

Diseño de plataforma Dot Blot basado en AuNPs para la cuantificación de avidina en procesos de purificación

Ríos, Ezequiel Maximiliano^{1, 2}; Peralta, María Sol¹; Boschini, Valentina Paula¹; Kikok, Pamela Alejandra^{1, 2}; Flores, Constanza Yanel^{1, 2, 3}; Grasselli, Mariano^{1, 2}

¹ Laboratorio de Materiales Biotecnológicos, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes (UNQ), Bernal (1876), Argentina

² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

³ Instituto de Ciencias de la Salud, UNAJ- Hospital de Alta Complejidad en Red El Cruce- Centro de Medicina Traslacional (CeMeT); Florencio Varela, Argentina.

cyflorescic@gmail.com

Área temática: G. Aplicaciones de nanomateriales en ambiente, energía, agro, alimentos y catálisis

La avidina (AV) es una proteína con alta afinidad por la biotina, lo que resulta en una herramienta crucial en inmunoquímica, y hace deseable nuevos métodos de obtención de AV. Esta proteína se aísla de la clara de huevo, donde se encuentra en muy baja cantidad (0,05 mg AV/ml clara). Los procesos de purificación requieren técnicas específicas de cuantificación de la proteína blanco con el objeto de evaluar su performance. Sin embargo, la baja concentración de la AV en el material de origen y la baja sensibilidad de los métodos de cuantificación disponibles hacen difícil evaluar su proceso de aislamiento. Las nanopartículas de oro (AuNPs) destacan por sus propiedades ópticas, biocompatibilidad y facilidad de funcionalización, lo que las convierte en plataformas ideales para la detección y/o cuantificación de biomoléculas como las proteínas.

Este trabajo desarrolla una técnica de cuantificación de AV, empleando AuNPs funcionalizadas con biotina. Este método aprovecha las características estructurales de la molécula de AV: es un tetrámero capaz de unir cuatro moléculas de biotina, pero estos sitios de unión se distribuyen en dos pares en caras opuestas de la molécula. Esta disposición permite que la AV actúe como un puente molecular entre un soporte sólido y una AuNP. Debido al impedimento estérico, solo un sitio de unión en cada cara permanece funcional. Este principio se aplicó para desarrollar un ensayo dot-blot, donde cada molécula de AV inmovilizada en la superficie de una membrana captura exactamente una AuNP, garantizando una relación estequiométrica para una cuantificación precisa.

Las AuNPs fueron sintetizadas por el método de Frens [1] y funcionalizadas con albúmina sérica bovina ligada a biotina (BSA-b). Los pocillos de una membrana de nitrocelulosa fueron recubiertos con BSA-b y luego se agregaron las muestras conteniendo AV. El revelado se realizó con las AuNPs funcionalizadas con BSA-b. Las muestras negativas permanecieron incoloras y las positivas se tornaron rojo vino. Se utilizó AV pura como estándar para la cuantificación, determinando un rango de cuantificación de 1 a 10 µg AV/ml y un límite de detección de 0,5 µg/ml. Esta técnica se utilizó para evaluar la performance de un proceso de purificación de AV publicado recientemente [2;3]. La versatilidad de este ensayo permite adaptarlo a diversas proteínas objetivo, al sustituir la BSA-b por anticuerpos específicos, lo que lo convierte en una alternativa a los inmunoensayos tradicionales.

REFERENCIAS

1. Frens, G. *Nature Physical Science* 241 (1973) 20–22.
2. Kikot, P., Vazquez, D., Carreras, J., Laurella, S., Grasselli, M. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* (2025) en prensa (DOI: 10.1007/s43153-025-00621-9).
3. Kikot, P., Ríos, E., Vazquez, D., & Grasselli, M. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* (2025) en prensa (DOI: 10.1002/jctb.70002).