negrao, M.R. and M.F. Alpendurada. 1998. Solvent-free method for the determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in waste water by solid-phase microextraction-high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *J. Chromatogr. A* 823: 211–218.
47. Tuhackova, J., T. Cajthaml, K. Novak, et al. 2001. Hydrocarbon deposition and soil microflora as affected by highway traffic. *Environ. Pollut.* 113: 255–262.
48. Bouzige, M., V. Pichon, and M.C. Hennion. 1998. On-line coupling of immunosorbent and liquid chromatographic analysis for the selective extraction and determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples at the ng l⁻¹ level. *J. Chromatogr. A* 823: 197–210.
49. Knopp, D., M. Seifert, V. Vaananen, et al. 2000. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated water and soil samples by immunological and chromatographic methods. *Environ. Sci. Technol.* 34: 2035–2041.
50. Li, K., L.A. Woodward, A.E. Karu, et al. 2000. Immunochemical detection of polycyclic aromatic hydrocarbons and 1-hydroxypyrene in water and sediment samples. *Anal. Chim. Acta* 419: 1–8.
51. Matschulat, D., A.P. Deng, R. Niessner, et al. 2005. Development of a highly sensitive monoclonal antibody based ELISA for detection of benzo[a] pyrene in potable water. *Analyst.* 130: 1078–1086.
52. U.S. EPA (SW-846) (Environmental Protection Agency). 1995. (ed.). *Method 4035, Soil Screening for Polynuclear Aromatic Hydrocarbons by Immunoassay*, 3rd edition. *Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods*, Vols. I and II, pp. 1–10. Washington DC.
53. Bowadt, S., L. Mazeas, D.J. Miller, et al. 1997. Field-portable determination of polychlorinated biphenyls and polynuclear aromatic hydrocarbons in soil using supercritical fluid extraction. *J. Chromatogr. A* 785: 205–217.
54. Chuang, J.C., J.M. Van Emon, Y.-L. Chou, et al. 2003. Comparison of immunoassay and gas chromatography-mass spectrometry for measurement of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated soil. *Anal. Chim. Acta* 486: 31–39.
55. Fillmann, G., M.C. Bicego, A. Zamboni, et al. 2007. Validation of immunoassay methods to determine hydrocarbon contamination in estuarine sediments. *J. Brazil. Chem. Soc.* 18: 774–781.
56. Nording, M., K. Frech, Y. Persson, et al. 2006. On the semi-quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated soil by an enzyme-linked immunosorbent assay kit. *Anal. Chim. Acta* 555: 107–113.
57. Barceló, D., A. Oubina, J.S. Salau, et al. 1998. Determination of PAHs in river water samples by ELISA. *Anal. Chim. Acta* 376: 49–53.
58. Fahrnich, K.A., M. Pravda, and G.G. Guilbault. 2003. Disposable amperometric immunosensor for the detection of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) using screen-printed electrodes. *Biosens. Bioelectron.* 18: 73–82.
59. Moore, E.J., M.P. Kreuzer, M. Pravda, et al. 2004. Development of a rapid single-drop analysis biosensor for screening of phenanthrene in water samples. *Electroanalytical* 16: 1653–1659.
60. Gobi, K.V., S.J. Kim, H. Tanaka, et al. 2007. Novel surface plasmon resonance (SPR) immunosensor based on monomolecular layer of physically-adsorbed ovalbumin conjugate for detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and atomic force microscopy study. *Sens. Actuat. B: Chem.* 123: 583–593.
61. Liu, M., Q.X. Li, and G.A. Rechnitz. 1999. Flow injection immunosensing of polycyclic aromatic hydrocarbons with a quartz crystal microbalance. *Anal. Chim. Acta* 387: 29–38.
62. Thomas, S.D. and Q.X. Li. 2000. Immunoaffinity chromatography for analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in corals. *Environ. Sci. Technol.* 34: 2649–2654.
63. Goda, Y., A. Kobayashi, S. Fujimoto, et al. 2004. Development of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of alkylphenol polyethoxylates and their biodegradation products. *Water Res.* 38: 4323–4330.
64. Salaguer, J.-L. 2002. Surfactants, types and uses. Teaching Aid in Surfactant Science & Engineering. p. 49.
65. Lunar, L., S. Rubio, and D. Perez-Bendito. 2004. Differentiation and quantification of linear alkyl benzene-sulfonate isomers by liquid chromatography-ion-trap mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1031: 17–25.
66. Lara-Martin, P. 2005. Determination and distribution of alkyl, ethoxysulfates and linear alkylbenzene sulfonates in coastal marine sediments from the Bay of Cadiz (Southwest of Spain). *Environ. Toxicol. Chem.* 24: 2196–2202.

67. Waters, J. and T.C.J. Feijte. 1995. AIS+/CESIO+ Environmental surfactant monitoring programme: Outcome of five national pilot studies on linear alkylbenzene sulphonate (LAS). *Chemosphere* 30: 1939–1956.
68. Marcomini, A. 2000. Behavior of anionic and nonionic surfactants and their persistent metabolites in the Venice lagoon, Italy. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 2000–2007.
69. Álvarez-Muñoz, D., P.A. Lara-Martín, J. Blasco, et al. 2007. Presence, biotransformation and effects of sulfophenylcarboxylic acids in the benthic fish *Solea senegalensis*. *Environ. Int.* 33: 565–570.
70. Nomura, Y., K. Ikebukuro, K. Yokoyama, et al. 1998. Application of a linear alkylbenzene sulfonate biosensor to river water monitoring. *Biosens. Bioelectron.* 13: 1047–1053.
71. Ahel, M., C. Schaffner, and W. Giger. 1996. Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment III. Occurrence and elimination of their persistent metabolites during infiltration of river water to groundwater. *Water Res.* 30: 37–46.
72. Mart'ianov, A.A., B.B. Dzantiev, A.V. Zherdev, et al. 2005. Immunoenzyme assay of nonylphenol: Study of selectivity and detection of alkylphenolic non-ionic surfactants in water samples. *Talanta* 65: 367–374.
73. OSPAR Commission for the Protection of the Marine Environment of the North-East Atlantic. 2008. Available at <http://www.ospar.org/>.
74. de Voogt, P., K. de Beer, and F. van der Wielen. 1997. Determination of alkylphenol ethoxylates in industrial and environmental samples. *Trends Anal. Chem.* 16: 584–595.
75. Wie, S.I. and B.D. Hammock. 1982. The use of enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) for the determination of Triton X nonionic detergents. *Anal. Biochem.* 125: 168–176.
76. Farré, M., J. Ramon, R. Galve, et al. 2006. Evaluation of a newly developed enzyme-linked immunosorbent assay for determination of linear alkyl benzenesulfonates in wastewater treatment plants. *Environ. Sci. Technol.* 40: 5064–5070.
77. Ramón-Azcón, J., R. Galve, F. Sanchez-Baeza, et al. 2006. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of the linear alkylbenzene sulfonates and long-chain sulfophenyl carboxylates using antibodies generated by pseudoheterologous immunization. *Anal. Chem.* 78: 71–81.
78. Estevez, M.C., R. Galve, F. Sanchez-Baeza, et al. 2008. Disulfide symmetric dimers as stable pre-hapten forms for bioconjugation: A strategy to prepare immunoreagents for the detection of sulfophenyl carboxylate residues in environmental samples. *Chem. Eur. J.* 14: 1906–1917.
79. Zhang, R., K. Hirakawa, D. Seto, et al. 2005. Sequential injection chemiluminescence immunoassay for anionic surfactants using magnetic microbeads immobilized with an antibody. *Talanta* 68: 231–238.
80. Sánchez-Martínez, M., M. Aguilar-Caballo, S. Eremin, et al. 2006. Long-wavelength fluorimetry as an indirect detection system in immunoaffinity chromatography: Application to environmental analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* 386: 1489–1495.
81. Sanchez-Martinez, M.L., M.P. Aguilar-Caballo, S.A. Eremin, et al. 2005. Determination of linear alkylbenzenesulfonates in water samples by immunoaffinity chromatography with fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta* 553: 93–98.
82. Estevez, M.C., M. Kreuzer, F. Sanchez-Baeza, et al. 2006. Analysis of nonylphenol: Advances and improvements in the immunochemical determination using antibodies raised against the technical mixture and hydrophilic immunoreagents. *Environ. Sci. Technol.* 40: 559–568.
83. Mart'ianov, A.A., A.V. Zherdev, S.A. Eremin, et al. 2004. Preparation of antibodies and development of enzyme-linked immunosorbent assay for nonylphenol. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 84: 965–978.
84. Estevez-Alberola, M.C. and M.P. Marco. 2004. Immunochemical determination of xenobiotics with endocrine disrupting effects. *Anal. Bioanal. Chem.* 378: 563–575.
85. Commission of the European Communities. 2000. Proposal for a directive of the European Parliament and of the Council on Environmental Quality Standards in the field of water policy and amending Directive 2000/60/EC.
86. Zhang, R., H. Nakajima, N. Soh, et al. 2007. Sequential injection chemiluminescence immunoassay for nonionic surfactants by using magnetic microbeads. *Anal. Chim. Acta* 600: 105–113.
87. Cespedes, R., K. Skryjova, M. Rakova, et al. 2006. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of 4-nonylphenol and octylphenol in surface water samples by LC-ESI-MS. *Talanta* 70: 745–751.
88. Matsunaga, T., F. Ueki, K. Obata, et al. 2003. Fully automated immunoassay system of endocrine disrupting chemicals using monoclonal antibodies chemically conjugated to bacterial magnetic particles. *Anal. Chim. Acta* 475: 75–83.
89. Goda, Y., M. Hirobe, A. Kobayashi, et al. 2005. Production of a monoclonal antibody and development of enzyme-linked immunosorbent assay for alkyl ethoxylates. *Anal. Chim. Acta* 528: 47–54.

90. Samsonova, J.V., N.A. Uskova, A.N. Andresyuk, et al. 2004. Biacore biosensor immunoassay for 4-nonylphenols: Assay optimization and applicability for shellfish analysis. *Chemosphere* 57: 975–985.
91. CIRCA (Communication Information Resource Centre Administration) 2008. Implementing the Water Framework Directive, European Commission. Available at <http://circa.europa.eu/Public/irc/env/wfd/information>.
92. Rose, A., C. Nistor, J. Emneus, et al. 2002. GDH biosensor based off-line capillary immunoassay for alkylphenols and their ethoxylates. *Biosens. Bioelectron.* 17: 1033–1043.
93. Evtugyn, G.A., S.A. Eremin, R.P. Shaljamova, et al. 2006. Amperometric immunosensor for nonylphenol determination based on peroxidase indicating reaction. *Biosens. Bioelectron.* 22: 56–62.
94. Bull, J.P., A.N. Serreqi, T. Chen, et al. 1998. Development of an immunoassay for a quaternary ammonium compound, benzyltrimethylammonium chloride. *Water Res.* 32: 3621–3630.
95. Safe, S. 1990. Polychlorinated-biphenyls (PCBs), dibenzo-para-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related-compounds—environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs). *Crit. Rev. Toxicol.* 21: 51–88.
96. Alcock, R.E., P.A. Behnisch, K.C. Jones, et al. 1998. Dioxin-like PCBs in the environment—human exposure and the significance of sources. *Chemosphere* 37: 1457–1472.
97. Birnbaum, L.S., D.F. Staskal, and J.J. Diliberto. 2003. Health effects of polybrominated dibenzo-*p*-dioxins (PBDDs) and dibenzofurans (PBDFs). *Environ. Int.* 29: 855–860.
98. Srogi, K. 2008. Levels and congener distributions of PCDDs, PCDFs and dioxin-like PCBs in environmental and human samples: A review. *Environ. Chem. Lett.* 6: 1–28.
99. Harner, T. and M. Shoeib. 2002. Measurements of octanol-air partition coefficients (KOA) for polybrominated diphenyl ethers (PBDEs): Predicting partitioning in the environment. *J. Chem. Eng. Data* 47: 228–232.
100. Gdaniec-Pietryka, M., L. Wolska, and J. Namiesnik. 2007. Physical speciation of polychlorinated biphenyls in the aquatic environment. *Trends Anal. Chem.* 26: 1005–1012.
101. U.S. EPA (Environmental Protection Agency). 1995. National Primary Drinking Water Regulations: CFR 40: Parts 141–143.
102. U.S. EPA (Environmental Protection Agency). 2008. Polychlorinated Biphenyls (PCBs) Manufacturing, Processing, Distribution in Commerce, and Use Prohibitions: CFR 40: Part 761.
103. U.S. EPA (Environmental Protection Agency). 1996. Method 4020-Screening for Polychlorinated Biphenyls by Immunoassay.
104. Fillmann, G., T.S. Galloway, R.C. Sanger, et al. 2002. Relative performance of immunochemical (enzyme-linked immunosorbent assay) and gas chromatography-electron-capture detection techniques to quantify polychlorinated biphenyls in mussel tissues. *Anal. Chim. Acta* 461: 75–84.
105. Lawruk, T.S., C.E. Lachman, S.W. Jourdan, et al. 1996. Quantitative determination of PCBs in soil and water by a magnetic particle-based immunoassay. *Environ. Sci. Technol.* 30: 695–700.
106. Tsutsumi, T., Y. Amakura, A. Okuyama, et al. 2006. Application of an ELISA for PCB 118 to the screening of dioxin-like PCBs in retail fish. *Chemosphere* 65: 467–473.
107. Zhao, C.Q., N.A. Anis, K.R. Rogers, et al. 1995. Fiber optic immunosensor for polychlorinated biphenyls. *J. Agric. Food Chem.* 43: 2308–2315.
108. Centi, S., S. Laschi, M. Franek, et al. 2005. A disposable immunomagnetic electrochemical sensor based on functionalised magnetic beads and carbon-based screen-printed electrodes (SPCEs) for the detection of polychlorinated biphenyls (PCBs). *Anal. Chim. Acta* 538: 205–212.
109. Centi, S., S. Laschi, and M. Mascini. 2007. Improvement of analytical performances of a disposable electrochemical immunosensor by using magnetic beads. *Talanta* 73: 394–399.
110. Pribyl, J., M. Hepel, and P. Skládal. 2006. Piezoelectric immunosensors for polychlorinated biphenyls operating in aqueous and organic phases. *Sens. Actuat. B: Chem. Spec. Issue* 113: 900–910.
111. Concejero, M.A., R. Galve, B. Herradon, et al. 2001. Feasibility of high-performance immunochromatography as an isolation method for PCBs and other dioxin-like compounds. *Anal. Chem.* 73: 3119–3125.
112. Endo, T., A. Okuyama, Y. Matsubara, et al. 2005. Fluorescence-based assay with enzyme amplification on a micro-flow immunosensor chip for monitoring coplanar polychlorinated biphenyls. *Anal. Chim. Acta* 531: 7–13.
113. Shimomura, M., Y. Nomura, W. Zhang, et al. 2001. Simple and rapid detection method using surface plasmon resonance for dioxins, polychlorinated biphenyls and atrazine. *Anal. Chim. Acta* 434: 223–230.
114. Bumb, R.R., W.B. Crummett, S.S. Cutie, et al. 1980. Trace chemistries of fire: A source of chlorinated dioxins. *Sci. Total Environ.* 210: 385–390.

115. Rappe, C., L.-O. Kjeller, S.-E. Kulp, et al. 1991. Levels, profile and pattern of PCDDs and PCDFs in samples related to the production and use of chlorine. *Chemosphere* 23: 1629–1636.
116. Schroy, J.M., F.D. Hileman, and S.C. Cheng. 1985. Physical/chemical properties of 2,3,7,8-TCDD. *Chemosphere* 14: 877–880.
117. U.S. EPA (Environmental Protection Agency). 2002. Method 4025-screening for polychlorinated dibenzodioxins and polychlorinated dibenzofurans (PCDD/Fs) by immunoassay. Available at <http://www.epa.gov/SW-846/pdfs/4025.pdf>.
118. Harrison, R.O. and R.E. Carlson. 1997. An immunoassay for TEQ screening of dioxin/furan samples: Current status of assay and applications development. *Chemosphere* 34: 915–928.
119. Stanker, L.H., B. Watkins, N. Rogers, et al. 1987. Monoclonal antibodies for dioxin: Antibody characterization and assay development. *Toxicology* 45: 229–243.
120. Watkins, B.E., L.H. Stanker, and M. Vanderlaan. 1989. An immunoassay for chlorinated dioxins in soils. *Chemosphere* 19: 267–270.
121. Nording, M., M. Nickkova, E. Spinnel, et al. 2006. Rapid screening of dioxin-contaminated soil by accelerated solvent extraction/purification followed by immunochemical detection. *Anal. Bioanal. Chem.* 385: 357–366.
122. Huwe, J.K., W.L. Shelver, L. Stanker, et al. 2001. On the isolation of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and furans from serum samples using immunoaffinity chromatography prior to high-resolution gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 757: 285–293.
123. Sugawara, Y., S.J. Gee, J.R. Sanborn, et al. 1998. Development of a Highly Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay based on polyclonal antibodies for the detection of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins. *Anal. Chem.* 70: 1092–1099.
124. Zhou, X.C. and L. Cao. 2001. High sensitivity microgravimetric biosensor for qualitative and quantitative diagnostic detection of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins. *Analyst* 126: 71–78.
125. de Wit, C.A. 2002. An overview of brominated flame retardants in the environment. *Chemosphere* 46: 583–624.
126. Hites, R.A. 2004. Polybrominated diphenyl ethers in the environment and in people: A meta-analysis of concentrations. *Environ. Sci. Technol.* 38: 945–956.
127. U.S. EPA (Environmental Protection Agency). 2008. Polybrominated diphenylethers (PBDEs). Available at <http://www.epa.gov/oppt/pbde/>.
128. Shelver, W.L., Y.-S. Keum, H.-J. Kim, et al. 2005. Hapten syntheses and antibody generation for the development of a polybrominated flame retardant ELISA. *J. Agric. Food Chem.* 53: 3840–3847.
129. ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 2006. Mercury. Available at <http://www.atsdr.cdc.gov/cabs/mercury/#risk>.
130. U.S. EPA (Environmental Protection Agency). 2005. Lead and copper rule: A quick reference guide for schools and child care facilities that are regulated under the safe drinking water act. Available at http://www.epa.gov/safewater/schools/pdfs/lead/qrg_lcr_schools.pdf.
131. U.S. EPA (Environmental Protection Agency). 2003. Index to EPA test methods. Available at <http://www.epa.gov/region1/info/testmethods/pdfs/testmeth.pdf>.
132. European Union Commission. 1998. Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption. OJ 1998 L 330, p. 32.
133. Darwish, I.A. and D.A. Blake. 2002. Development and validation of a one-step immunoassay for determination of cadmium in human serum. *Anal. Chem.* 74: 52–58.
134. Khosraviani, M., A.R. Pavlov, G.C. Flowers, et al. 1998. Detection of heavy metals by immunoassay: Optimization and validation of a rapid, portable assay for ionic cadmium. *Environ. Sci. Technol.* 32: 137–142.
135. Sasaki, K., K. Tawarada, H. Okuhata, et al. 2006. Development of MAb-based immunochromatographic assay for cadmium from biological samples. *Proceedings of the 28th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, Vol. 1–15, pp. 1499–1502.
136. Marx, A. and B. Hock. 2000. Monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for mercury(II) determination. *Methods: Companion Methods Enzymology* 22: 49–52.
137. Wylie, D.E., L.D. Carlson, R. Carlson, et al. 1991. Detection of mercuric ions in water by ELISA with a mercury-specific antibody. *Anal. Biochem.* 194: 381–387.
138. Barbas, C.F, J.S. Rosenblum, and R.A. Lerner. 1993. Direct selection of antibodies that coordinate metals from semisynthetic combinatorial libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 90, pp. 6385–6389.
139. Blake, D.A., R.C. Blake II, M. Khosraviani, et al. 1998. Immunoassays for metal ions. *Anal. Chim. Acta* 376: 13–19.

140. Johnson, D.K., S.M. Combs, J.D. Parsen, et al. 2002. Lead analysis by anti-chelate fluorescence polarization immunoassay. *Environ. Sci. Technol.* 36: 1042–1047.
141. Blake, D.A., R.M. Jones, R.C. Blake, et al. 2001. Antibody-based sensors for heavy metal ions. *Biosens. Bioelectron.* 16: 799–809.
142. Chakrabarti, P., F.M. Hatcher, R.C. Blake, et al. 1994. Enzyme immunoassay to determine heavy metals using antibodies to specific metal-EDTA complexes: Optimization and validation of an immunoassay for soluble indium. *Anal. Biochem.* 217: 70–75.
143. Norey, C.G., W.E. Lees, B.M. Darke, et al. 1990. Immunological distinction between piscine and mammalian metallothioneins. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 95: 597–601.
144. Hogstrand, C., P.-E. Olsson, and C. Haux. 1989. A radioimmunoassay for metallothionein in fish. *Mar. Environ. Res.* 28: 183–186.
145. Butcher, H., W. Kennette, O. Collins, et al. 2003. A sensitive time-resolved fluorescent immunoassay for metallothionein protein. *J. Immunol. Methods* 272: 247–256.
146. El Hourch, M., A. Dudoit, and J.-C. Amiard. 2003. Optimization of new voltammetric method for the determination of metallothionein. *Electrochim. Acta* 48: 4083–4088.
147. Krishnan, A.V., P. Stathis, S.F. Permuth, et al. 1993. Bisphenol-A: An estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* 132: 2279–2286.
148. Szemiea, M., M. Gryta, and E. Grzywa. 2000. Study of the separation of Dianin's compound formed in the bisphenol-A synthesis. *J. Inclusion Phenom. Macrocycl. Chem.* 37: 59–66.
149. Deng, H., G. Tang, and W. Pan 2007. Method for producing epoxy using bisphenol A and epoxychloropropane, China Patent, Editor.
150. Kong, Q., Q. Dong, and Z. Shang. 2006. Production process of tetrabromobisphenol-S-bis (2,3-dibromopropyl) ether. China Patent, Editor.
151. Korner, W., U. Bolz, W. Süßmuth, et al. 2000. Input/output balance of estrogenic active compounds in a major municipal sewage plant in Germany. *Chemosphere* 40: 1131–1142.
152. Staples, C.A., P.B. Dome, G.M. Klecka, et al. 1998. A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere* 36: 2149–2173.
153. Bolz, U., H. Hagenmaier, and W. Korner. 2001. Phenolic xenoestrogens in surface water, sediments, and sewage sludge from Baden-Württemberg, south-west Germany. *Environ. Pollut.* 115: 291–301.
154. Fromme, H., T. Kuchler, T. Otto, et al. 2002. Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Res.* 36: 1429–1438.
155. Heemken, O.P., H. Reincke, B. Stachel, et al. 2001. The occurrence of xenoestrogens in the Elbe River and the North Sea. *Chemosphere* 45: 245–259.
156. Goda, Y., A. Kobayashi, K. Fukuda, et al. 2000. Development of the ELISAs for detection of hormone-disrupting chemicals. *Water Sci. Technol.* 42: 81–88.
157. Hirobe, M., Y. Goda, Y. Okayasu, et al. 2006. The use of enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) for the determination of pollutants in environmental and industrial wastes. *Water Sci. Technol.* 54: 1–9.
158. Zhao, M.P., Y.Z. Li, Z.Q. Guo, et al. 2002. A new competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for determination of estrogenic bisphenols. *Talanta* 57: 1205–1210.
159. Marchesini, G.R., K. Koopal, E. Meulenberg, et al. 2007. Spreeta-based biosensor assays for endocrine disruptors. *Biosens. Bioelectron.* 22: 1908–1915.
160. Matsumoto, K., T. Sakai, A. Torimaru, et al. 2005. A surface plasmon resonance-based immunosensor for sensitive detection of bisphenol A. *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.* 50: 625–634.
161. Soh, N., T. Watanabe, Y. Asano, et al. 2003. Indirect competitive immunoassay for bisphenol A, based on a surface plasmon resonance sensor. *Sens. Mater.* 15: 423–438.
162. Rodriguez-Mozaz, S., M.L. de Alda, and D. Barceló. 2005. Analysis of bisphenol A in natural waters by means of an optical immunosensor. *Water Res.* 39: 5071–5079.
163. Tschmelak, J., G. Proll, and G. Gauglitz. 2004. Verification of performance with the automated direct optical TIRF immunosensor (River Analyser) in single and multi-analyte assays with real water samples. *Biosens. Bioelectron.* 20: 743–752.
164. Rahman, M.A., M.J.A. Shiddiky, J.S. Park, et al. 2007. An impedimetric immunosensor for the label-free detection of bisphenol A. *Biosens. Bioelectron.* 22: 2464–2470.
165. Park, J.W., S. Kurosawa, H. Aizawa, et al. 2006. Piezoelectric immunosensor for bisphenol A based on signal enhancing step with 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymeric nanoparticle. *Analyst* 131: 155–162.
166. Zhao, M.P., Y. Liu, Y.Z. Li, et al. 2003. Development and characterization of an immunoaffinity column for the selective extraction of bisphenol A from serum samples. *J. Chromatogr. B* 783: 401–410.

167. Braunrath, R., D. Podlipna, S. Padlesak, et al. 2005. Determination of bisphenol A in canned foods by immunoaffinity chromatography, HPLC, and fluorescence detection. *J. Agric. Food Chem.* 53: 8911–8917.
168. Hyer, K.E., G.M. Hornberger, and J.S. Herman. 2001. Processes controlling the episodic streamwater transport of atrazine and other agrichemicals in an agricultural watershed. *J. Hydrol.* 254: 47–66.
169. Holland, J. and P. Sinclair. 2004. Environmental fate of pesticides and the consequences for residues in food and drinking water. In: D. Hamilton and S. Crossley (eds), *Pesticide Residues in Food and Drinking Water*, pp. 27–62. New York: Wiley.
170. Miyamoto, J., N. Mikami, and Y. Takimoto. 1990. The fate of pesticides in aquatic ecosystems. In: D.H. Hutson and T.R. Roberts (eds), *Progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology*, pp. 123–147. New York: Wiley.
171. Aguilar, C., I. Ferrer, F. Borrull, et al. 1999. Monitoring of pesticides in river water based on samples previously stored in polymeric cartridges followed by on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-diode array detection and confirmation by atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 386: 237–248.
172. Barceló, D. 1991. Applications of gas chromatography-mass spectrometry in monitoring environmentally important compounds. *Trends Anal. Chem.* 10: 323–329.
173. Fernandez-Alba, A.R., A. Aguera, M. Contreras, et al. 1998. Comparison of various sample handling and analytical procedures for the monitoring of pesticides and metabolites in ground waters. *J. Chromatogr. A* 823: 35–47.
174. Irace-Guigand, S., J.J. Aaron, P. Scribe, et al. 2004. A comparison of the environmental impact of pesticide multiresidues and their occurrence in river waters surveyed by liquid chromatography coupled in tandem with UV diode array detection and mass spectrometry. *Chemosphere* 55: 973–981.
175. Lacorte, S., J.J. Vreuls, J.S. Salau, et al. 1998. Monitoring of pesticides in river water using fully automated on-line solid-phase extraction and liquid chromatography with diode array detection with a novel filtration device. *J. Chromatogr. A* 795: 71–82.
176. Mallat, E., D. Barceló, C. Barzen, et al. 2001. Immunosensors for pesticide determination in natural waters. *Trends Anal. Chem.* 20: 124–132.
177. Najdek, M. and D. Bazulic. 1988. Chlorinated hydrocarbons in mussels and some benthic organisms from the northern Adriatic Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 19: 37–38.
178. Perez-Ruzafa, A., S. Navarro, A. Barba, et al. 2000. Presence of pesticides throughout trophic compartments of the food web in the Mar Menor Lagoon (SE Spain). *Mar. Pollut. Bull.* 40: 140–151.
179. Rivera, J., J. Caixach, and M. De Torres. 1986. Fate of atrazine and trifluralin from an industrial waste dumping at the Llobregat river. Presence in fish, raw and finished water. *Int. J. Anal. Chem.* 24: 183–191.
180. Barzen, C., A. Brecht, and G. Gauglitz. 2002. Optical multiple-analyte immunosensor for water pollution control. *Biosens. Bioelectron.* 17: 289–295.
181. Delaunay-Bertoncini, N. and M.C. Hennion. 2004. Immunoaffinity solid-phase extraction for pharmaceutical and biomedical trace-analysis-coupling with HPLC and CE-perspectives. *J. Pharmac. Biomed. Anal.* 34: 717–736.
182. Hennion, M.-C. and V. Pichon. 2003. Immuno-based sample preparation for trace analysis. *J. Chromatogr. A* 1000: 29–52.
183. Rodriguez-Mozaz, S., S. Reder, M. Lopez de Alda, et al. 2004. Simultaneous multi-analyte determination of estrone, isoproturon and atrazine in natural waters by the RIVER ANALYser (RIANA), an optical immunosensor. *Biosens. Bioelectron.* 19: 633–640.
184. Tschmelak, J., G. Proll, and G. Gauglitz. 2005. Optical biosensor for pharmaceuticals, antibiotics, hormones, endocrine disrupting chemicals and pesticides in water: Assay optimization process for estrone as example. *Talanta* 65: 313–323.
185. Valera, E., J. Ramón-Azcón, Á. Rodríguez, et al. 2007. Impedimetric immunosensor for atrazine detection using interdigitated [mu]-electrodes (ID[mu]E's). *Sens. Actuat. B: Chem.* 125: 526–537.
186. Nickkova, M. and M.-P. Marco. 2006. Biomonitoring human exposure to organohalogenated substances by measuring urinary chlorophenols using a High-Throughput Screening (HTS) immunochemical method. *Environ. Sci. Technol.* 40: 2469–2477.
187. Galve, R., F. Camps, F. Sanchez-Baeza, et al. 2000. Development of an immunochemical technique for the analysis of trichlorophenols using theoretical models. *Anal. Chem.* 72: 2237–2246.
188. Nickkova, M., R. Galve, and M.-P. Marco. 2002. Biological monitoring of 2,4,5-trichlorophenol (I): Preparation of antibodies and development of an immunoassay using theoretical models. *Chem. Res. Toxicol.* 15: 1360–1370.

189. Galve, R., F. Sánchez-Baeza, F. Camps, et al. 2002. Indirect competitive immunoassay for trichlorophenol: Rational evaluation of the competitor heterology. *Anal. Chim. Acta* 452: 191–206.
190. Nichkova, M. and M.P. Marco. 2005. Development and evaluation of C18 and immunosorbent solid-phase extraction methods prior to immunochemical analysis of chlorophenols in human urine. *Anal. Chim. Acta* 533: 67–82.
191. Centero, E.R., W.J. Johnson, and A.H. Schon. 1970. Antibodies to two common pesticides, DDT and malathion. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 37: 1–13.
192. Haas, G.J. and E.J. Guardia. 1968. Production of antibodies against insecticide-protein conjugates. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 129: 546–551.
193. Beasley, H.L., T. Phongkham, M.H. Daunt, et al. 1998. Development of a panel of immunoassays for monitoring DDT, its metabolites, and analogues in food and environmental matrices. *J. Agric. Food Chem.* 46: 3339–3352.
194. Amitarani, B.E., A. Pasha, P. Gowda, et al. 2002. Comparison of ELISA and GC methods to detect DDT residues in water samples. *Indian J. Biotechnol.* 1: 292–297.
195. Eremin, S.A., I.A. Ryabova, J.N. Yakovleva, et al. 2002. Development of a rapid, specific fluorescence polarization immunoassay for the herbicide chlorsulfuron. *Anal. Chim. Acta* 468: 229–236.
196. Langone, J.J. and H. Van Vunakis. 1975. Radioimmunoassay for dieldrin and aldrin. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 10: 163–171.
197. Manclus, J.J., A. Abad, M.Y. Lebedev, et al. 2004. Development of a monoclonal immunoassay selective for chlorinated cyclodiene insecticides. *J. Agric. Food Chem.* 52: 2776–2784.
198. Stanker, L.H., M. Vanderlaan, and B.E. Watkins. 1994. Monoclonal antibodies to cyclodiene insecticides and method for detecting the same. U.S. Patent, Editor.
199. Lee, N.A. and I.R. Kennedy. 2001. Environmental monitoring of pesticides by immunoanalytical techniques: Validation, current status, and future perspectives. *J. AOAC Int.* 84: 1393–1406.
200. Ragab, A.A., A.M.A. Ibrahim, and C.J. Smith. 1997. Quantification by ELISA of aldrin/dieldrin in river Nile water and tap water samples collected in Egypt. *Food Agric. Immunol.* 9: 51–55.
201. Brummel, K.E., J. Wright, and M.E. Eldefrawi. 1997. Fiber optic biosensor for cyclodiene insecticides. *J. Agric. Food Chem.* 45: 3292–3298.
202. Mercader, J.V. and A. Montoya. 1999. Development of monoclonal ELISAs for azinphos-methyl. II. Assay optimization and water sample analysis. *J. Agric. Food Chem.* 47: 1285–1293.
203. Watanabe, E., K. Baba, H. Eun, et al. 2006. Evaluation of performance of a commercial monoclonal antibody-based fenitrothion immunoassay and application to residual analysis in fruit samples. *J. Food Prot.* 69: 191–198.
204. Banks, J.N., M.Q. Chaudhry, W.A. Matthews, et al. 1998. Production and characterisation of polyclonal antibodies to the common moiety of some organophosphorus pesticides and development of a generic type ELISA. *Food Agric. Immunol.* 10: 349–361.
205. Nishi, K., Y. Imajuku, M. Nakata, et al. 2003. Preparation and characterization of monoclonal and recombinant antibodies specific to the insecticide malathion. *J. Pestic. Sci.* 28: 301–309.
206. U.S. EPA (Environmental Protection Agency). 1992. Pesticides in groundwater database A compilation of monitoring studies: 1971–1991. EPA 734-12-92-001. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances.
207. ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 2000. Toxicological profile information sheets-malathions-draft for public comment, Atlanta, GA.
208. Brun, E.M., M. Garces-Garcia, M.J. Banuls, et al. 2005. Evaluation of a novel malathion immunoassay for groundwater and surface water analysis. *Environ. Sci. Technol.* 39: 2786–2794.
209. Ibrahim, A.M.A., M.A. Morsy, M.M. Hewedi, et al. 1994. Monoclonal antibody based ELISA for the detection of ethyl parathion. *Food Agric. Immunol.* 6: 23–30.
210. Abad, A. and A. Montoya. 1997. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay to carbaryl. 2. Assay optimization and application to the analysis of water samples. *J. Agric. Food Chem.* 45: 1495–1501.
211. Itak, J.A., E.G. Olson, J.R. Fleeker, et al. 1993. Validation of a Paramagnetic Particle-Based Elisa for the quantitative-determination of carbaryl in water. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 51: 260–267.
212. Marco, M.-P., S. Chiron, J. Gascón, et al. 1995. Validation of two immunoassay methods for environmental monitoring of carbaryl and 1-naphthol in ground water samples. *Anal. Chim. Acta* 311: 319–329.
213. Jourdan, S.W., A.M. Scutellaro, J.R. Fleeker, et al. 1995. Determination of carbofuran in water and soil by a Rapid Magnetic Particle-Based Elisa. *J. Agric. Food Chem.* 43: 2784–2788.
214. Abad, A., M.J. Moreno, R. Pelegrí, et al. 1999. Determination of carbaryl, carbofuran and methiocarb in cucumbers and strawberries by monoclonal enzyme immunoassays and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: An analytical comparison. *J. Chromatogr. A* 833: 3–12.

215. Yang, G. and S. Kang. 2008. SPR-based antibody-antigen interaction for real time analysis of carbamate pesticide residues. *Food Sci. Biotechnol.* 17: 15–19.
216. Abad, A., M.J. Moreno, R. Pelegri, et al. 2001. Monoclonal enzyme immunoassay for the analysis of carbaryl in fruits and vegetables without sample cleanup. *J. Agric. Food Chem.* 49: 1707–1712.
217. Nunes, G.S., M.P. Marco, M. Farré, et al. 1999. Direct application of an enzyme-linked immunosorbent assay method for carbaryl determination in fruits and vegetables. Comparison with a liquid chromatography-postcolumn reaction fluorescence detection method. *Anal. Chim. Acta* 387: 245–253.
218. Abad, A., M.J. Moreno, and A. Montoya. 1997. A monoclonal immunoassay for carbofuran and its application to the analysis of fruit juices. *Anal. Chim. Acta* 347: 103–110.
219. Abad, A. and A. Montoya. 1995. Application of a monoclonal antibody-based elisa to the determination of carbaryl in apple and grape juices. *Anal. Chim. Acta* 311: 365–370.
220. Bacigalupo, M.A. and G. Meroni. 2007. Quantitative determination of diuron in ground and surface water by time-resolved fluoroimmunoassay: Seasonal variations of diuron, carbofuran, and paraquat in an agricultural area. *J. Agric. Food Chem.* 55: 3823–3828.
221. Bacigalupo, M.A., G. Meroni, and R. Longhi. 2006. Determination of carbofuran in water by homogeneous immunoassay using selectively conjugate mastoperan and terbium/dipicolinic acid fluorescent complex. *Talanta* 69: 1106–1111.
222. Xing, W.-L., G.-R. Ou, Z.-H. Jiang, et al. 2000. Detection of multiple herbicide residues using a planar array evanescent field immunosensor. *Anal. Chem.* 33: 1071–1078.
223. Mauriz, E., A. Calle, J.J. Manclus, et al. 2007. Multi-analyte SPR immunoassays for environmental biosensing of pesticides. *Anal. Bioanal. Chem.* 387: 1449–1458.
224. Gonzalez-Martinez, M.A., S. Morais, R. Puchades, et al. 1997. Monoclonal antibody-based flow-through immunosensor for analysis of carbaryl. *Anal. Chem.* 69: 2812–2818.
225. Gonzalez-Martinez, M.A., S. Morais, R. Puchades, et al. 1997. Development of an automated controlled-pore glass flow-through immunosensor for carbaryl. *Anal. Chim. Acta* 347: 199–205.
226. Mauriz, E., A. Calle, A. Montoya, et al. 2006. Determination of environmental organic pollutants with a portable optical immunosensor. *Talanta* 69: 359–364.
227. Penalva, J., J.A. Gabaldon, A. Maquieira, et al. 2000. Determination of carbaryl in vegetables using an immunosensor working in organic media. *Food Agric. Immunol.* 12: 101–114.
228. Lee, N., D.P. McAdam, and J.H. Skerritt. 1998. Development of immunoassays for type II synthetic pyrethroids. 1. Hapten design and application to heterologous and homologous assays. *J. Agric. Food Chem.* 46: 520–534.
229. Lee, N., H.L. Beasley, and J.H. Skerritt. 1998. Development of immunoassays for type II synthetic pyrethroids. 2. Assay specificity and application to water, soil, and grain. *J. Agric. Food Chem.* 46: 535–546.
230. Watanabe, T., G. Shan, D.W. Stoutamire, et al. 2001. Development of a class-specific immunoassay for the type I pyrethroid insecticides. *Anal. Chim. Acta* 444: 119–129.
231. Mak, S.K., G. Shan, H.J. Lee, et al. 2005. Development of a class selective immunoassay for the type II pyrethroid insecticides. *Anal. Chim. Acta* 534: 109–120.
232. Gao, H.B., Y. Ling, T. Xu, et al. 2006. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the pyrethroid insecticide cyhalothrin. *J. Agric. Food Chem.* 54: 5284–5291.
233. Feng, J., G.M. Shan, B.D. Hammock, et al. 2003. Fluorescence quenching competitive immunoassay in micro droplets. *Biosens. Bioelectron.* 18: 1055–1063.
234. Sasaki, S., E. Kai, H. Miyachi, et al. 1998. Direct determination of etofenprox using surface plasmon resonance. *Anal. Chim. Acta* 363: 229–233.
235. Ballesteros, B., D. Barceló, A. Dankwardt, et al. 2003. Evaluation of a field test kit for triazine herbicides (SensoScreen® TR500) as an alarm system of pesticide water samples contamination. *Anal. Chim. Acta* 475: 105–115.
236. Gonzalez-Martinez, M.A., S. Morais, R. Puchades, et al. 1998. Enzyme immunoassay for atrazine. Comparison of three immobilization supports. *Fresenius J. Anal. Chem.* 361: 179–184.
237. Ramón-Azcón, J., E. Valera, Á. Rodríguez, et al. 2008. An impedimetric immunosensor based on interdigitated microelectrodes (IDμE) for the determination of atrazine residues in food samples. *Biosens. Bioelectron.* 23: 1367–1373.
238. Wittmann, C. and B. Hock. 1989. Improved enzyme immunoassay for the analysis of triazines in water samples. *Food Agric. Immunol.* 1: 211–224.
239. Gascon, J., A. Oubina, I. Ferrer, et al. 1996. Performance of two immunoassays for the determination of atrazine in sea water samples as compared with on-line solid phase extraction-liquid chromatography-diode array detection. *Anal. Chim. Acta* 330: 41–51.

240. Zacco, E., M.I. Pividori, and S. Alegret. 2006. Electrochemical magnetoimmunosensing strategy for the detection of pesticides residues. *Anal. Chem.* 78: 1780–1788.
241. Rodríguez, Á., E. Valera, J. Ramón-Azcón, et al. 2008. Single frequency impedimetric immunosensor for atrazine detection. *Sens. Actuat. B: Chem.* 129: 921–928.
242. Valera, E., J. Ramón-Azcón, F.J. Sanchez, et al. 2008. Conductimetric immunosensor for atrazine detection based on antibodies labelled with gold nanoparticles. *Sens. Actuat. B: Chem.* 134: 95–103.
243. Farré, M., E. Martínez, J. Ramón, et al. 2007. Part per trillion determination of atrazine in natural water samples by surface plasmon resonance immunosensor. *Anal. Bioanal. Chem.* 388: 207–214.
244. Tudorache, M. and J. Emneus. 2006. Micro-immuno supported liquid membrane assay (mu-ISLMA). *Biosens. Bioelectron.* 21: 1513–1520.
245. Tschmelak, J., G. Proll, J. Riedt, et al. 2005. Biosensors for unattended, cost-effective and continuous monitoring of environmental pollution: Automated water analyser computer supported system (AWACSS) and river analyser (RIANA). *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 85: 837–852.
246. Morais, S., P. Casino, M.L. Marin, et al. 2002. Assessment of enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of 2,4,5-TP in water and soil. *Anal. Bioanal. Chem.* 374: 262–268.
247. Sanchez, F.G., A.N. Diaz, A.F.G. Diaz, et al. 1999. Quantification of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid by fluorescence enzyme-linked immunosorbent assay with secondary antibody. *Anal. Chim. Acta* 378: 219–224.
248. Meusel, M., D. Trau, A. Katerkamp, et al. 1998. New ways in bioanalysis one-way optical sensor chip for environmental analysis. *Sens. Actuat. B: Chem.* 51: 249–255.
249. Cuong, N.V., T.T. Bachmann, and R.D. Schmid. 1999. Development of a dipstick immunoassay for quantitative determination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in water, fruit and urine samples. *Fresenius J. Anal. Chem.* 364: 584–589.
250. Ben Rejeb, S., N. Fischer Durand, A. Martel, et al. 1998. Development of anti-phenylurea antibody purification techniques for improved environmental applications. *Anal. Chim. Acta* 376: 41–48.
251. Scholthof, K.B.G., Z. Guisheng, and A.E. Karu. 1997. Derivation and properties of recombinant fab antibodies to the phenylurea herbicide diuron. *J. Agric. Food Chem.* 45: 1509–1517.
252. Ferrer, I., V. Pichon, M.C. Hennion, et al. 1997. Automated sample preparation with extraction columns by means of anti-isoproturon immunosorbents for the determination of phenylurea herbicides in water followed by liquid chromatography-diode array detection and liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 777: 91–98.
253. Pichon, V., L. Chen, M.C. Hennion, et al. 1995. Preparation and evaluation of immunosorbents for selective trace enrichment of phenylurea and triazine herbicides in environmental waters. *Anal. Chem.* 67: 2451–2460.
254. Liégeois, E., Y. Dehon, B. de Brabant, et al. 1992. ELISA test, a new method to detect and quantify isoproturon in soil. *Sci. Total Environ.* 123–124: 17–28.
255. Mallat, E., C. Barzen, R. Abuknesha, et al. 2001. Part per trillion level determination of isoproturon in certified and estuarine water samples with a direct optical immunosensor. *Anal. Chim. Acta* 426: 209–216.
256. Pulido-Tofiño, P., J.M. Barrero-Moreno, and M.C. Pérez-Conde. 2000. Flow-through fluoroimmunosensor for isoproturon determination in agricultural foodstuff: Evaluation of antibody immobilization on solid support. *Anal. Chim. Acta* 417: 85–94.
257. Lawrence, J.F., C. Ménard, M.-C. Hennion, et al. 1996. Use of immunoaffinity chromatography as a simplified cleanup technique for the liquid chromatographic determination of phenylurea herbicides in plant material. *J. Chromatogr. A* 732: 277–281.
258. Pichon, V., L. Chen, N. Durand, et al. 1996. Selective trace enrichment on immunosorbents for the multiresidue analysis of phenylurea and triazine pesticides. *J. Chromatogr. A* 725: 107–119.
259. Pichon, V., L. Chen, and M.C. Hennion. 1995. On-line preconcentration and liquid chromatographic analysis of phenylurea pesticides in environmental water using a silica-based immunosorbent. *Anal. Chim. Acta* 311: 429–436.
260. Pulido-Tofiño, P., J.M. Barrero-Moreno, and M.C. Pérez-Conde. 2001. Sol-gel glass doped with isoproturon antibody as selective support for the development of a flow-through fluoroimmunosensor. *Anal. Chim. Acta* 429: 337–345.
261. Lawruk, T.S., C.S. Hottenstein, D.P. Herzog, et al. 1992. Quantification of alachlor in water by a novel magnetic particle-based ELISA. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 48: 643–650.
262. Feng, P.C.C., S.J. Wratten, S.R. Horton, et al. 1990. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for alachlor and its application to the analysis of environmental water samples. *J. Agric. Food Chem.* 38: 159–163.

263. Schraer, S.M., D.R. Shaw, M. Boyette, et al. 2000. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and gas chromatography procedures for the detection of cyanazine and metolachlor in surface water samples. *J. Agric. Food Chem.* 48: 5881–5886.
264. Gaynor, J.D., D.A. Cancilla, G.R.B. Webster, et al. 1996. Comparative solid phase extraction, solid phase microextraction, and immunoassay analyses of metolachlor in surface runoff and tile drainage. *J. Agric. Food Chem.* 44: 2736–2741.
265. Schmitt, A., V. Hingst, L. Erdinger, et al. 1992. Aspects in the development of an enzyme immunosorbent-assay for the detection of the herbicide metolachlor in water samples. *Zentral. Hyg. Umweltmed.* 193: 272–286.
266. Tessier, D.M. and J. Marshall Clark. 1998. An enzyme immunoassay for mutagenic metabolites of the herbicide alachlor. *Anal. Chim. Acta* 376: 103–112.
267. Yakovleva, J., A.V. Zherdev, V.A. Popova, et al. 2003. Production of antibodies and development of enzyme-linked immunosorbent assays for the herbicide butachlor. *Anal. Chim. Acta* 491: 1–13.
268. Guo, Y., J. Chen, N. Wang, et al. 2002. Preparation and application of polyclonal antibody to butachlor. *Beijing Daxue Xuebao Ziran Kexue Ban/Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis* 38: 447.
269. Hegedus, G., V. Krikunova, I. Belai, et al. 2002. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of acetochlor. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 82: 879–891.
270. Solna, R., P. Skládal, and S.A. Eremin. 2003. Development of a disposable electrochemical immunosensor for detection of the herbicide acetochlor. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 83: 609–620.
271. Yakovleva, J.N., A.I. Lobanova, O.A. Panchenko, et al. 2002. Production of antibodies and development of specific polarization fluoroimmunoassay for acetochlor. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 82: 851–863.
272. Kelley, M.M., E.W. Zahnow, W.C. Petersen, et al. 1985. Chlorsulfuron determination in soil extracts by enzyme immunoassay. *J. Agric. Food Chem.* 33: 962–965.
273. Schlaeppli, J.M.A., W. Meyer, and K.A. Ramsteiner. 1992. Determination of triasulfuron in soil by monoclonal antibody-based enzyme immunoassay. *J. Agric. Food Chem.* 40: 1093–1098.
274. Simon, E., D. Knopp, P.B. Carrasco, et al. 1998. Development of an enzyme immunoassay for metsulfuron-methyl. *Food Agric. Immunol.* 10: 105–120.
275. Wang, G., J. Yuan, K. Matsumoto, et al. 2001. Homogeneous time-resolved fluoroimmunoassay of bensulfuron-methyl by using terbium fluorescence energy transfer. *Talanta* 55: 1119–1125.
276. Wang, G., J. Yuan, B. Gong, et al. 2001. Immunoassay by graphite furnace atomic absorption spectrometry using a metal chelate as a label. *Anal. Chim. Acta* 448: 165–172.
277. Dzantiev, B.B., E.V. Yazynina, A.V. Zherdev, et al. 2004. Determination of the herbicide chlorsulfuron by amperometric sensor based on separation-free bienzyme immunoassay. *Sens. Actuat. B: Chem.* 98: 254–261.
278. Szekacs, A., N. Trummer, N. Adanyi, et al. 2003. Development of a non-labeled immunosensor for the herbicide trifluralin via optical waveguide lightmode spectroscopic detection. *Anal. Chim. Acta* 487: 31–42.
279. U.S. EPA (Environmental Protection Agency). 2008. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs). Available at <http://www.epa.gov/ppcp/>.
280. OECD, EFPIA. 2005. Pharmaceutical associations of the European countries, VFA. The Pharmaceutical Production Worldwide Report. Available at <http://www.vfa.de/en/articles/index-en.html>.
281. Batt, A.L., I.B. Bruce, and D.S. Aga. 2006. Evaluating the vulnerability of surface waters to antibiotic contamination from varying wastewater treatment plant discharges. *Environ. Pollut.* 142: 295–302.
282. Kelly, L., D.L. Smith, E.L. Snary, et al. 2004. Animal growth promoters: To ban or not to ban? A risk assessment approach. *Int. J. Antimicrob. Agents* 24: 205–212.
283. Centner, T.J. and T.A. Feitshans. 2006. Regulating manure application discharges from concentrated animal feeding operations in the United States. *Environ. Pollut.* 141: 571–573.
284. Halling-Sorensen, B., S. Nors Nielsen, P.F. Lanzky, et al. 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment—A review. *Chemosphere* 36: 357–393.
285. Adanyi, N., M. Varadi, N. Kim, et al. 2006. Development of new immunosensors for determination of contaminants in food. *Curr. Appl. Phys.* 6: 279–286.
286. Fatta, D., A. Achilleos, A. Nikolaou, et al. 2007. Analytical methods for tracing pharmaceutical residues in water and wastewater. *Trends Anal. Chem.* 26: 515–533.
287. Buchberger, W.W. 2007. Novel analytical procedures for screening of drug residues in water, waste water, sediment and sludge. *Anal. Chim. Acta* 593: 129–139.
288. Hock, B. 2002. Immunochemical analysis of water pollutants. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 29: 375–390.
289. Gustavsson, E. and A. Sternesjö. 2004. Biosensor analysis of β -lactams in milk: Comparison with microbiological, immunological, and receptor-based screening methods. *J. AOAC Int.* 87: 614–620.

290. Link, N., W. Weber, and M. Fussenegger. 2007. A novel generic dipstick-based technology for rapid and precise detection of tetracycline, streptogramin and macrolide antibiotics in food samples. *J. Biotechnol.* 128: 668–680.
291. Reybroeck, W., S. Ooghe, H.D. Brabander, et al. 2007. Validation of the tetrasensor honey test kit for the screening of tetracyclines in honey. *J. Agric. Food Chem.* 55: 8359–8366.
292. Salter, R.S., D. Legg, N. Ossanna, et al. 2001. Charm safe-level β -lactam test for amoxicillin, ampicillin, ceftiofur, cephapirin, and penicillin G in raw commingled milk. *J. AOAC Int.* 84: 29–36.
293. Wang, X., K. Li, D. Shi, et al. 2007. Development of an Immunochromatographic lateral-flow test strip for rapid detection of sulfonamides in eggs and chicken muscles. *J. Agric. Food Chem.* 55: 2072–2078.
294. Raich-Montiu, J., J. Folch, R. Compano, et al. 2007. Analysis of trace levels of sulfonamides in surface water and soil samples by liquid chromatography-fluorescence. *J. Chromatogr. A* 1172: 186–193.
295. Tolls, J. 2001. Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: A review. *Environ. Sci. Technol.* 35: 3397–3406.
296. Thiele-Bruhn, S., T. Seibicke, H.R. Schulten, et al. 2004. Sorption of sulfonamide pharmaceutical antibiotics on whole soils and particle-size fractions. *J. Environ. Qual.* 33: 1331–1342.
297. Li, J.-D., Y.-Q. Cai, Y.-L. Shi, et al. 2007. Determination of sulfonamide compounds in sewage and river by mixed hemimicelles solid-phase extraction prior to liquid chromatography-spectrophotometry. *J. Chromatogr. A* 1139: 178–184.
298. Malintan, N.T. and M.A. Mohd. 2006. Determination of sulfonamides in selected Malaysian swine wastewater by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1127: 154–160.
299. Nieto, A., F. Borrull, R.M. Marce, et al. 2007. Selective extraction of sulfonamides, macrolides and other pharmaceuticals from sewage sludge by pressurized liquid extraction. *J. Chromatogr. A* 1174: 125–131.
300. Riediker, S., J.M. Diserens, and R.H. Stadler. 2001. Analysis of β -lactam antibiotics in incurred raw milk by rapid test methods and liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 49: 4171–4176.
301. Spinks, C.A., G.M. Wyatt, S. Everest, et al. 2002. Atypical antibody specificity: Advancing the development of a generic assay for sulphonamides using heterologous ELISA. *J. Sci. Food Agric.* 82: 428–434.
302. Franek, M., I. Diblikova, I. Cernoch, et al. 2006. Broad-specificity immunoassays for sulfonamide detection: Immunochemical strategy for generic antibodies and competitors. *Anal. Chem.* 78: 1559–1567.
303. Zhang, H.Y., L. Wang, Y. Zhang, et al. 2007. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for seven sulfonamide residues and investigation of matrix effects from different food samples. *J. Agric. Food Chem.* 55: 2079–2084.
304. Adrian, J., H. Font, F. Sanchez-Baeza, et al. 2008. Preparation of polyclonal antibodies for the generic determination of sulfonamide antibiotics and development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for milk analysis. *J. Agric. Food Chem.* submitted.
305. Cliquet, P., E. Cox, W. Haasnoot, et al. 2003. Extraction procedure for sulfachloropyridazine in porcine tissues and detection in a sulfonamide-specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Anal. Chim. Acta* 494: 21–28.
306. Font, H., J. Adrian, R. Galve, et al. 2008. Immunochemical assays for direct sulfonamide antibiotic detection in milk and hair samples using antibody derivatized magnetic nanoparticles. *J. Agric. Food Chem.* 56: 736–743.
307. Muldoon, M.T., C.K. Holtzapple, S.S. Deshpande, et al. 2000. Development of a monoclonal antibody-based cELISA for the analysis of sulfadimethoxine. 1. Development and characterization of monoclonal antibodies and molecular modeling studies of antibody recognition. *J. Agric. Food Chem.* 48: 537–544.
308. Pastor-Navarro, N., C. Garcia-Rover, A. Maquieira, et al. 2004. Specific polyclonal-based immunoassays for sulfathiazole. *Anal. Bioanal. Chem.* 379: 1088–1099.
309. Campagnolo, E.R., K.R. Johnson, A. Karpati, et al. 2002. Antimicrobial residues in animal waste and water resources proximal to large-scale swine and poultry feeding operations. *Sci. Total Environ.* 299: 89–95.
310. Yang, S. and K. Carlson. 2004. Routine monitoring of antibiotics in water and wastewater with a radioimmunoassay technique. *Water Res.* 38: 3155–3166.
311. Tschmelak, J., M. Kumpf, G. Proll, et al. 2004. Biosensor for seven sulphonamides in drinking, ground, and surface water with difficult matrices. *Anal. Lett.* 37: 1701–1718.
312. Tschmelak, J., G. Proll, J. Riedt, et al. 2005. Automated water analyser computer supported system (AWACSS): Part II: Intelligent, remote-controlled, cost-effective, on-line, water-monitoring measurement system. *Biosens. Bioelectron.* 20: 1509–1519.
313. Grant, G.A., S.L. Frison, and P. Sporns. 2003. A sensitive method for detection of sulfamethazine and N4-acetylsulfamethazine residues in environmental samples using solid phase immunoextraction coupled with MALDI-TOF MS. *J. Agric. Food Chem.* 51: 5367–5375.

314. Korpimäki, T., E.C. Brockmann, O. Kuronen, et al. 2004. Engineering of a broad specificity antibody for simultaneous detection of 13 sulfonamides at the maximum residue level. *J. Agric. Food Chem.* 52: 40–47.
315. Pastor-Navarro, N., E. Gallego-Iglesias, A. Maquieira, et al. 2007. Development of a group-specific immunoassay for sulfonamides: Application to bee honey analysis. *Talanta* 71: 923–933.
316. Wang, X., K. Li, D. Shi, et al. 2007. Development and validation of an immunochromatographic assay for rapid detection of sulfadiazine in eggs and chickens. *J. Chromatogr. B* 847: 289–295.
317. Zacco, E., J. Adrian, R. Galve, et al. 2007. Electrochemical magneto immunosensing of antibiotic residues in milk. *Biosens. Bioelectron.* 22: 2184–2191.
318. Bratov, A., J. Ramon, N. Abramova, et al. 2008. Three-dimensional interdigitated electrode array as a transducer for label-free biosensors. *Biosens. Bioelectron.* in press.
319. Adrian, J., S. Pasche, H. Font, et al. 2008. Waveguide Interrogated Optical Immunosensor (WIOS) for direct sulfonamide antibiotic detection in milk samples using class-selective antibodies. *Biosens. Bioelectron.* in press.
320. Golet, E.M., A.C. Alder, and W. Giger. 2002. Environmental exposure and risk assessment of fluoroquinolone antibacterial agents in wastewater and river water of the Glatt Valley Watershed, Switzerland. *Environ. Sci. Technol.* 36: 3645–3651.
321. Sukul, P. and M. Spiteller. 2007. Fluoroquinolone antibiotics in the environment. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 191: 131–162.
322. Huet, A.C., C. Charlier, S.A. Tittlemier, et al. 2006. Simultaneous determination of (fluoro)quinolone antibiotics in kidney, marine products, eggs, and muscle by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Agric. Food Chem.* 54: 2822–2827.
323. Wang, Z., Y. Zhu, S. Ding, et al. 2007. Development of a monoclonal antibody-based broad-specificity ELISA for fluoroquinolone antibiotics in foods and molecular modeling studies of cross-reactive compounds. *Anal. Chem.* 79: 4471–4483.
324. Duan, J. and Z. Yuan. 2001. Development of an indirect competitive ELISA for ciprofloxacin residues in food animal edible tissues. *J. Agric. Food Chem.* 49: 1087–1089.
325. Holtzapfel, C.K., S.A. Buckley, and L.H. Stanker. 1999. Immunosorbents coupled on-line with liquid chromatography for the determination of fluoroquinolones in chicken liver. *J. Agric. Food Chem.* 47: 2963–2968.
326. VanCoillie, E., J. DeBlock, and W. Reybroeck. 2004. Development of an indirect competitive ELISA for flumequine residues in raw milk using chicken egg yolk antibodies. *J. Agric. Food Chem.* 52: 4975–4978.
327. Pinacho, D.G., F. Sanchez-Baeza, and M.P. Marco. 2008. Development of a class selective indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of fluoroquinolone antibiotics. *J. Agric. Food Chem.* submitted.
328. Pinacho, D.G., F. Fernández, F. Sanchez-Baeza, et al. 2008. An immunochemical high-throughput screening method for fluoroquinolone antibiotics in milk samples. *Anal. Chim. Acta* submitted.
329. Garifallou, G.Z., G. Tsekenis, F. Davis, et al. 2007. Labelless immunosensor assay for fluoroquinolone antibiotics based upon an AC impedance protocol. *Anal. Lett.* 40: 1412–1422.
330. Pinacho, D.G., K. Gorgy, S. Cosnier, et al. 2008. Electrogeneration of polymer films functionalized by fluoroquinolone models for the development of antibiotic immunosensor. *ITBM-RBM* in press.
331. Pinacho, D.G., F. Sanchez-Baeza, M.P. Marco, et al. 2008. Development of an amperometric magneto immunosensor for detection of fluoroquinolone antibiotics. *J. Agric. Food Chem.* submitted.
332. Ionescu, R.E., N. Jaffrezic-Renault, L. Bouffier, et al. 2007. Impedimetric immunosensor for the specific label free detection of ciprofloxacin antibiotic. *Biosens. Bioelectron.* 23: 549–555.
333. Huys, G., K. Bartie, M. Cnockaert, et al. 2007. Biodiversity of chloramphenicol-resistant mesophilic heterotrophs from southeast Asian aquaculture environments. *Res. Microbiol.* 158: 228–235.
334. Impens, S., W. Reybroeck, J. Vercammen, et al. 2003. Screening and confirmation of chloramphenicol in shrimp tissue using ELISA in combination with GC-MS2 and LC-MS2. *Anal. Chim. Acta* 483: 153–163.
335. Commission of the European Communities. Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002/657/EC) L221/8.
336. Ashwin, H.M., S.L. Stead, J.C. Taylor, et al. 2005. Development and validation of screening and confirmatory methods for the detection of chloramphenicol and chloramphenicol glucuronide using SPR biosensor and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 529: 103–108.
337. Dumont, V., A.C. Huet, I. Traynor, et al. 2006. A surface plasmon resonance biosensor assay for the simultaneous determination of thiamphenicol, florefenicol, florefenicol amine and chloramphenicol residues in shrimps. *Anal. Chim. Acta* 567: 179–183.

338. Ferguson, J., A. Baxter, P. Young, et al. 2005. Detection of chloramphenicol and chloramphenicol glucuronide residues in poultry muscle, honey, prawn and milk using a surface plasmon resonance biosensor and Qflex(R) kit chloramphenicol. *Anal. Chim. Acta* 529: 109–113.
339. Park, I.-S. and N. Kim. 2006. Development of a chemiluminescent immunosensor for chloramphenicol. *Anal. Chim. Acta* 578: 19–24.
340. Scortichini, G., L. Annunziata, M.N. Haouet, et al. 2005. ELISA qualitative screening of chloramphenicol in muscle, eggs, honey and milk: Method validation according to the Commission Decision 2002/657/EC criteria. *Anal. Chim. Acta* 535: 43–48.
341. Zhang, S., Z. Zhang, W. Shi, et al. 2006. Development of a chemiluminescent ELISA for determining chloramphenicol in chicken muscle. *J. Agric. Food Chem.* 54: 5718–5722.
342. Kim, S., P. Eichhorn, J.N. Jensen, et al. 2005. Removal of antibiotics in wastewater: Effect of hydraulic and solid retention times on the fate of tetracycline in the activated sludge process. *Environ. Sci. Technol.* 39: 5816–5823.
343. Nelson, M., W. Hillen, and R.A. Greenwald. 2001. *Tetracyclines in Biology, Chemistry and Medicine*. Birkhäuser: Springer.
344. Hirsch, R., T. Ternes, K. Haberer, et al. 1999. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Sci. Total Environ.* 225: 109–118.
345. Kumar, K., A. Thompson, A.K. Singh, et al. 2004. Enzyme-linked immunosorbent assay for ultratrace determination of antibiotics in aqueous samples. *J. Environ. Qual.* 33: 250–256.
346. Aga, D.S., R. Goldfish, and P. Kulshrestha. 2003. Application of ELISA in determining the fate of tetracyclines in land-applied livestock wastes. *Analyst* 128: 658–662.
347. Aga, D.S., S. O'Connor, S. Ensley, et al. 2005. Determination of the persistence of tetracycline antibiotics and their degradates in manure-amended soil using enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 53: 7165–7171.
348. Meyer, M.T., J.E. Bumgarner, J.L. Varns, et al. 2000. Use of radioimmunoassay as a screen for antibiotics in confined animal feeding operations and confirmation by liquid chromatography/mass spectrometry. *Sci. Total Environ.* 248: 181–187.
349. Pastor-Navarro, N., S. Morais, A. Maquieira, et al. 2007. Synthesis of haptens and development of a sensitive immunoassay for tetracycline residues: Application to honey samples. *Anal. Chim. Acta* 594: 211–218.
350. Beausse, J. 2004. Selected drugs in solid matrices: A review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances. *Trends Anal. Chem.* 23: 753–761.
351. Li, D., M. Yang, J. Hu, et al. 2008. Determination of penicillin G and its degradation products in a penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river. *Water Res.* 42: 307–317.
352. Gaudin, V., J. Fontaine, and P. Maris. 2001. Screening of penicillin residues in milk by a surface plasmon resonance-based biosensor assay: Comparison of chemical and enzymatic sample pre-treatment. *Anal. Chim. Acta* 436: 191–198.
353. Gustavsson, E., J. Degelaen, P. Bjurling, et al. 2004. Determination of β -lactams in milk using a surface plasmon resonance-based biosensor. *J. Agric. Food Chem.* 52: 2791–2796.
354. Benito-Pena, E., M.C. Moreno-Bondi, G. Orellana, et al. 2005. Development of a novel and automated fluorescent immunoassay for the analysis of β -lactam antibiotics. *J. Agric. Food Chem.* 53: 6635–6642.
355. Yang, S. and K.H. Carlson. 2004. Solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-ion trap mass spectrometry for analysis of trace concentrations of macrolide antibiotics in natural and waste water matrices. *J. Chromatogr. A* 1038: 141–155.
356. Situ, C. and C.T. Elliott. 2005. Simultaneous and rapid detection of five banned antibiotic growth promoters by immunoassay. *Anal. Chim. Acta* 529: 89–96.
357. Deng, A., M. Himmelsbach, Q.Z. Zhu, et al. 2003. Residue analysis of the pharmaceutical diclofenac in different water types using ELISA and GC-MS. *Environ. Sci. Technol.* 37: 3422–3429.
358. Huo, S.-M., H. Yang, and A.-P. Deng. 2007. Development and validation of a highly sensitive ELISA for the determination of pharmaceutical indomethacin in water samples. *Talanta* 73: 380–386.
359. Liu, W., C. Zhao, Y. Zhang, et al. 2007. Preparation of polyclonal antibodies to a derivative of 1-aminohydantoin (AHD) and development of an indirect competitive ELISA for the detection of nitrofurantoin residue in water. *J. Agric. Food Chem.* 55: 6829–6834.
360. Sheikh, S.H. and A. Mulchandani. 2001. Continuous-flow fluoro-immunosensor for paclitaxel measurement. *Biosens. Bioelectron.* 16: 647–652.
361. Medina, M.B. 2004. Development of a fluorescent latex immunoassay for detection of a spectinomycin antibiotic. *J. Agric. Food Chem.* 52: 3231–3236.

362. Kuster, M., M. Jose Lopez de Alda, and D. Barcelo. 2004. Analysis and distribution of estrogens and progestogens in sewage sludge, soils and sediments. *Trends Anal. Chem.* 23: 790–798.
363. Desbrow, C., E.J. Routledge, G.C. Brighty, et al. 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environ. Sci. Technol.* 32: 1549–1558.
364. Käppel, N.D., F. Proll, and G. Gauglitz. 2007. Development of a TIRF-based biosensor for sensitive detection of progesterone in bovine milk. *Biosens. Bioelectron.* 22: 2295–2300.
365. Lu, H., G. Conneely, M.A. Crowe, et al. 2006. Screening for testosterone, methyltestosterone, 19-nortestosterone residues and their metabolites in bovine urine with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Anal. Chim. Acta* 570: 116–123.
366. Hansen, P.D., H. Dizer, B. Hock, et al. 1998. Vitellogenin—a biomarker for endocrine disruptors. *Trends Anal. Chem.* 17: 448–451.
367. Pelissero, C., G. Flouriot, J.L. Foucher, et al. 1993. Vitellogenin synthesis in cultured hepatocytes; an in vitro test for the estrogenic potency of chemicals. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 44: 263–272.
368. Purdom, C.E., P.A. Hardiman, V.V.J. Bye, et al. 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem. Ecology* 8: 275–285.
369. Zhao, L., J.-M. Lin, Z. Li, et al. 2006. Development of a highly sensitive, second antibody format chemiluminescence enzyme immunoassay for the determination of 17[beta]-estradiol in wastewater. *Anal. Chim. Acta* 558: 290–295.
370. Farré, M. 2006. Evaluation of commercial immunoassays for the detection of estrogens in water by comparison with high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry HPLC–MS/MS (QqQ). *Anal. Bioanal. Chem.* 385: 1001.
371. Coille, I., S. Reder, S. Bucher, et al. 2002. Comparison of two fluorescence immunoassay methods for the detection of endocrine disrupting chemicals in water. *Biomol. Eng.* 18: 273–280.
372. Zhang, W.-W., Y.-C. Chen, Z.-F. Luo, et al. 2007. Analysis of 17[beta]-estradiol from sewage in coastal marine environment by surface plasmon resonance technique. *Chem. Res. Chinese Univers.* 23: 404–407.
373. Kazlauskas, R. 2000. Drugs in sports: Analytical trends. *Ther. Drug Monit.* 22: 103–109.
374. Ueki, M. and M. Okano. 1999. Doping with naturally occurring steroids. *J. Toxicol. Toxin. Rev.* 18: 177–195.
375. Tschmelak, J., M. Kumpf, N. Kappel, et al. 2006. Total internal reflectance fluorescence (TIRF) biosensor for environmental monitoring of testosterone with commercially available immunochemistry: Antibody characterization, assay development and real sample measurements. *Talanta* 69: 343–350.
376. Degand, G., P. Schmitz, and G. Maghuin-Rogister. 1989. Enzyme immunoassay screening procedure for the synthetic anabolic estrogens and androgens diethylstilbestrol, nortestosterone, methyltestosterone and trenbolone in bovine urine. *J. Chromatogr. B* 489: 235–243.
377. Salvador, J.P., F. Sanchez-Baeza, and M.P. Marco 2007. Preparation of antibodies for the designer steroid tetrahydrogestrinone and development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for human urine analysis. *Anal. Chem.* 79: 3734–3740.
378. Salvador, J.P., F. Sanchez-Baeza, and M.P. Marco. 2008. Simultaneous immunochemical detection of stanozolol and the main human metabolite, 3'-hydroxy-stanozolol, in urine and serum samples. *Anal. Biochem.* 376: 221–228.
379. Tang, P.W., D.L. Crone, C.S. Chu, et al. 1993. Measuring the nandrolone threshold ratio by enzyme-linked immunosorbent assay for 5[alpha]-estrane-3[beta],17[alpha]-diol. *Anal. Chim. Acta* 275: 139–146.
380. Conneely, G., M. Aherne, H. Lu, et al. 2007. Electrochemical immunosensors for the detection of 19-nortestosterone and methyltestosterone in bovine urine. *Sens. Actuat. B: Chem.* 121: 103–112.
381. Conneely, G., M. Aherne, H. Lu, et al. 2007. Development of an immunosensor for the detection of testosterone in bovine urine. *Anal. Chim. Acta* 583: 153–160.
382. Lu, H., G. Conneely, M. Pravda, et al. 2006. Screening of boldenone and methylboldenone in bovine urine using disposable electrochemical immunosensors. *Steroids* 71: 760–767.
383. Corrie, J.E.T., W.A. Ratcliffe, and J.S. Macpherson. 1981. Generally applicable 125 iodine-based radioimmunoassays for plasma progesterone. *Steroids* 38: 709–717.
384. Elder, P.A., K.H.J. Yeo, J.G. Lewis, et al. 1987. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for plasma progesterone: Immobilised antigen approach. *Clin. Chim. Acta* 162: 199–206.
385. Kohen, F., J.B. Kim, H.R. Lindner, et al. 1981. Development of a solid-phase chemiluminescence immunoassay for plasma progesterone. *Steroids* 38: 73–88.

386. Aherne, G.W., J. English, and V. Marks. 1985. The role of immunoassay in the analysis of microcontaminants in water samples. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 9: 79–83.
387. Carralero, V., A. Gonzalez-Cortes, P. Yanez-Sedeno, et al. 2007. Nanostructured progesterone immunosensor using a tyrosinase-colloidal gold-graphite-Teflon biosensor as amperometric transducer. *Anal. Chim. Acta* 596: 86–91.
388. Roberts, C.J. and L.S. Jackson. 1995. Development of an ELISA using a universal method of enzyme-labelling drug-specific antibodies Part I: Detection of dexamethasone in equine urine. *J. Immunol. Methods* 181: 157–166.
389. Anfossi, L., C. Tozzi, C. Giovannoli, et al. 2002. Development of a non-competitive immunoassay for cortisol and its application to the analysis of saliva. *Anal. Chim. Acta* 468: 315–321.
390. Pujos, E. 2005. Comparison of the analysis of corticosteroids using different techniques. *Anal. Bioanal. Chem.* 381: 244–254.
391. Brambilla, G., M. Fiori, and E. Pierdominici. 1998. A possible correlation between the blood leukocyte formula and the use of glucocorticoids as growth promoters in beef cattle. *Veterin. Res. Commun.* 22: 457–465.
392. Delahaut, P., P. Jacquemin, Y. Colemonts, et al. 1997. Quantitative determination of several synthetic corticosteroids by gas chromatography-mass spectrometry after purification by immunoaffinity chromatography. *J. Chromatogr. B* 696: 203–215.
393. Brunn, H. 1994. Identification and quantification of dexamethasone and related xenobiotic corticosteroids in cattle urine with ELISA and HPLC/ELISA. *Archiv Lebensmittelhyg* 45: 96.
394. Sanchez-Martinez, M.L., M.P. Aguilar-Caballos, S.A. Eremin, et al. 2007. Long-wavelength fluorescence polarization immunoassay for surfactant determination. *Talanta* 72: 243–248.
395. Carlson, L., B. Holmquist, R. Ladd, et al. 1996. Immunoassay for mercury in seafood and animal tissues. In: R.C. Beier and L.H. Stanker (eds), *Immunoassays for Residue Analysis*, pp. 388–394. Oxford: Oxford University Press.
396. Abad, A., M.J. Moreno, and A. Montoya. 1999. Development of monoclonal antibody-based immunoassays to the *N*-methylcarbamate pesticide carbofuran. *J. Agric. Food Chem.* 47: 2475–2485.
397. Mauriz, E., A. Calle, J.J. Manclus, et al. 2006. Single and multi-analyte surface plasmon resonance assays for simultaneous detection of cholinesterase inhibiting pesticides. *Sens. Actuat. B: Chem.* 118: 399–407.
398. Lee, H.J., G. Shan, T. Watanabe, et al. 2002. Enzyme-linked immunosorbent assay for the pyrethroid deltamethrin. *J. Agric. Food Chem.* 50: 5526–5532.
399. Lee, N.J., H.L. Beasley, S.W.L. Kimber, et al. 1997. Application of immunoassays to studies of the environmental fate of endosulfan. *J. Agric. Food Chem.* 45: 4147–4155.
400. Shan, G.M., D.W. Stoutamire, I. Wengatz, et al. 1999. Development of an immunoassay for the pyrethroid insecticide esfenvalerate. *J. Agric. Food Chem.* 47: 2145–2155.
401. Garrett, S.D., D.J.A. Appleford, G.M. Wyatt, et al. 1997. Production of a recombinant anti-parathion antibody (scFv); stability in methanolic food extracts and comparison to an anti-parathion monoclonal antibody. *J. Agric. Food Chem.* 45: 4183–4189.
402. Watanabe, E., Y. Kanzaki, H. Tokumoto, et al. 2002. Enzyme-linked immunosorbent assay based on a polyclonal antibody for the detection of the insecticide fenitrothion. Evaluation of antiserum and application to the analysis of water samples. *J. Agric. Food Chem.* 50: 53–58.
403. Kim, Y.J., Y.A. Kim, Y.T. Lee, et al. 2007. Enzyme-linked immunosorbent assays for the insecticide fenitrothion—influence of hapten conformation and sample matrix on assay performance. *Anal. Chim. Acta* 591: 183–190.
404. Cho, Y.A., Y.J. Kim, B.D. Hammock, et al. 2003. Development of a microtiter plate ELISA and a dipstick ELISA for the determination of the organophosphorus insecticide fenthion. *J. Agric. Food Chem.* 51: 7854–7860.
405. Nakata, M., A. Fukushima, and H. Ohkawa. 2001. A monoclonal antibody-based ELISA for the analysis of the insecticide flucythrinate in environmental and crop samples. *Pest. Manage. Sci.* 57: 269–277.
406. Vera-Avila, L.E., J.C. Vazquez-Lira, M.G. De Llasera, et al. 2005. Sol-gel immunosorbents doped with polyclonal antibodies for the selective extraction of malathion and triazines from aqueous samples. *Environ. Sci. Technol.* 39: 5421–5426.
407. Alcocer, M.J.C., P.P. Dillon, B.M. Manning, et al. 2000. Use of phosphonic acid as a generic hapten in the production of broad specificity anti-organophosphate pesticide antibody. *J. Agric. Food Chem.* 48: 2228–2233.
408. Hennion, M.-C. and D. Barceló. 1998. Strengths and limitations of immunoassays for effective and efficient use for pesticide analysis in water samples: A review. *Anal. Chim. Acta* 362: 3–34.

409. Liu, S.H., L. Wang, and L.H. Wei. 2005. Studies on the immunoassay for triazophos. *Chin. J. Anal. Chem.* 33: 1697–1700.
410. Gui, W.J., R.Y. Jin, Z.L. Chen, et al. 2006. Hapten synthesis for enzyme-linked immunoassay of the insecticide triazophos. *Anal. Biochem.* 357: 9–14.
411. Karu, A.E., R.O. Harrison, D.J. Schmidt, et al. 1991. Monoclonal immunoassay of triazine herbicides—development and implementation. *ACS Symp. Ser.* 451: 59–77.
412. Bushway, R.J., L.B. Perkins, L. Fukal, et al. 1991. Comparison of enzyme-linked-immunosorbent-assay and high-performance liquid-chromatography for the analysis of atrazine in water from Czechoslovakia. *Archiv. Environ. Contam. Toxicol.* 21: 365–370.
413. Gascon, J., A. Oubina, B. Ballesteros, et al. 1997. Development of a highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for atrazine—performance evaluation by flow injection immunoassay. *Anal. Chim. Acta* 347: 149–162.
414. Wortberg, M., M.H. Goodrow, S.J. Gee, et al. 1996. Immunoassay for simazine and atrazine with low cross-reactivity for propazine. *J. Agric. Food Chem.* 44: 2210–2219.
415. Winklmair, M., M.G. Weller, J. Mangler, et al. 1997. Development of a highly sensitive enzyme-immunoassay for the determination of triazine herbicides. *Fresenius J. Anal. Chem.* 358: 614–622.
416. Brena, B.M., L. Arellano, C. Rufo, et al. 2005. ELISA as an affordable methodology for monitoring ground-water contamination by pesticides in low-income countries. *Environ. Sci. Technol.* 39: 3896–3903.
417. Schneider, P. and B.D. Hammock. 1992. Influence of the ELISA format and the hapten enzyme conjugate on the sensitivity of an immunoassay for S-triazine herbicides using monoclonal-antibodies. *J. Agric. Food Chem.* 40: 525–530.
418. Gascon, J., E. Martinez, and D. Barcelo. 1995. Determination of atrazine and alachlor in natural-waters by a rapid-magnetic particle-based elisa—influence of common cross-reactants—deethylatrazine, deisopropylatrazine, simazine and metolachlor. *Anal. Chim. Acta* 311: 357–364.
419. Kramer, P. and R. Schmid. 1991. Flow-Injection Immunoanalysis (FIIA)—a new immunoassay format for the determination of pesticides in water. *Biosens. Bioelectron.* 6: 239–243.
420. Klotz, A., A. Brecht, C. Barzen, et al. 1998. Immunofluorescence sensor for water analysis. *Sens. Actuat. B: Chem.* 51: 181–187.
421. Tudorache, M., M. Co, H. Lifgren, et al. 2005. Ultrasensitive magnetic particle-based immunosupported liquid membrane assay. *Anal. Chem.* 77: 7156–7162.
422. Hegedus, G., I. Belai, and A. Szekacs. 2000. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the herbicide trifluralin. *Anal. Chim. Acta* 421: 121–133.
423. Shen, J., Z. Zhang, Y. Yao, et al. 2006. A monoclonal antibody-based time-resolved fluoroimmunoassay for chloramphenicol in shrimp and chicken muscle. *Anal. Chim. Acta* 575: 262–266.
424. Rodriguez-Mozaz, S., M.J.L. de Alda, and D. Barcelo. 2006. Fast and simultaneous monitoring of organic pollutants in a drinking water treatment plant by a multi-analyte biosensor followed by LC-MS validation. *Talanta* 69: 377–384.

Capítol 2: Biosensors for Pharmaceuticals and Emerging Contaminants Based on Novel Micro and Nanotechnology Approaches. J. Adrián, F. Fernández, A. Muriano, R. Obregon, J. Ramón-Azcon, N. Tort and M.P. Marco. *The Handbook of Environmental Chemistry, Biosensors for environmental Monitoring.* 2009, Springer, Vol 5J, p 47-68.

Resum: Aquest capítol pretén proporcionar una visió general dels últims avenços en micro(nano)tecnologia pel desenvolupament de biosensors adequats per a l'anàlisi de contaminants emergents. La investigació de nous principis de transducció per a la detecció de processos de reconeixement molecular ha creat una gran expectació en diferents sectors industrials (salut, cosmètica, alimentació, agricultura, etc.). La combinació d'aquests nous principis amb el potencial de les tècniques immunoquímiques, ha permès desenvolupar biosensors novedosos que proporcionen avantatges respecte als mètodes tradicionals d'anàlisi, tals com, la possibilitat de multidetecció, el desenvolupament de sistemes d'anàlisi de camp i la fabricació de dispositius fàcils d'utilitzar. Concretament, s'ha invertit molt d'esforç en el control de residus de fàrmacs en aliments i en mostres mediambientals, com a indicadors de l'impacte de l'ésser humà en el medi. Els fàrmacs emprats en medicina humana i veterinària, com antibiòtics, hormones o analgèsics, presenten un elevat risc d'ocasionar efectes negatius en la salut pública i mediambiental. Es per això, que es necessiten eines de diagnòstic efectives, per poder realitzar una detecció ràpida i fiable d'aquests compostos.

Biosensors for Pharmaceuticals and Emerging Contaminants Based on Novel Micro and Nanotechnology Approaches

Javier Adrián, Fátima Fernández, Alejandro Muriano, Raquel Obregon, Javier Ramón-Azcon, Nuria Tort, and M.-Pilar Marco

Abstract The investigation of new sensing principles and technologies for the detection of molecular binding events has created great expectations on numerous major industrial sectors, such as healthcare, food, water and agriculture. Combining many of these advances with the potential of the immunochemical systems has allowed developing novel biosensors that provide interesting advantages against the traditional strategies for analysis, such as the possibility of multianalysis, development of field analytical methods and fabrication of easy end-user devices. Specifically, many efforts have been lately invested to control residues of pharmaceuticals in food and environmental samples, as an indication of the impact of the human activity in the media. Human and veterinary drugs, such as antibiotics, hormones, analgesics, cytostatics or β -blockers, show a high potential risk of negative effects in the environment and public health. Thus, there is a great need for low-cost and highly efficient tools for quick, reliable, and accurate detection of these contaminating bioactive agents. In particular, the scope of the present chapter is addressed to provide an overview of the potential of novel micro(nano)technology approaches to develop biosensors useful for the analysis of emerging pollutants.

Keywords Amperometric biosensor, Antibody, Antibiotics, Biosensor, Evanescent wave, Hormones, Impedimetric biosensor, Microcantilevers, Nanobiotechnology, Pesticides, Piezoelectric crystal, Plasmon resonance

J. Adrián, F. Fernández, A. Muriano, R. Obregon, J. Ramón-Azcon,
N. Tort, and M.-P. Marco (✉)

Applied Molecular Receptors Group (AMRg), IQAC-CSIC, Networking Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Jordi Girona, 18-26, 08034, Barcelona, Spain
e-mail: mpmqob@iiqab.csic.es

Contents

1	Introduction.....	48
2	Electrochemical Biosensors.....	50
	2.1 Amperometric Biosensors.....	51
	2.2 Impedimetric Biosensors.....	54
3	Optical Biosensors.....	56
	3.1 Biosensors Based on the Evanescent Wave Optical Principle.....	57
	3.2 Plasmon Resonance Biosensors.....	59
	3.3 Nanomechanical Biosensors.....	62
4	Piezoelectric Immunosensors.....	63
5	Conclusions.....	64
	References.....	64

1 Introduction

Biomolecular analytical devices have evolved rapidly over the last years. Novel molecular diagnostic approaches to refine and extend the limits of detection have emerged as a consequence of the combination of micro(nano)technological and biotechnological advances. Biosensors are among the potential applications of new materials and devices and of novel nanobiotechnological approaches. Thus, subtle changes in properties such as the dielectric field or the refractive index produced after biomolecular recognition events can be detected if they are taking place at the surface of appropriately developed transducers. New knowledge of the unique properties of nanostructured materials has opened up the possibility to investigate the influence that biorecognition phenomena have on the new optical and/or electrical properties of these systems, possibly leading to the development of more sensitive and flexible biosensing systems.

Among biosensors, immunosensors using antibodies as biorecognition elements have fascinating features such as the possibility to respond selectively to biological or bioactive substances and the capability to respond in a physiological manner. The unique properties of certain nanomaterials combined with the excellent features of the antibodies allow envisaging novel exquisitely sensitive chemical and biological sensors. Thus, antibodies are natural molecules with inherent capabilities to specifically react with their counter antigen. Antibodies can be produced, in principle, against all kinds of substances and their features can be tailored according to the requirements of each application. Their homogeneity regarding chemical structure and properties allow standardization of several procedures. Moreover, antibodies show greater improved stability, when compared to other biomolecules.

A very important aspect in biosensor development is the construction of biofunctional surfaces. Sensor solid surfaces are in general solid inorganic matter and per se not suitable for immobilizing biomolecules. Hence, further modification is required to adapt them for the immobilization of biomolecules. In addition, functional sensor surfaces place several demands such as biocompatibility, homogeneity, stability, specificity, and functionality. Thus, a challenge in biosensor development

is to construct adequate surfaces as well as to design molecules suitable for site-directed immobilization. Surface architecture depends on the nature of the transducer and on the features of the biomolecule, as well as the type of measurements needed [1–4]. The surface has to be activated appropriately for further tethering of the proteins with a particular immobilization method. Subsequent layers can be generated in place, and textured following specific demands.

Environmental monitoring of chemical and biological hazard is a potential application of biosensors, and therefore several developments can be found in the literature trying to provide better analytical tools to assess any risk derived from contamination. This interest in developing more efficient bioanalytical devices responds to the increasing production of these chemicals, including so-called emerging contaminants such as pharmaceutical active ingredients and personal care products (PPCPs) [5] and the potential toxicological risks derived from them. Pharmaceuticals and biogenic hormones are normally discharged to the environment through wastewater treatment plants (WWTP), which are often not designed to remove them from the effluent. From there on, transport, fate, or possible adverse consequences of these pollutants on human health and on the ecosystem, are frequently unknown or not clearly understood [6]. Potential concerns include reproductive impairment [7–9], increased incidence of cancer [10], development of antibiotic-resistant bacteria [11], or the potential increased toxicity of chemical mixtures due to synergistic effects [12].

In Europe, regulations and regulatory methods to assess and control the impact of these substances in the aquatic environment, aim to protect the ecosystem and public health while monitoring contamination levels and any potential negative effects. In addition to the REACH (Registration, Evaluation, Authorization, and Restriction of Chemicals) law (EC 1907/2006), regarding chemicals and their safe use, which entered into force on 1st June 2007, there are specific regulations addressed to protect health and ensure quality of all water resources such as the Drinking Water Directive (DWD, Council Directive 98/83/EC), the Bathing Water Directive (2006/7/EC), and the Urban Waste Water Directives (91/271/EEC and 98/15/EC). Moreover, the Water Framework Directive (WFD, 2000/60/EC) intends to provide an overall framework for a cleaner and safer water ecosystem, particularly regarding surface freshwater and ground water bodies (i.e., lakes, streams, rivers, estuaries, coastal waters etc.). Thus, consistent with this directive, the Marine Strategy Framework Directive (2008/56/EC) aims to achieve good environmental status of the EU's marine waters by 2021. Similarly, a River Basin Management Plan (RBMP) is being developed to be implemented for each river basin district which must include knowledge of the particular pressures and impacts of human activity, protection programs, controls, and remediation measures. The first RBMP is scheduled to be published at the end of 2009 and according to it the new Groundwater Directive (2006/118/EC) establishes a regime which sets underground water quality standards and introduces measures to prevent or limit input of pollutants into the groundwater.

On the other hand, pharmaceutical residues can also contaminate food through animal treatment with veterinary drugs. During their lifetime animals may have to be treated with medicines for prevention or cure of diseases. In food-producing

animals such as cattle, pigs, poultry, and fish this may lead to residues of the substances used for the treatment in the food products derived from these animals (e.g., meat, milk, eggs). The residues should, however, not be harmful to the consumer, for which reason EC legislation requires that the toxicity of potential residues is evaluated before use of a medicinal substance in food-producing animals is authorized. If considered necessary, maximum residue limits (MRLs) are established and in some cases the use of the relevant substance is prohibited. Thus, Directive 96/23/EC establishes the frequencies and level of sampling and the groups of substances to be controlled for each food commodity. Moreover, Commission Decision 2002/657/EC (and the following amending directives) establishes criteria and procedures for the validation of analytical methods to ensure the quality and comparability of analytical results generated by official laboratories. Additionally, the Decision introduces a procedure to progressively establish minimum required performance limits (MRPL) for analytical methods employed to detect substances for which no permitted limit (maximum limit) has been established, such as hormones.

Pharmaceuticals are by definition very active substances and therefore there is an increased demand for new and more efficient analytical methods in order to protect ecosystems and public health. Herein we aim to illustrate this with examples of recent developments of new biosensor devices reported to detect certain emerging pollutants, antibiotics, and androgenic anabolic steroids. The physical principles and micro/nanotechnological approaches behind the examples presented herein should be contemplated as universal and with general applicability to the analysis of other chemical or biological hazards as soon as a bioreceptor is available to specifically detect these substances.

2 Electrochemical Biosensors

Because of its simplicity electrochemical transduction has given rise to a great variety of low-cost devices based on different formats and configurations (for recent reviews see [13–16, 17]). From all possible electrochemical transduction systems those based on recording the amperometric signal generated after an enzymatic reaction have seen the greatest development [16]. However, new approaches have been described aimed at directly detecting biomolecular recognition reactions without using enzyme labels, such as the impedimetric devices, or incorporating nanoparticles to generate or increase the electrochemical signal. As an example, gold nanoparticles that provide a suitable microenvironment for biomolecule immobilization whilst retaining biological activity, and to facilitate electron transfer between the immobilized proteins and electrode surfaces, have led to an intensive use of this nanomaterial for the construction of electrochemical biosensors with enhanced analytical performance with respect to other biosensor designs [13, 15]. Similarly, the particular structure of carbon nanotubes and their unique properties make them a very attractive material for the design of electrochemical biosensors. Among the potential advantages are the promotion of different electron transfer reactions, especially those related to

biomolecules and the increase of the active surfaces which has led to different strategies for constructing carbon nanotube-based electrochemical sensors [14].

2.1 Amperometric Biosensors

Amperometric biosensors are based on the measurement of the current generated by oxidation/reduction of redox species at the electrode surface, which is maintained at an appropriate electric potential. The current observed has a linear relationship with the concentration of the electroactive species. The electrode is usually constructed of platinum, gold, or carbon. Adjacent to the electrode, entrapped by a membrane or directly immobilized, the bioreceptor is placed. Label enzymes used in electrochemical immunoassays are usually oxidoreductases such as horseradish peroxidase (HRP), or hydrolytic enzymes, such as alkaline phosphatase (AP), which yield electroactive species as a product of the enzymatic reaction (see Fig. 2). Other enzymes used as sensing elements for environmental monitoring are tyrosinase, laccase, aldehyde dehydrogenase, etc. Sometimes the substrate or the product of the enzymatic reaction can be monitored amperometrically, without the need for a mediator. These electrodes are called *unmediated amperometric enzyme biosensors*. However, a number of factors must be taken into account when assessing the suitability of an enzyme substrate to be used in an electrochemical detection system: the electrochemistry of the substrate, the electrochemistry of the product of the enzymatic reaction, the medium in which the measurements will be performed, and the electrochemistry of endogenous materials in the test sample. A problem often encountered with unmediated sensors is that other species present in the samples being analyzed are also electroactive at the potential applied. For example ascorbic acid and uric acid, present in many biological samples, are oxidized at an anodic potential of +0.35 V. AP combined with *p*-aminophenyl phosphate (PAPP) as a substrate has been shown to be a good alternative when measuring with such a system. Although *p*-aminophenyl phosphate has an irreversible wave in cyclic voltammetry at around 0.45 V vs. Ag/AgCl, its hydrolysis product *p*-aminophenol (PAP) shows a reversible electrochemistry with a half wave potential of -0.065 V vs. Ag/AgCl. Consequently, measurements on biological matrices can take place at lower potentials avoiding interference of endogenous compounds. Choosing an alternative electron transfer acceptor can also circumvent these problems. Usually the *mediator* is a species of low molecular weight (MW) that shuttles electrons between the redox center of the enzyme and the working electrode. These sensors are called *mediated amperometric enzyme biosensors*. A mediator should react rapidly with the enzyme, exhibit reversible heterogeneous kinetics, possess a low overpotential for regeneration, and be stable at a certain range of pH, temperature, redox state, and dioxygen. Some mediators frequently used are I⁻, [Fe(CN)₆]⁴⁻, *o*-phenylenediamine, diaminobenzidine, hydroquinone, and 5-aminosalicylic acid.

A recent example has been reported to detect xenoestrogens using an amperometric immunosensor based on a quinoprotein glucose dehydrogenase (GDH)-modified

thick-film sensor. The immunosensor is used to detect the tracer used in a capillary immunoassay (CIA) [18]. With this configuration, detection of the alkylphenols and their ethoxylates in $\mu\text{g L}^{-1}$ range is possible using a β -galactosidase tracer and anti alkylphenol ethoxylate antibodies. The assay is performed off-line in small disposable PVC capillaries coated with immobilized antibodies, which allows the combination of the assay with a small portable device potentially useful for on-site environmental monitoring. The bioelectrocatalytic properties of this biosensor offer an additional amplification and allow a very sensitive quantification of the 4-aminophenol, generated by the β -galactosidase. However, in the last few years, the advances and possibilities presented by easily fabricated screen-printed electrodes (SPEs) has given rise to a significant number of examples demonstrating the potential and the flexibility of this technology to develop low-cost biosensor devices for a variety of targets including microorganisms, pesticides, and also pharmaceuticals. As an example, disposable carbon SPE immunosensors have been described for the detection of anabolic androgenic steroids (AAS) using horseradish peroxidase as the enzyme label and tetramethylbenzidine/hydrogen peroxide (TMB/ H_2O_2) as the substrate for chronoamperometric detection at +100 mV [19–21]. The immunosensors were fabricated by immobilizing hapten-bovine serum albumin conjugates on the surface of the SPEs and followed by the competition between the free analyte and coating conjugate with corresponding antibodies. The signal is recorded after an anti IgG-HRP conjugate determining the degree of competition. By using different antibodies with different affinities and cross-reactivity patterns the immunosensor detects different AAS with limits of detection (LOD) below 200 pg mL^{-1} . Thus, LODs of $30.9 \pm 4.3 \text{ pg mL}^{-1}$ for boldenone and $120.2 \pm 8.2 \text{ pg mL}^{-1}$ for methylboldenone, respectively, have been reported. Testosterone can be detected in buffer with a LOD of 26 and 1.8 pg mL^{-1} in a complex matrix such as bovine urine. Similarly, nortestosterone can be detected in the same matrix with a LOD of 15 pg mL^{-1} .

The possibility to analyze progesterone using amperometric immunosensors has been recently reported using a colloidal gold-graphite-Teflon-tyrosinase composite biosensor as the amperometric transducer [22]. A sequential competitive configuration between the analyte and progesterone labeled with alkaline phosphatase was selected using in this case phenyl phosphate as the AP-substrate and the enzyme reaction product, phenol, was oxidized by tyrosinase to o-quinone, which was subsequently reduced at -0.1 V at the biocomposite electrode. A LOD of 0.43 ng mL^{-1} was accomplished while the time needed to reach the steady-state current from the addition of phenyl phosphate was 30–40 s. A lifetime of 14 days with no need to apply any regeneration procedure was reported. The immunosensor was applied to the detection of progesterone in milk spiked after just sample dilution.

Recently, several papers have been published combining magnetic particles with electrochemical amperometric detection. Magnetic beads are known to be a powerful and versatile tool in a variety of analytical and biotechnology applications. The use of magnetic beads greatly improves the performance of the immunological reaction, minimizing the matrix effect due to improved washing and separation steps. Additionally, the magnetic beads can be easily magnetically manipulated by using permanent magnets or electromagnets. Therefore, the analysis of samples performed

on magnetic beads can be easily achieved without any pre-enrichment, purification, or pretreatment steps, which are normally necessary for standard methods. In this context, an electrochemical immunosensing strategy based on magnetic sensors is presented as a sensitive, simple, cheap, and user-friendly analytical alternative to classical methods for the detection of residues. The strategy combines the advantages taken from immunological assays, magnetic bead separation, and electrochemical transduction and is based on the immunochemical competitive immunoreactions between the contaminant and the enzyme tracer with the specific antibody immobilized on magnetic beads followed by its separation from the biological matrix by the use of a magnetic field. Thus, after the immunological reaction, the magnetic beads can be easily captured by a novel electrochemical and magnetic transducer, based on a magneto graphite-epoxy composite [12, 13] (m-GEC), by merely dipping the magneto electrode in the solution where the beads are suspended (Fig. 1). This strategy has been used for the detection of sulfonamide antibiotics in milk samples [23]. The antibodies raised to provide an appropriate recognition pattern of this antibiotic family [24] are immobilized on the surface of magnetic beads through covalent attachment using tosyl-activated commercially available magnetic beads. Other immobilization strategies tested before also gave suitable results, but this strategy was demonstrated to be the one providing the best performance [25]. The immunological reaction for the detection of sulfonamide antibiotics is based on a direct competitive assay using a peroxidase (HRP) tracer as the enzymatic label. Excellent results were accomplished detecting sulfamethazine directly in a diluted raw full cream sample with detectability values far below the MRLs established by the EC in those types of samples (IC₅₀ of 9.8 $\mu\text{g L}^{-1}$ and LOD of 0.36 $\mu\text{g L}^{-1}$). The same results were obtained with UHT (ultra high temperature) milk, such as full cream (about 3.25% fat), semi-skimmed (about 1.5–1.8% fat), and

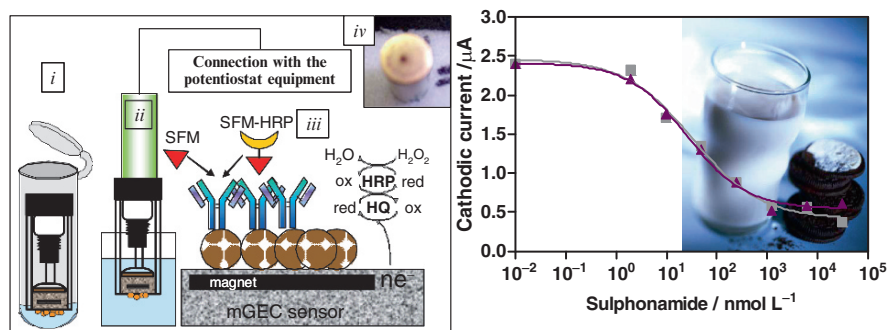


Fig. 1 Left: Schematic representation of the electrochemical magnetoimmunosensing strategy for the detection of sulfonamides. After the immunoreaction, the antibody-modified magnetic beads were captured for the m-GEC electrode (i). Chemical reactions occurring at the m-GEC surface polarized at -0.150 V (vs. Ag/AgCl) upon the addition of H_2O_2 in the presence of mediator (HQ) (ii and iii). Appearance of the m-GEC electrode covered with the magnetic beads (iv). Right: Calibration curves for sulfapyridine run in PBS and in 1:5 whole milk. Parts of this figure are reprinted from Zacco et al. [23] with permission from Elsevier

skimmed (0.1% fat). This strategy has been proven to be useful for the analysis of other residues in complex matrices such as atrazine in orange juice [25] or fluoroquinolone antibiotics in milk (unpublished results).

The same strategy has also been applied to the detection of polychlorinated biphenyls (PCBs) though in this case using SPEs [26, 27]. The sensor was based on a direct competitive immunoassay scheme in which antibody-coated magnetic beads were used on SPEs to detect the product of the enzymatic reaction of alkaline phosphatase used as the tracer. α -Naphthyl phosphate was used as the substrate and the α -naphthol produced during the enzymatic reaction was detected using differential pulse voltametry (DPV). Aroclor 1248 PCB mixture could be measured with a detection limit of 0.4 ng mL^{-1} . The performance of the sensor was demonstrated analyzing PCBs on marine sediment extracts and spiked soil samples.

2.2 Impedimetric Biosensors

Different sensor approaches have been accomplished to avoid the use of labels when the target analyte is a biomacromolecule, bacteria, or virus, but only on a few occasions has the performance of these transduction principles been demonstrated to detect small organic molecules at low concentration levels. In this context, *electrochemical impedance spectroscopy* (EIS) is being rapidly developed because of the possibility to record directly information on biorecognition events occurring at the electrode surfaces and inducing capacitance and resistance changes [28, 29]. Thus, when a biological receptor binds to its counterpart, there is a change in the impedance of the system that enables direct measurement of an electrical signal, allowing the development of label-free biosensing devices. A major drawback of early sensors was that impedance changes due to biorecognition are very small. However, new electrode configurations have significantly increased the detectability of these devices. Thus, impedimetric label-free devices have been described to detect DNA hybridization [30] or biomolecules such as interferon-gamma [31], but direct detection of contaminants and residues in complex matrices is still a challenge. Label-free detection of bisphenol A (BPA) based on the impedance measurement has also been achieved with an impedimetric immunosensor [87]. The immunosensor was fabricated by the covalent immobilization of a polyclonal antibody on carboxylic acid group-functionalized nano-particle comprised conducting polymer and bisphenol A haptene, (4,4-bis(4-hydroxyphenyl) valeric acid, BHPVA) BSA conjugate. The immunosensor showed specific recognition of BPA with a LOD of $0.3 \pm 0.07 \text{ ng mL}^{-1}$. The proposed immunosensor was applied to the analysis of BPA in human serum samples.

In this context, interdigitated microelectrodes (ID μ E) have recently drawn great attention since their sensitivity is higher than conventional electrodes [32–35]. Using thin Au/Cr ($\sim 200 \text{ nm}$ thickness) ID μ E's ($3.85 \mu\text{m}$ thick and with an electrode gap of $6.8 \mu\text{m}$) on a Pyrex 7740 glass substrate, our group has recently reported detection of atrazine without the use of any label with a limit of detection of $0.04 \mu\text{g L}^{-1}$ [36]. The sensor has been evaluated to assess its potential to analyze pesticide residues in a complex sample matrix, such as red wine. An atrazine haptene-BSA

conjugate was covalently immobilized within the μ -electrodes on the glass substrate. An appropriate functionalization of the transducer surfaces was crucial in this case. A key problem is the nonspecific binding of molecules present in the sample matrix to the surface of the sensor. This concerns any surface from a lower to higher extent, but particularly, gold is very suitable to capture nonspecifically organic molecules and components from the media. For this reason, a two-step activation procedure based on the distinct properties of the gold (electrodes) and the silicon oxide surfaces (between the electrodes) was used. The whole activation procedure was monitored by impedance spectroscopy using ID μ E as is shown in Fig. 2. In a first step, modification of the gold surfaces was accomplished making use of thiol chemistry using N-acetylcysteamine to cover the gold electrodes and to protect the sensor from undesired nonspecific absorptions (Step I). Following this, immobilization of the glass material between the electrodes was activated making use of silane chemistry, using (3-glycidoxypopyl)trimethoxysilane (GOPS) (Step II). The epoxy group provided the necessary reactivity for further attachment of the immunoreagents through a nucleophilic attack of the amino groups of the lysine

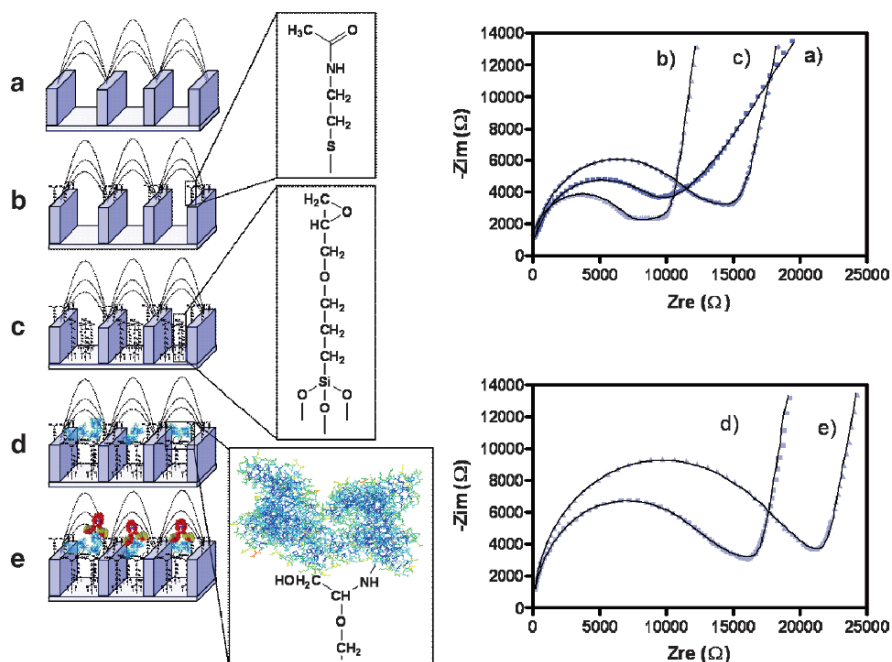


Fig. 2 *Left:* Scheme showing steps used to prepare the immunosensor surfaces and antibody binding. *Right:* Nyquist plots of impedance spectra corresponding to: (a) ID μ E, (b) Step I: N-acetylcysteamine, gold protection, (c) Step II: functionalization of Pyrex substrate with (3-glycidoxypopyl)trimethoxysilane, (d) Step III: coating antigen 2d-BSA, covalent immobilization ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$), and (e) Step IV: Antibody Ab11, incubation step ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$). Symbols represent the experimental data. Solid curves represent the computer fitting data with the parameters calculated by the commercially available software Zplot/Zview (Scibner Associates). Parts of this figure are reprinted from [36] with permission from Elsevier

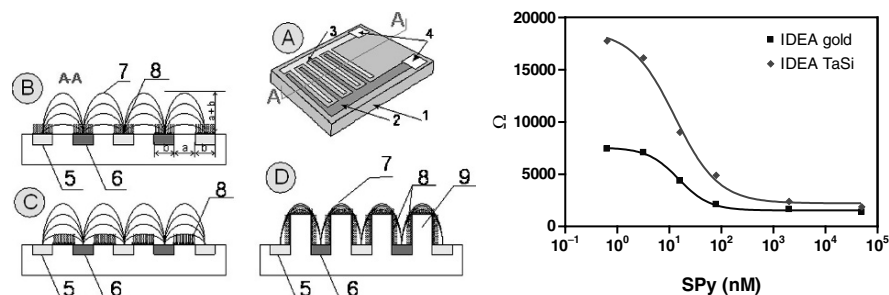


Fig. 3 *Left*: Schemes of the planar and barrier electrodes: (A) Planar IDEA device; (B), (C) cross-section A-A of the planar IDEA device; (D) IDEA device with insulating barriers between electrode digits. The numbers represent: 1-Insulating substrate; 2, 3-electrode collector bars; 4-contact pads; 5, 6-electrode “digits”; 7-electric field lines; 8-immobilized biomolecules; 9-insulating barrier. *Right*: Calibration curves obtained for sulfapyridine using either the planar electrodes or the electrodes with barriers. Parts of this figure are reprinted from Bratov et al. [37] with permission from Elsevier

residues of the antigen. As can be observed, the covalent immobilization of the atrazine antigen 2d-BSA (Step III) produced a significant change in the Nyquist plot. Finally, exposure of the immunosensor to a solution of the specific antibody (Step IV) produced a shift in the impedance spectra that is dependent on the concentration of atrazine present in the sample.

Also based on ID μ E an improved immunosensor for sulfonamide antibiotic residue analysis has been reported [37, 38]. This new transducer used a three-dimensional interdigitated electrode in which the different electrode digits are separated by insulating barriers. Using this strategy it was possible to use most of the electric field instead of using just a small percentage (Fig. 3, left). Moreover, there is a significant increase of the available area to immobilize the immunoreagents. On the other hand, the electrodes in this case are made of TaSi instead of gold, diminishing the nonspecific adsorptions on the surface. The immunosensor allows direct detection of the antibiotic sulfapyridine (SPY) and shows an IC_{50} value of $5.3 \mu\text{g L}^{-1}$ in buffer. As can be observed in Fig. 3 (right), the three-dimensional sensor shows considerable improvement compared with a standard planar InterDigitated Electrode Array (IDEA) design.

3 Optical Biosensors

Optical biosensors show great promise for residue analysis. Although first developments took advantage of the flexibility and low cost of the optical fibers measuring the absorption or emission of light of one of the components of the bioreaction [39], later developments were mainly based on micro/nanotechnology and on the possibility

to fabricate complex micro/nanostructures to guide light which has opened up the possibility to investigate novel optical phenomena and the optical properties of materials at the nanometric level (for reviews on new optical biosensing systems see [40–44]). Some of these developments have found application in the detection of emerging pollutants and also pharmaceuticals (i.e., [45–47]) and herein we will describe some of these examples.

3.1 Biosensors Based on the Evanescent Wave Optical Principle

An evanescent wave (EW) is produced in the external media (refractive index, n_2) of a waveguide (n_1) by the electromagnetic field associated to the light guided by total internal reflection (TIR). The electromagnetic field does not abruptly switch to zero at the interface between the two media ($n_1 > n_2$), but decays exponentially with distance from the interface. The penetration depth of the evanescent field is defined as the distance where its strength is reduced to $1/e$ of its value at the interface and generally has a value around a hundred nanometers. The penetration depth is dependent on the incidence angle at the interface and is proportional to the wavelength of the excitation light. When molecules with an absorption spectrum including the excitation wavelength are located in the evanescent field, they absorb energy leading to attenuation (attenuated total reflection, ATN) in the reflected light of the waveguide. One of the advantages of the biosensors based on this principle is that possible interferences from the bulk media are avoided since only directly absorbed substances interfere with the electromagnetic field.

With the aim to improve detectability, many reported immunosensors combine this principle with the use of labeled molecules that are able to re-emit the absorbed evanescent photons at a longer wavelength as fluorescence. Part of this emission is coupled back to the waveguide and in this way is transmitted to the receptor. This phenomenon is known as total internal reflection fluorescence (TIRF). As an example a fully automated TIRF-based biosensor study for progesterone in bovine milk has recently been reported measuring progesterone levels in daily milk samples for 25 days, covering the whole estrus cycle [48]. The immunochemical assay was designed as a binding-inhibition test with a progesterone derivative covalently immobilized on the sensor surface and a monoclonal antiprogestosterone antibody as the biological recognition element. Progesterone levels can be measured in about 5 min with a LOD of 0.04 ng mL^{-1} . The biosensor can be used in-line in the milking parlor and thus could be an important tool for reproductive management of dairy cattle detecting heat and predicting pregnancy, which are critical parameters in milk production. Similarly, the River Analyzer (RIANA) is also a highly sensitive fully automated biosensor able to detect multiple organic targets rapidly and simultaneously [49–51]. Thus, the system has been used to analyze a variety of analytes in environmental samples with very good limits of detection. Hormones, pesticides, antibiotics, and endocrine-disrupting chemicals are among the organic pollutants that have been detected with this biosensor system [47, 49, 52, 53].

More recently, other EW immunosensor approaches such as *Grating Couplers* (i.e., [54–56]) or *Mach-Zehnder Interferometers* (MZI) [57–60] have been investigated in order to make possible direct measurements of small analytes without the use of fluorescent labels. Thus, planar optical waveguides with an input grating coupler, or input/output gratings, have been reported with the aim to be used as label-free biodetection devices. Nanoimprint lithography is used to integrate the grating patterns with thin-film waveguides [55]. An optical waveguide lightmode spectroscopy (OWLS)-based biosensor is a recently developed device in the field of integrated optics, and exploits the science of light guided in structures smaller than the wavelength of the light. The system OWLS has been commercialized by MicroVacuum Ltd (Budapest, Hungary). The immobilization of a bioligand to an OWLS-based biosensor occurs by the silanization of the waveguide layer and the coupling of it to the silanized sensor surface. The structure of the chip consists of an input grating and a waveguide layer. The light of a He-Ne laser ($\lambda = 632.8 \text{ nm}$) is diffracted by the grating at the interface and starts propagating via TIR inside the waveguide. At a well-defined incident angle (α), the phase shift during one internal reflection equals zero (constructive interference) and a guided mode is excited, which generates an evanescent field penetrating into the covering medium. A change in refractive index at the surface as a consequence of a biorecognition reaction is monitored on-line by precise measurement of incoupling angle as a function of time with the operating software of the immunosensor system. This principle has been used to analyze sulfamethazine, by immobilizing the antibody on the surface of the chip and reaches a LOD of 10^{-8} M .

A similar system has been developed by the Centre Suisse d'Electronique et de Microtechnique (CSEM, Neuchâtel, Switzerland) [61–63]. The wavelength interrogated optical immunosensor (WIOS) also measures changes in the refractive index of the evanescent wave. In this case, the chip has an input and an output grating (Fig. 4). Light from a VCSEL laser emitting at around 763 nm is incident on a first grating and when coupling takes place, the waveguide mode is excited and propagates into the waveguide layer until the second grating where the light couples out

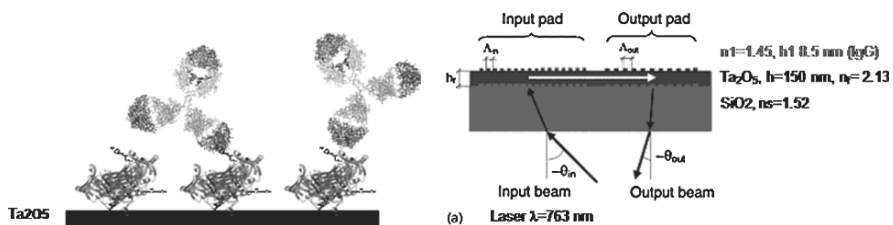


Fig. 4 Scheme of the WIOS system. The chip is a customized platform that contains 24 sensing sites. Each site is waveguide grating. Light from a VCSEL laser emitting at around 763 nm is incident on a first grating. The waveguide mode is excited and propagates into the waveguiding layer. The second grating couples out the guided light (at a different angle), which is collected with large plastic optical fibers. Electronics controls the laser wavelength modulation and amplifies the detected signals. A computer does the data acquisition and processing

of the waveguide (at a different angle) and is collected with large plastic optical fibers. Since the resonant coupling occurring at the first grating is also dependent on the wavelength (λ) of the incident light, an optical configuration has been envisaged that allows working at a fixed incidence angle (θ) while the wavelength at which coupling takes place is monitored through the output grating. This allows recording of effective index variations of the waveguide by continuously monitoring this parameter. On the basis of this principle, an immunosensor to detect sulfonamide antibiotic residues in milk samples has been developed. Immunoreagents appropriately produced to detect a wide range of sulfonamide antibiotic congeners [64] have been incorporated on the surface of the chip making use of a photopolymerizable dextran layer. The WIOS immunosensor is able to reach the necessary detectability to determine the most frequently used sulfonamide antibiotics used in the veterinary field, in compliance with the EC regulations. Thus, sulfapyridine can be detected in milk with a LOD value of 0.50 ± 0.12 and $0.24 \pm 0.06 \mu\text{g L}^{-1}$ and buffer samples, respectively. Other sulfonamides tested showed LODs below the MRLs values [65].

On a *Mach-Zehnder interferometer* the propagating light is split into two arms, one with the appropriate sensing layer and the other acting as a reference. The evanescent field of the measuring arm collects information regarding the bioreaction via the change produced in the refractive index. Consequently, the velocity of the wave in this arm varies. At the end recombination of the waves from both arms allows observation of a constructive or destructive interference, which is related to the extent of the bioreaction that has occurred on the sensing arm. Although there is intensive research in this field to our knowledge no applications to the development of biosensors for pharmaceuticals or emerging pollutants have been reported [57–60].

3.2 Plasmon Resonance Biosensors

The plasmon resonance is an evanescent electromagnetic field generated at the surface of a metal conductor (usually Ag or Au) when excited by the impact of light of an appropriate wavelength at a particular angle (θ_p). Surface plasmons are generated by electrons at the metal surfaces that behave differently from those in the bulk of the metal. These electrons are excited by the incident light, producing an oscillation (resonance) at different frequency from that in the bulk of the metal film. The absorption of light energy by the surface plasmons during resonance is observed as a sharp minimum in light reflectance when the varying angle of incidence reaches the critical value. The critical angle depends on the wavelength and polarization state of the incident light, but also on the dielectric properties of the medium adjacent to the metal surface and therefore is affected by analytes binding to that surface. This principle has been extensively investigated for monitoring of biological interactions in different types of configuration. We will provide herein some examples of late developments regarding detection of pharmaceuticals using this principle, however for additional information the reader is directed to some recent reviews (i.e., [39, 43, 66]).

Since distinct surface plasmon resonance (SPR) prototypes (Biacore, IASys, etc.) have appeared in the market, a significant number of applications of this principle have been reported during the last year. For example, in a recent paper surface plasmon resonance has been used to analyze 17 β -estradiol (E2) in sewage in the coastal marine environment [67]. Using the commercial Biacore system, the small molecule E2 is immobilized on a CM5 sensor chip for an indirect competitive immunoassay. The LOD achieved was 0.445 $\mu\text{g L}^{-1}$ although to analyze environmental samples, the SPR was coupled to a solid-phase extraction system [67]. Similarly, several examples of the use of SPR commercialized by Sensia to analyze environmental organic pollutants (DDT, atrazine, chlorpyrifos, and carbaryl) in natural water samples have been reported [46, 68–70]. BPA has also been analyzed using a SPR biosensor immobilizing a BPA-ovalbumin (BPA-OVA) conjugate on the Au thin film of the SPR sensor chip by just physical adsorption [71]. The lowest detection limit for BPA by SPR was around 1 ppb, almost the same as the LOD reached by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) using the same immunoreagents.

An interesting example also reports the development of a novel surface plasmon resonance-based biosensor assay for the bioeffect-related screening of chemicals with thyroid-disrupting activity [72]. For this purpose two thyroid transport proteins (TPs), thyroxine-binding globulin (TBG) and recombinant transthyretin (rTTR), were applied in an inhibition assay format in a Biacore 3000 using CM5 biosensor chips coated with l-thyroxine (T4), the main hormone of the thyroid system. Known thyroid disruptors and structurally related compounds such as halogenated phenols, halogenated bisphenols, bisphenol A, 3,5-dichlorobiphenyl, and its hydroxylated metabolite 4-hydroxy-3,5-dichlorobiphenyl (4-OH PCB 14) were tested in this system to their relative potency (RP) with T4. The TBG-based assay was highly specific for T4, and the rTTR-based assay was sensitive toward several compounds, the highest sensitivity (RP = 4.4) being obtained with 4-OH PCB 14, followed by tetrabromobisphenol A (RP = 1.5) and tetrachlorobisphenol A (RP = 0.75).

Regarding antibiotic residues, a rapid and sensitive screening qualitative method using a surface plasmon resonance biosensor has been reported that detects all fenicol antibiotic residues in shrimps from a single sample extract [88]. This method requires ethyl acetate extraction followed by a single wash with isoctane/chloroform. Each sample extract is injected over the surfaces of two biosensor chip flow cells, one surface having the capability to detect florefenicol amine (FF amine), florefenicol (FF), and thiamphenicol (TAP) and the second surface for chloramphenicol (CAP) detection. The estimated detection capabilities ($\text{CC}\beta$) were 0.1, 0.2, 250, and 0.5 ppb for CAP, FF, FF amine, and TAP, respectively. This quick, simple test allowed the detection of CAP residues in shrimps at the minimum required performance limit of 0.1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for this compound and of FF, FF amine, and TAP below their maximum residue limits. Previously, detection of chloramphenicol and the mammalian metabolite chloramphenicol glucuronide (CAP-Glu) with the Biacore Q biosensor has also been reported. Honey, porcine kidney, and prawn extracts were analyzed after solvent extraction and solid-phase clean-up. Similarly, the determination of β -lactams using

Biacore has been reported, by immobilizing either an enzyme receptor [73] or a specific antibody [74]. In the first case, the specific recognition is based on the enzymatic activity of a carboxypeptidase converting a 3-peptide into a 2-peptide, a reaction that is inhibited in the presence of β -lactams. Antibodies were used to measure either the amount of formed enzymatic product or the amount of remaining enzymatic substrate. Different β -lactams were detected at or below European maximum residue limits. Thus, the LOD for penicillin G was 1.2 and 1.5 g kg⁻¹, depending on whether the 2- or 3-peptide was detected, respectively. The Biacore biosensor was also employed to detect β -lactams using a commercial antibody against ampicillin which had much higher affinity for the open β -lactam ring than for the closed ring. Two different pretreatments were tested prior to the biosensor assay to open the ring in order to increase the assay sensitivity. The LODs achieved for ampicillin in milk were 33 and 12.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ after enzymatic and chemical pretreatment, respectively. Conversely, penicillins G and M could be detected at or below their respective MRLs (4 and 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ in milk, respectively) and ampicillin and amoxicillin could be detected only at about the MRLs after chemical pretreatment.

A step forward in the use of plasmon resonant (PR) properties of materials is the use of particles for biological detection. Thus, colloidal gold or silver particles, typically 10–120 nm in diameter, are plasmon resonant. The particle geometric confinement of the surface plasmon gives rise to a spectral resonance in the light scattering that does not occur in thin films such as those used in the Biacore. The light scattered by nanometer-sized colloidal metal particles is dominated by the collective oscillation of the conduction electrons induced by the incident electric field (light), as mentioned above for the plasmon resonance of flat surfaces. However, in this case, the frequency band (specific color) of the scattered light is a function of the size, shape, and material properties of the particle. Thus, silver or gold nanoparticles, with diameters of 30–120 nm, efficiently scatter light in the visible spectrum. Variations in the refractive index around the nanoparticle surface also affect the resonance peak (frequency band of the scattered light), for which reason biomolecular interactions can be detected using nanoparticles (Fig. 5). This physical phenomenon is known as localized surface plasmon resonance (LSPR). An example of the application of this physical transducer principle to the analysis of an anabolic androgenic steroid such as stanozolol, has been recently reported [75, 76]. The chip could be fabricated in house by first activating the glass substrate with a silanizing agent possessing either a NH₂ or a SH group to bind the gold nanoparticles on the top of a flat SiO₂ (glass) surface without the observation of clusters. Following this, a stanozolol hapten-BSA conjugate was used to coat the gold nanoparticles and the detection of the hormone was made under competitive conditions by just mixing the sample with the antibody and adding a drop on top of the LSPR chip. The extinction spectra of the gold colloids were measured by conventional dark-field spectroscopy, illuminating the sample with a halogen lamp (100 W). The light scattered by the particles was analyzed with a microspectrometer and a CCD camera. Using this simple set-up stanozolol could be measured to a level below the minimum required performance level.

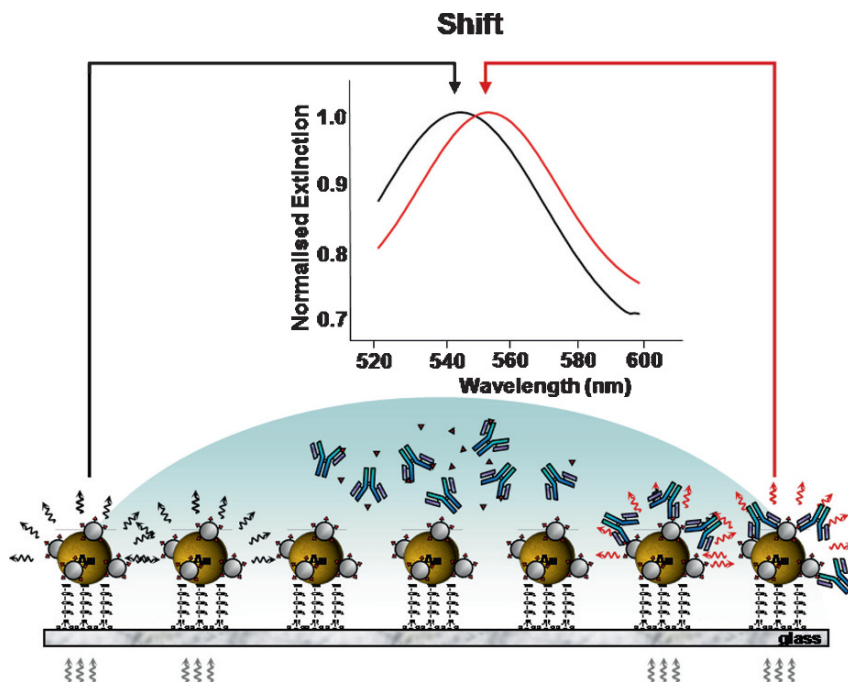


Fig. 5 Schematic of the chip using Au nanoparticles on top of a glass substrate used to detect stanozolol, and androgenic steroid used illegally to increase meat production or athletic efficiency in sport competitions. Specific binding of the antibody to stanozolol hapten-BSA coated on top of the nanoparticles, produces a shift in the resonance peak of the nanoparticles that has been used to detect this anabolic androgenic steroid. Reproduced from [75]

3.3 Nanomechanical Biosensors

Finally, biosensors based on microcantilevers (MCLs) have become a promising tool for directly detecting biomolecular interactions. Microcantilevers translate molecular recognition of biomolecules into nanomechanical motion that is commonly coupled to an optical or piezo-resistive read-out detector system. Biosensors based on cantilevers are a good example of how nanotechnology and biotechnology can go together. Microcantilever sensors rely on their deflection to indicate sensing. Thus, molecular adsorption onto the sensing element shifts the resonance frequency and changes its surface forces (surface stress). Surface stress due to conformational change of proteins and other polymers has been a recent focus of MCL research. Since conformational changes in proteins can be produced through binding of analytes at specific receptor sites, MCLs that respond to conformational change-induced surface stress are promising as transducers of chemical information and are ideal for developing microcantilever-based biosensors. On the other hand, high-throughput platforms using arrays of cantilevers have been developed for simultaneous measurement and read-out of hundreds of samples. Although many interesting applications in the environmental and clinical diagnostic field have been reported

(for recent reviews see [42, 77–80]), examples of their use to detect pharmaceuticals are still scarce.

4 Piezoelectric Immunosensors

Piezoelectrics are materials that may be brought into resonance by the application of an external alternating electric field. The frequency of the resulting oscillation is determined by the mass of the crystal. By coating a piezoelectric with an appropriate biomolecule such as an antibody, these kinds of immunosensors can, in principle, directly detect the binding of the corresponding analyte (for reviews see [81, 82]). Piezoelectric immunosensors may adopt two modes: (1) *Bulk acoustic (BA) devices* where adsorption of the analytes occurs on the coated surface of a piezoelectric crystal connected to an oscillator circuit. Resonance occurs on the entire mass of the crystal. If for example an antibody-coated crystal is placed in an atmosphere containing the selected analyte the immunoreaction will produce an increase in the mass of the crystal. The resonant frequency will therefore decrease according to the Sauerbrey equation: $\Delta f = -2.3 \times 10^6 f^2 (\Delta m/A)$, where f is the oscillation frequency in Hz, Δm is the adsorbed mass in g, and A is the sensing area in cm^2 . (2) *Surface acoustic wave (SAW) devices* where an acoustic wave moves just at the surface of the crystal. Mass loading on the acoustic path between two sets of electrodes will alter the phase wave velocity and cause a shift in the frequency. This technology can, in principle, detect binding events produced at the surface of the piezoelectric material.

Several examples can be found in the literature regarding the use of this type of sensor for environmental, food safety, and clinical applications. Liu et al. reported the detection of various polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by immobilizing the antigen (benzo[a]pyrene-BSA conjugate, BaP-BSA) on gold-coated quartz crystals, with a basic resonant frequency of 10 MHz, through thioctic acid [83]. The monoclonal antibody 10c10 (mAb10c10) allowed one to determine benzo[a]pyrene (BaP) in the flow injection system by using a competitive pattern, down to the nanomolar level. Similarly, a piezoelectric immunosensor system was developed for the rapid detection of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) using a direct enzyme immunoassay format [84]. The purpose of using the enzyme was just to increase the mass of the binding molecule. The mouse monoclonal antibody against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (2,3,7,8-TCDD) was deposited on a 10-MHz AT-cut quartz crystal resonator modified with a self-assembly monolayer of dithiobis-N-succinimidyl propionate. Competition took place between the analyte and a conjugate of a dioxin-like competitor coupled to the enzyme horseradish peroxidase. Measurement of the frequency responses allowed detection of 2,3,7,8-TCDD in the concentration range of 0.01–1.3 ng mL^{-1} . In another example BPA was detected down to 10 ng mL^{-1} using antibodies coupled to nanoparticles, approximately 200 nm in diameter, with the aim to increase the mass change on the surface of the immunosensor and thereby increase the frequency shift detected [85]. PCBs have also been detected using a piezoelectric immunosensor, by immobilizing a polyclonal antibody on a gold electrode via protein A. Detection in the range of 1–50 ppm was achieved using either

enzyme or polystyrene particles to increase the response of the sensor [86]. As a representative example of the use of this principle to analyze pharmaceutical residues, Park et al. reported the direct detection of chloramphenicol by covalently immobilizing specific antibodies onto the gold electrode surface of piezoelectric crystals using a self-assembled monolayer, obtaining a significant shift of the resonance frequency in about 10 min [85]. However, the detectability achieved was much worse than in those formats where a competitive configuration was used.

5 Conclusions

Future advances in biosensor development will need scientists from different disciplines combining their research efforts. First, improvement of transducer technology is necessary in order to allow direct detection on environmental samples and to confer the necessary flexibility to develop field analytical methods. Frequent new micro/nanotechnological advances are opening up new and exciting possibilities that should be investigated in order to find novel ways to convert biomolecular recognition events into electrical or optical signals. Second, increasing the number of analytes that can be measured using the biosensor technology is necessary. Especially interesting are those compounds that are difficult to measure using currently accepted methods. Antibody-based biosensors continue to show great potential due to the excellent features of this type of biomolecule (stability, chemical homogeneity etc.) and the capability to produce them against almost any type of analyte, which may broaden the number of compounds that can be analyzed. This versatility of the immune system combined with the progress that recombinant DNA technology is making in this field may increase the potential of these bioreceptors. A third trend should be developing integrated units able to perform multianalyte measurements. And finally the extensive research that is taking place in this area will not give the expected fruit without performing rigorous validation studies with environmental samples. All these facts will contribute to improving investment by private companies to finally deliver reliable devices into the market.

Acknowledgments This work was supported by the Ministry of Science and Technology (Contract numbers AGL2005-07700-C06-01, NAN2004-09415-C05-02, NAN2004-09195-C04-04, and DEP2007-73224-C03-01) and by the European Community (Confidence, Proposal No.: 211,326 - CP Collaborative Project). The AMR group is a Group de Recerca de la Generalitat de Catalunya and has support from the Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació la Generalitat de Catalunya (expedient 2005SGR 00207). We would also like to give our thanks for the contribution from research groups from the CNM-CSIC, CSEM, Unisensors, and UAB to some of the results presented herein.

References

1. Siow KS et al (2006) Plasma methods for the generation of chemically reactive surfaces for biomolecule immobilization and cell colonization – A review. *Plasma Process Polym* 3(6–7):392–418

2. Kandimalla VB, Tripathi VS, Ju HX (2006) Immobilization of biomolecules in sol-gels: Biological and analytical applications. *Crit Rev Anal Chem* 36(2):73–106
3. Meyer-Plath AA et al (2003) Current trends in biomaterial surface functionalization-nitrogen-containing plasma assisted processes with enhanced selectivity. *Vacuum* 71(3 Suppl):391–406
4. Cosnier S (1999) Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films. A review. *Biosens Bioelectron* 14(5):443–456
5. Xia K et al (2005) Occurrence and fate of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in biosolids. *J Environ Qual* 34(1):91–104
6. Rodriguez-Mozaz S, de Alda MJL, Barcelo D (2006) Biosensors as useful tools for environmental analysis and monitoring. *Anal Bioanal Chem* 386(4):1025–1041
7. Keren Barel-Cohen LSS, Shemesh M, Wenzel A, Mueller J, Kronfeld-Schor N (2006) Monitoring of natural and synthetic hormone in a polluted river. *J Environ Manage* 78:16–23
8. Nozaki O (2001) Steroid analysis for medical diagnosis. *J Chromatogr A* 935(1–2):267–278
9. Ying G-G, Kookana RS, Ru Y-J (2002) Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environ Int* 28(6):545–551
10. IARC (1985) I.A.f.r.o.c., Polynuclear aromatic compounds: bituminous, coal tars and derived products, shale oils and soots. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risks of chemicals to humans 35:4
11. Wegener HC (2003) Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Curr Opin Microbiol* 6(5):439–445
12. Sumpter JP, Jobling S (1995) Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ Health Perspect* 103:174–178
13. Pumera M et al (2007) Electrochemical nanobiosensors. *Sens Actuators B Chem* 123(2):1195–1205
14. Rivas GA et al (2007) Carbon nanotubes for electrochemical biosensing. *Talanta* 74(3):291–307
15. Pingarrón JM, Yáñez-Sedeño P, González-Cortés A (2008) Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. *Electrochim Acta* 53(19):5848–5866
16. Li X-M, Yang XY, Zhang S-S (2008) Electrochemical enzyme immunoassay using model labels. *Trends Anal Chem* 27(6):543–553
17. Badihi-Mossberg M, Buchner V, Rishpon J (2007) Electrochemical biosensors for pollutants in the environment. *Electroanalysis* 19(19–20):2015–2028
18. Rose A et al (2002) GDH biosensor based off-line capillary immunoassay for alkylphenols and their ethoxylates. *Biosensors Bioelectron* 17(11–12):1033–1043
19. Lu H et al (2006) Screening of boldenone and methylboldenone in bovine urine using disposable electrochemical immunosensors. *Steroids* 71(9):760–767
20. Conneely G et al (2007) Development of an immunosensor for the detection of testosterone in bovine urine. *Anal Chim Acta* 583(1):153–160
21. Conneely G et al (2007) Electrochemical immunosensors for the detection of 19-nortestosterone and methyltestosterone in bovine urine. *Sens Actuators B Chem* 121(1):103–112
22. Carralero V et al (2007) Nanostructured progesterone immunosensor using a tyrosinase-colloidal gold-graphite-Teflon biosensor as amperometric transducer. *Anal Chim Acta* 596(1):86–91
23. Zacco E et al (2007) Electrochemical magneto immunosensing of antibiotic residues in milk. *Biosens Bioelectron* 22(9–10):2184–2191
24. Font H et al (2008) Immunochemical assays for direct sulfonamide antibiotic detection in milk and hair samples using antibody derivatized magnetic nanoparticles. *J Agric Food Chem* 56(3):736–743
25. Zacco E, Pividori MI, Alegret S (2006) Electrochemical magnetoimmunosensing strategy for the detection of pesticide residues. *Anal Chem* 78(6):1780–1788
26. Centi S et al (2005) A disposable immunomagnetic electrochemical sensor based on functionalised magnetic beads and carbon-based screen-printed electrodes (SPCEs) for the detection of polychlorinated biphenyls (PCBs). *Analytica Chimica Acta* 538(1–2):205–212

27. Centi S, Laschi S, Mascini M (2007) Improvement of analytical performances of a disposable electrochemical immunosensor by using magnetic beads. *Talanta* 73(2):394–399
28. Katz E, Willner I (2003) Probing biomolecular interactions at conductive and semiconductive surfaces by impedance spectroscopy: routes to impedimetric immunosensors, DNA-sensors, and enzyme biosensors. *Electroanalysis* 15(11):913–947
29. Guan JG, Miao YQ, Zhang QJ (2004) Impedimetric biosensors. *J Biosci Bioeng* 97(4):219–226
30. Ma KS et al (2006) DNA hybridization detection by label free versus impedance amplifying label with impedance spectroscopy. *Sens Actuators B* 114(1):58–64
31. Bart M et al (2005) On the response of a label-free interferon-gamma immunosensor utilizing electrochemical impedance spectroscopy. *Biosens Bioelectron* 21(1):49–59
32. Moreno-Hagelsieb L et al (2007) Electrical detection of DNA hybridization: three extraction techniques based on interdigitated Al/Al₂O₃ capacitors. *Biosens Bioelectron* 22(9–10):2199–2207
33. Laschi S, Mascini M (2006) Planar electrochemical sensors for biomedical applications. *Med Eng Phys* 28(10):934–943
34. Navratilova I, Skladal P (2004) The immunosensors for measurement of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid based on electrochemical impedance spectroscopy. *Bioelectrochemistry* 62(1):11–18
35. Berggren C, Bjarnason B, Johansson G (2001) Capacitive biosensors. *Electroanalysis* 13(3):173–180
36. Ramón-Azcón J et al (2008) An impedimetric immunosensor based on interdigitated microelectrodes (ID[μ]E) for the determination of atrazine residues in food samples. *Biosens Bioelectron* 23(9):1367–1373
37. Bratov A et al (2008) Three-dimensional interdigitated electrode array as a transducer for label-free biosensors. *Biosens Bioelectron* 24(4):729–735
38. Bratov A et al (2008) Characterisation of the interdigitated electrode array with tantalum silicide electrodes separated by insulating barriers. *Electrochem Commun* 10(10):1621–1624
39. Leung A, Shankar PM, Mutharasan R (2007) A review of fiber-optic biosensors. *Sens Actuators B Chem* 125(2):688–703
40. McDonagh C, Burke CS, MacCraith BD (2008) Optical Chemical Sensors. *Chem Rev* 108(2):400–422
41. Borisov SM, Wolfbeis OS (2008) Optical biosensors. *Chem Rev* 108:423–461
42. Carrascosa LG et al (2006) Nanomechanical biosensors: a new sensing tool. *Trends Anal Chem* 25(3):196–206
43. Bally M et al (2006) Optical microarray biosensing techniques. *Surf Interf Anal* 38(11):1442–1458
44. Vaseashta A, Irudayaraj J (2005) Nanostructured and nanoscale devices and sensors. *J Optoelectron Adv Mater* 7(1):35–42
45. Gonzalez-Martinez MA, Puchades R, Maquieira A (2007) Optical immunosensors for environmental monitoring: How far have we come? *Anal Bioanal Chem* 387(1):205–218
46. Mauriz E et al (2006) Determination of environmental organic pollutants with a portable optical immunosensor. *Talanta* 69(2):359–364
47. Tschmelak J, Proll G, Gauglitz G (2005) Optical biosensor for pharmaceuticals, antibiotics, hormones, endocrine disrupting chemicals and pesticides in water: Assay optimization process for estrone as example. *Talanta* 65(2):313–323
48. Kappel ND, Proll F, Gauglitz G (2007) Development of a TIRF-based biosensor for sensitive detection of progesterone in bovine milk. *Biosens Bioelectron* 22(9–10):2295–2300
49. Tschmelak J et al (2006) Total internal reflectance fluorescence (TIRF) biosensor for environmental monitoring of testosterone with commercially available immunochemistry: Antibody characterization, assay development and real sample measurements. *Talanta* 69(2):343–350
50. Tschmelak J et al (2005) Automated water analyser computer supported system (AWACSS): Part II: Intelligent, remote-controlled, cost-effective, on-line, water-monitoring measurement system. *Biosens Bioelectron* 20(8):1509–1519

51. Tschmelak J et al (2005) Automated water analyser computer supported system (AWACSS) Part I: Project objectives, basic technology, immunoassay development, software design and networking. *Biosens Bioelectron* 20(8):1499–1508
52. Tschmelak J, Proll G, Gauglitz G (2004) Verification of performance with the automated direct optical TIRF immunosensor (River analyser) in single and multi-analyte assays with real water samples. *Biosens Bioelectron Microarrays Biodefense Environ Appl* 20(4):743–752
53. Rodriguez-Mozaz S et al (2004) Simultaneous multi-analyte determination of estrone, isoproturon and atrazine in natural waters by the RIVER ANALYser (RIANA), an optical immunosensor. *Biosens Bioelectron* 19(7):633–640
54. Szekacs A et al (2003) Development of a non-labeled immunosensor for the herbicide trifluralin via optical waveguide lightmode spectroscopic detection. *Anal Chim Acta* 487(1):31–42
55. Grego S, McDaniel JR, Stoner BR (2008) Wavelength interrogation of grating-based optical biosensors in the input coupler configuration. *Sens Actuators B Chem* 131(2):347–355
56. Kim N, Park IS, Kim WY (2007) Salmonella detection with a direct-binding optical grating coupler immunosensor. *Sens Actuators B Chem* 121(2):606–615
57. Hsu SH, Huang YT (2005) Design and analysis of Mach-Zehnder interferometer sensors based on dual strip antiresonant reflecting optical waveguide structures. *Optics Lett* 30(21):2897–2899
58. Hsu SH, Huang YT (2005) A novel Mach-Zehnder interferometer based on dual-ARROW structures for sensing applications. *J Lightwave Technol* 23(12):4200–4206
59. Kinrot N (2004) Analysis of bulk material sensing using a periodically segmented waveguide Mach-Zehnder interferometer for biosensing. *J Lightwave Technol* 22(10):2296–2301
60. Prieto F et al (2003) Integrated Mach-Zehnder interferometer based on ARROW structures for biosensor applications. *Sens Actuators B Chem* 92(1–2):151–158
61. Cottier K et al (2003) Label-free highly sensitive detection of (small) molecules by wavelength interrogation of integrated optical chips. *Sens Actuators B Chem* 91(1–3):241–251
62. Kunz RE, Cottier K (2006) Optimizing integrated optical chips for label-free (bio-) chemical sensing. *Anal Bioanal Chem* 384(1):180–190
63. Cottier K, Kunz RE, Herzig HP (2004) Efficient and practical modeling of finite waveguide grating couplers. *Jpn J Appl Phys Part 1 Reg Pap Short Notes Rev Pap* 43(8B):5742–5746
64. Adrian J et al (2009) Generation of broad specificity antibodies for sulfonamide antibiotics and development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the analysis of milk samples. *J Agric Food Chem* 57(2):385–394
65. Adrian J et al (2009) Waveguide interrogated optical immunoSensor (WIOS) for detection of sulfonamide antibiotics in milk. *Biosens Bioelectron*, submitted
66. Shankaran DR, Gobi KV, Miura N (2007) Recent advancements in surface plasmon resonance immunosensors for detection of small molecules of biomedical, food and environmental interest. *Sens Actuators B Chem* 121(1):158–177
67. Zhang W-W et al (2007) Analysis of 17[β]-Estradiol from sewage in coastal marine environment by surface plasmon resonance technique. *Chem Res Chin Univ* 23(4):404–407
68. Mauriz E et al (2007) Optical immunosensor for fast and sensitive detection of DDT and related compounds in river water samples. *Biosens Bioelectron* 22(7):1410–1418
69. Mauriz E et al (2006) Determination of carbaryl in natural water samples by a surface plasmon resonance flow-through immunosensor. *Biosens Bioelectron* 21(11):2129–2136
70. Farre M et al (2007) Part per trillion determination of atrazine in natural water samples by a surface plasmon resonance immunosensor. *Anal Bioanal Chem* 388(1):207–214
71. Matsumoto K et al (2005) A surface plasmon resonance-based immunosensor for sensitive detection of bisphenol A. *J Facul Agric Kyushu Univ* 50(2):625–634
72. Marchesini GR et al (2006) Biosensor recognition of thyroid-disrupting chemicals using transport proteins. *Anal Chem* 78(4):1107–1114
73. Gustavsson E et al (2004) Determination of B-lactams in milk using a surface plasmon resonance-based biosensor. *J Agric Food Chem* 52(10):2791–2796
74. Gaudin V, Fontaine J, Maris P (2001) Screening of penicillin residues in milk by a surface plasmon resonance-based biosensor assay: comparison of chemical and enzymatic sample pre-treatment. *Anal Chim Acta* 436(2):191–198

75. Kreuzer M et al (2008) Colloidal-based localized surface plasmon resonance (LSPR) biosensor for the quantitative determination of stanozolol. *Anal Bioanal Chem* 391:1813–1820
76. Kreuzer MP et al (2006) Quantitative detection of doping substances by a localised surface plasmon sensor. *Biosens Bioelectron* 21(7):1345–1349
77. Raiteri R et al (2001) Micromechanical cantilever-based biosensors. *Sens Actuators B Chem* 79(2–3):115–126
78. Fortina P et al (2005) Nanobiotechnology: the promise and reality of new approaches to molecular recognition. *Trends Biotechnol* 23(4):168–173
79. Goeders KM, Colton JS, Bottomley LA (2008) Microcantilevers: sensing chemical interactions via mechanical motion. *Chem Rev* 108(2):522–542
80. Ji HF et al (2008) Microcantilever biosensors based on conformational change of proteins. *Analyst* 133(4):434–443
81. O’Sullivan CK, Vaughan R, Guilbault GG (1999) Piezoelectric immunosensors - theory and applications. *Anal Lett* 32(12):2353–2377
82. Bunde RL, Jarvi EJ, Rosentreter JJ (1998) Piezoelectric quartz crystal biosensors. *Talanta* 46(6):1223–1236
83. Liu M, Li QX, Rechnitz GA (1999) Flow injection immunosensing of polycyclic aromatic hydrocarbons with a quartz crystal microbalance. *Anal Chim Acta* 387(1):29–38
84. Zhou XC, Cao L (2001) High sensitivity microgravimetric biosensor for qualitative and quantitative diagnostic detection of polychlorinated dibenzo-p-dioxins. *The Analyst* 126(1):71–78
85. Park IS et al (2004) Development of a direct-binding chloramphenicol sensor based on thiol or sulfide mediated self-assembled antibody monolayers. *Biosens Bioelectron* 19(7):667–674
86. Pribyl J, Hepel M, Skladal P (2006) Piezoelectric immunosensors for polychlorinated biphenyls operating in aqueous and organic phases. *Sens Actuators B Chem* (Special Issue - In honour of Professor Karl Cammann) 113(2):900–910
87. Rahman MA et al. (2007) An impedimetric immunosensor for the label-free detection of bisphenol A. *Biosens Bioelectron* 22(11):2464–2470
88. Dumont V et al (2006) A surface plasmon resonance biosensor assay for the simultaneous determination of thiamphenicol, florefenicol, florefenicol amine and chloramphenicol residues in shrimps. *Analytica Chimica Acta* 567(2):179–183

ANNEX 2: Materials i Mètodes (Capítol 4)

Reactius i immunoreactius

Els antisèrums (145, 147, 138, 143, 142 i 170), els haptens (5, 8, 13, 14, 15 i hG) i els antígens de tapissat (5-BSA, 8-BSA, 13-BSA, 14-BSA, 15-BSA i hG-BSA) estaven disponibles al nostre grup de recerca i la seva preparació ha estat prèviament descrita⁹⁷. Altres reactius, com l'isotiocianat de fluoresceïna (FITC) i l'anti-IgG-FITC (anticossos contra immunoglobulines G de conill, desenvolupats en cabres units a l'isotiocianat de fluoresceïna, isòmer I), es varen obtenir de fonts comercials (Sigma-Aldrich).

Tampons i dissolucions

Per a la realització de les conjugacions d'immunoreactius, els assaigs FLISA i els assaigs ELISA es van utilitzar els següents tampons:

El tampó de tapissat era 0.05 M $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ a pH 9.6, el PBS era tampó fosfat 10 mM, amb solució salina del 0.8% a pH 7.5. El PBST era PBS amb Tween 20 al 0.05%. El tampó citrat era una solució 0.04 M de citrat sòdic a pH 5.5. El substrat era una solució al 0.01% TMB amb 0.004% H_2O_2 en tampó citrat. El tampó borat era 0.2 M àcid bòric/borat sòdic a pH 8.7. I la solució de glicerina era 30% (v/v) glicerina en tampó 0.05 M $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ a pH 9.6.

Instrumentació i altres

Les etapes de rentat de les microplaques es van realitzar amb un rentador automàtic SL Y96 PW (SLT Labinstrument GMBH, Salzburg, Austria). Per a les lectures de fluorescència es va utilitzar un lector de microplaques Gemini XPS (Molecular Devices, Sunnyvale, California) a la longitud

d'ona necessària. Les corbes d'inhibició es van analitzar mitjançant una equació logística de quatre paràmetres inclosa en el software de GraphPad PrismTM (GraphPad Software Inc. San Diego, CA, USA). En les diàlisis es van fer servir saquets tubulars de membrana porosa Spectra/Por de 0.81 mL/cm de capacitat, 10 mm de diàmetre, 16 mm d'amplitud i 12-14000 Dalton de mida de porus. Les microplaques de poliestirè de 96 pous blanques MaxisorpTM (assaigs fluoroimmunoquímics) es van adquirir a Nunc (Roskilde, DK). Les microplaques de 96 pous de poliestirè sense tractar transparents, es van adquirir a Dynatech (St. Peter Port, Guernsey, Channel Islands), i les blanques a FluoroNuncTM (Roskilde, DK).

Purificació d'anticossos per precipitació amb $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Els antisèrums, es posaren en eppendorfs i es mantingueren en un bany de gel. A cada un s'addicionà lentament una solució saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fins arribar al 40% (v/v). Es deixaren en agitació en un bany de gel (4°C) durant 4 hores. Passat el temps, en què s'observà l'aparició d'un precipitat blanc, es van centrifugar les solucions a 10000 rpm durant 15 minuts. Seguidament, es varen eliminar els sobrenedants i els precipitats es redissolgueren amb PBS. A continuació, es purificaren per diàlisis contra PBS 0.5 mM (5 litres, 4 vegades) i contra H₂O milliQ (5 litres, 1 vegada). Finalment, els anticossos purificats es van liofilitzar i s'emmagatzemaren a -20 °C.

Conjugació d'anticossos a l'isotiocianat de fluoresceïna (FITC)

Els anticossos obtinguts després de la purificació per precipitació amb $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (5 mg, 33.33 nmol) es van dissoldre en tampó carbonat/bicarbonat 0.25 M a pH 9.6 (1.8 mL), individualment. Seguidament, es va preparar una solució de FITC (1.86 mg) en DMF anhidre (1.24 mL). S'addicionà la quantitat necessària de la solució de FITC sobre les solucions d'Ac, per tal d'obtenir la següent relació: 60 µg FITC/mg Ac. Les mescles es van deixar a temperatura ambient amb agitació magnètica durant 3 hores protegides de la llum. Finalment els conjugats es purificaren per diàlisis, es liofilitzaren i es guardaren a -20 °C.

Estudi de l'espectre d'absorció-emissió dels conjugats

Per dur a terme les espectres d'absorció i d'emissió de l'anti-IgG-FITC, s'utilitzà una microplaca blanca no tractada on s'afegiren diverses dilucions d'anti-IgG-FITC en PBST i PBS (100 µL/pou), per observar si el Tween 20 podia tenir algun efecte en l'emissió, i deixant un pou únicament amb PBS i un altre amb PBST, com a blancs. En el fluorímetre es van realitzar els espectres d'absorció (longitud d'ona d'emissió fixa) i d'emissió (longitud d'ona d' fixa) i es van escollir les condicions òptimes de lectura (màxim d'absorció i màxim d'emissió).

Per dur a terme els espectres d'absorció i d'emissió dels diferents conjugats, s'utilitzà una microplaca blanca no tractada on s'afegiren diverses dilucions dels Ac-FITC en PBST (100

$\mu\text{L}/\text{pou}$), tot deixant un pou únicament amb PBST com a blanc. En el fluorímetre es van realitzar els espectres d'absorció (longitud d'ona d'emissió fixa) i emissió (longitud d'ona d' fixa) dels conjugats per tal d'escollir les condicions òptimes de lectura.

Càlcul de la densitat de fluoròfors

A partir d'una solució 1 mM de FITC (0.54 mg) en DMF (1.387 mL), es va obtenir una solució 100 μM de FITC, tot diluint la primera solució 10 vegades en tampó carbonat/bicarbonat 0.05 M a pH 9.6. En una microplaca transparent no tractada es va preparar una corba de calibratge de FITC començant a 100 μM de FITC, realitzant dilucions 1/2 en el mateix tampó utilitzat anteriorment, i deixant un blanc a zero de concentració (100 $\mu\text{L}/\text{pou}$). Els Ac-FITC, es van diluir 10 vegades en tampó carbonat, i es preparà igualment un banc de dilució, amb dilucions 1/2 (100 $\mu\text{L}/\text{pou}$), deixant igualment un blanc sense conjugat. Les lectures es realitzaren a una λ d'absorció de 494 nm en el espectrofotòmetre i les absorbàncies obtingudes es representaren envers la concentració de FITC i s'ajustaren a una regressió lineal. El càlcul de la densitat de fluoròfors dels Ac-FITC, es feu interpolant el valor obtingut a la corba de calibratge de la FITC.

Assaigs d'immunoabsorció lligada a fluoròfors (FLISAs)

Es va utilitzar l'assaig FLISA en format indirecte, primer es va treballar amb un segon anticòs marcat amb FITC comercial (anti-IgG-FITC) per tal d'optimitzar tots els paràmetres d'assaig amb una detecció indirecta, i un cop es tingueren els anticossos específics marcats amb FITC (Ac-FITC), es realitzaren els fluoroimmunoassaigs amb detecció directe. Tots aquests estudis es realitzaren fent servir microplaques blanques MaxisorpTM (NUNC, Roskilde, DK).

FLISA indirecte

Assaig d'Afinitat (2D): Les microplaques es tapissaren amb els antígens adequadament diluïts (100 $\mu\text{L}/\text{pou}$ en tampó de tapissat) una nit a 4 °C o 4 hores a 25 °C. A continuació, les plaques es rentaren 4 vegades amb PBST i s'afegí l'As diluït apropiadament (100 $\mu\text{L}/\text{pou}$ en tampó de PBST). Després de 30 minuts a temperatura ambient, les plaques es rentaren de nou tal i com s'havia fet anteriorment. Una solució d'anti-IgG-FITC s'addicionà als pous (1/600 en PBST) i es deixà 30 minuts. A continuació es rentà 4 vegades amb PBST i s'hi afegiren 100 $\mu\text{L}/\text{pou}$ d'una solució de glicerina al 30% en tampó carbonat. Es deixà durant 5 minuts a temperatura ambient i s'eliminà. Finalment es realitzaren les mesures de fluorescència en sec a les longituds d'absorció i emissió òptimes per al fluoròfor.

Assaig de competència: Es tapissaren les microplaques amb la dilució apropiada de l'AT (100 $\mu\text{L}/\text{pou}$) en tampó de tapissat, tota la nit a 4 °C o 4 hores a 25 °C. A continuació, es rentaren 4 vegades les microplaques amb PBST i s'afegiren diferents concentracions de l'analit en PBST (50

$\mu\text{L/pou}$). Seguidament, s'addicionà l'As apropiadament diluït en PBST ($50 \mu\text{L/pou}$), i es deixaren les plaques 30 minuts a temperatura ambient perquè hi hagués la competència. A partir d'aquí les microplaques es processaren tal i s'ha descrit anteriorment.

FLISA directe

Els estudis amb detecció directe, tan els competitiu com els no competitiu, es van fer seguint els mateixos protocols que pels assaigs amb detecció indirecte llevat que la lectura es realitzava després d'afegir l'anticòs específic marcat amb el fluoròfor orgànic.