

Modification of gold surfaces for the oriented immobilization of recombinant form of horseradish peroxidase

Pedro Rafael Matheus^{2*}, José María Abad¹ y Víctor Manuel Fernández¹

¹Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, España. ²Laboratorio de Análisis Instrumental, Departamento de Análisis y Control, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida 5101, Venezuela. Telf.: 0274-2403438. *pmateus@ula.ve

Abstract

Gold threads of 0.50 mm of diameter and 25 mm in length were used as work electrodes. These electrodes were electrochemically characterized and their effective areas were determined. The gold surface was chemically modified with a self-assembled monolayer of thiols (SAMs) and, by means of successive reactions, they get bonded covalently to the thiols monolayer, ligands with chelates metallic ion groups (derived from the nitrilotriacetic acid, ANTA) which show affinity by surface receptors generated in a genetic enzyme via engineering techniques. The obtained results showed the good sensitivity, specificity and stability of the used electrochemical techniques in this work.

Key words: Modified gold electrodes, thiol self-assembled monolayers, SAMs, horseradish peroxidase immobilization.

Modificación de superficies de oro para la inmovilización orientada de peroxidasa de rábano recombinante

Resumen

Hilos de oro de 0,50 mm de diámetro y longitud de 25 mm, se utilizaron como electrodos de trabajo. Estos electrodos fueron caracterizados electroquímicamente y determinadas sus áreas efectivas. La superficie de oro fue modificada químicamente con monocapas autoensambladas de tioles (SAMs) y mediante reacciones sucesivas se van uniendo covalentemente a la monocapa de tioles, ligandos con grupos quelantes de iones metálicos (derivados del ácido nitrilotriacético, ANTA) que muestran afinidad por receptores superficiales generados en una enzima mediante técnicas de ingeniería genética. Los resultados obtenidos mostraron buena sensibilidad, especificidad y estabilidad con las técnicas electroquímicas utilizadas en este trabajo.

Palabras clave: Electrodo de oro modificado, monocapas autoensambladas de tioles, inmovilización de peroxidasa de rábano.

Introducción

Un elemento muy importante en el desarrollo de un electrodo enzimático es la integración de la enzima con el electrodo para conseguir una co-

municación óptima entre ambos componentes. Los métodos tradicionales, tales como atrapamiento en hidrogeles generados *in situ*, adsorción mediante interacciones hidrófobas o iónicas, etc., son de difícil control y poco reproducibles,

además no aseguran una orientación adecuada de la enzima con respecto a la superficie del electrodo. Un método de inmovilización ideal debería dar lugar a un recubrimiento controlado de biomoléculas unidas específicamente, reversiblemente y en determinadas circunstancias orientadas a voluntad. En el campo de las enzimas, la reversibilidad permitiría la sustitución de moléculas de proteínas inactivas por otras nuevas activas; la especificidad, permitiría la inmovilización selectiva de una proteína dada de entre las presentes en una mezcla compleja evitando purificaciones previas; la inmovilización orientada de las proteínas, eliminaría impedimentos estéricos para la accesibilidad del sustrato al centro activo. A las anteriores características podría sumarse el poder controlar, a conveniencia, la reversibilidad de la unión enzima-soporte [1-3]. Como consecuencia en los últimos años se han desarrollado nuevas líneas de investigación tendientes a alcanzar metas que impliquen una buena reversibilidad, especificidad e inmovilización orientada de la enzima. Entre ellas cabe destacar los esfuerzos para controlar la orientación de las moléculas de enzima con respecto a la superficie del electrodo a través de una inmovilización mediante interacciones específicas del tipo ligando-receptor [2-5]. Este es el tipo de estrategia utilizada en la presente investigación. Para ello se ha empleado la técnica de recubrimiento de superficies de oro con monocapas autoensambladas de tioles (SAM) generadas por simple inmersión de oro limpio en una disolución de un tiol adecuado. Partiendo de ácidos tio-carboxílicos, mediante reacciones sucesivas se han unido covalentemente a la monocapa de tioles ligandos con grupos quelantes de iones metálicos (derivados del ácido nitrilotriacético, ANTA) que muestran afinidad por receptores superficiales generados en un enzima mediante técnicas de ingeniería genética. Es importante mencionar que la incubación del electrodo modificado en soluciones acuosas de iones de metales de transición tales como: Co^{+2} , Ni^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} da lugar a la formación en los extremos de las cadenas de la monocapa, de quelatos hexadentados de los que 4 ligandos son aportados por el ANTA y dos por la proteína (Figura 1) [6]. De entre ellos, para el presente trabajo se ha elegido el catión Co(II) por presentar una menor constante de formación ($\text{p}K = 10,4$), lo que se traduce en una estabilidad mode-

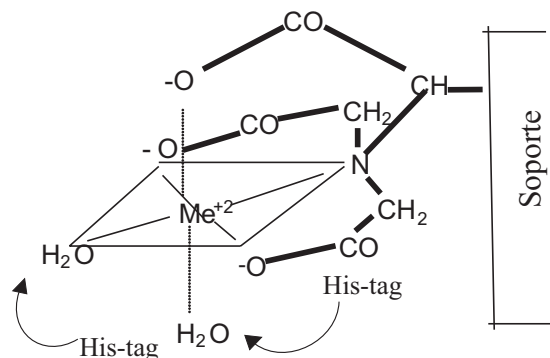


Figura 1. Estructura del complejo ANTA- Me^{+2} sobre un soporte sólido. Las flechas indican los lugares donde se unen las moléculas de polihistidina (His-tag).

rada de la unión metal-proteína favoreciendo la ruptura de los enlaces Co(II) -proteína en condiciones poco drásticas, tales como concentraciones moderadas de imidazol y pH neutro o ligeramente básico. La anterior es una condición muy importante para el estudio de la reversibilidad de la unión Co(II) -proteína, así como para estudiar la estabilidad de la unión Co^{+n} -proteína en función del estado redox del ión metálico (investigación en curso). En el laboratorio en el que se ha llevado a cabo esta investigación se ha venido trabajando desde hace una década en la preparación de dispositivos experimentales que permitan evaluar la bondad de estas afirmaciones.

La plataforma de base en la que se ha apoyado esa investigación ha sido la estructura molecular ordenada bidimensionalmente que se obtiene tras la quimisorción oxidativa de tioles sobre superficies de oro, uno de los ejemplos mejor caracterizados de sistemas autoensamblados por quimisorción [7, 8]. La enzima utilizada en el presente estudio ha sido la peroxidasa de rábano (*horseradish peroxidase*, HRP) a la que se ha añadido una cola de seis histidinas en el extremo N-terminal de la proteína ($\text{HRP}_{\text{rec-N}_{\text{His}}}$). Esta enzima cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno a agua con electrones suministrados directamente por el electrodo o a través de mediadores redox difusibles que transportan los electrones desde la superficie del electrodo al centro activo de la enzima, un anillo porfirínico. Se utilizó como control la HRP nativa, la cual carece de motivos repetitivos de histidina. Todas las modificaciones realizadas en la superficie del electrodo

han sido comprobadas previamente con técnicas de voltametría cíclica por otros autores [9-14] y otras técnicas, entre las que podemos mencionar: espectroscopia de fotoelectrón de rayos X (XPS) [12, 14, 15], resonancia paramagnética de electrón (EPR) [13] y absorción atómica de plasma (ICP) [12].

El objetivo de esta investigación es diseñar un procedimiento de preparación de electrodos enzimáticos, basado en la utilización de enzimas, a las que, mediante procedimientos de ingeniería genética, se les han creado motivos de afinidad específica para un ligando determinado, siendo de suma importancia el control de la orientación y mantener la actividad de la enzima una vez inmovilizada en la superficie de oro modificada.

Parte Experimental

Actividad enzimática de la peroxidasa de rábano HRP recombinante, modificada genéticamente con cola de seis histidinas (N_{His} rec-HRP)

La determinación de la actividad enzimática se realizó utilizando el método descrito por Bergmeyer [16] con guaiacol (2-metoxifenol) como sustrato, que en presencia de H_2O_2 da lugar a la reducción del centro activo de la enzima, de naturaleza no proteica (una unidad de actividad enzimática, U , es la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μmol de sustrato por minuto. Se utiliza también en combinación con otras unidades, U/mg de proteína o U/mL , para señalar, respectivamente, la actividad enzimática específica o la concentración de actividad enzimática). Las medidas se realizaron en PBS (tampón fosfato salino 50 mM) a pH 7,0 utilizando guaiacol 80 mM, H_2O_2 2 mM y disolución enzimática 0,3 μM en PBS. La medida se realizó a 25°C, observándose una disminución de la absorbancia a 419 nm, característica de la oxidación progresiva del guaiacol y representada por la aparición de un color anaranjado ($\epsilon_{419}=6,4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Medida de la concentración de proteínas

Como enzimas se han utilizado dos preparaciones de peroxidasa de rábano. Una producida naturalmente por el rábano (HRP nativa) y la

otra modificada genéticamente, a la que se le han introducido 6 moléculas de histidina en el extremo N-terminal de la cadena polipeptídica (N_{His} rec-HRP) la cual es expresada en *Escherichia coli* de acuerdo con el protocolo descrito [17, 18]. La masa molecular de la proteína modificada genéticamente es de 34 kDa y la actividad catalítica, medida colorimétricamente, es de 1.200 unidades/mg de proteína. Se llevó a cabo utilizando el método de Bradford [19] mediante el reactivo comercial Biorad y empleando como patrón sero albúmina bovina. Los experimentos para la determinación de la actividad enzimática y los mg de proteína total fueron realizados en un espectrómetro UV-visible Uvikon 940 de Kontron con baño termostático.

Medidas electroquímicas

La metodología empleada en la preparación de las monocapas de ácido ditióctico y su posterior derivatización se ha basado en la utilización de nuevas estrategias de inmovilización controlada de enzimas a superficies funcionalizadas de electrodos. Como técnica analítica de caracterización de las monocapas y sus derivados enzimáticos se ha empleado la voltametría cíclica en una celda convencional electroquímica de tres electrodos bajo atmósfera de nitrógeno en tampón fosfato 50 mM, KCl 0.1 M, pH 7,0.

Los experimentos electroquímicos se realizaron utilizando como electrodos de trabajo, electrodos de hilo de oro con 99,99% de pureza (Goodfellow), de 0,50 mm de diámetro y longitud aproximada de 25 mm sobre soportes de cobre cilíndricos de 5 mm de diámetro y 40 mm de longitud. Estos soportes se adaptaron a uniones esmeriladas de vidrio, con un hilo de tungsteno de 1 mm de diámetro y 80 mm de longitud en contacto eléctrico con el hilo de oro (por el extremo inferior) mediante una clema de ferretería, que hacía también de tope, garantizando así la misma longitud del hilo de oro. El soporte de vidrio presenta en su parte superior una salida de gases. Como electrodo auxiliar se utilizó un hilo de platino con 99,99% de pureza (Goodfellow), de 0,50 mm de diámetro y como electrodo de referencia Ag/AgCl, 3M en KCl. Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente, presión atmosférica y cuando fue necesario, atmósfera saturada de Nitrógeno, previamente purificado mediante

su paso por una columna rellena de catalizador BASF-R311 calentada a 180°C. La celda utilizada fue construida en vidrio, con un solo compartimiento y donde el electrodo de referencia estaba conectado mediante un puente salino conteniendo la solución de electrolito. El potenciostato fue un analizador BAS, modelo CV-50W conectado a un PC 486/DX2.

Limpieza de los electrodos

Los electrodos de hilo de oro se pasaron por la llama suave hasta el rojo vivo, se dejaron enfriar y posteriormente se pulieron con gamma-alúmina 3 (0,05 micron, Buehler). Se lavaron con agua bidestilada, se sonicaron durante 15 minutos en etanol-H₂O (2:1) y finalmente se secaron al aire.

Caracterización y determinación del área efectiva del electrodo

Se llevó a cabo mediante la realización de voltametrías cíclicas en medio ácido, sometiendo el electrodo de oro limpio a un barrido de potencial desde +0,5 V hasta +1,5 V en ácido sulfúrico 0,5 M, a velocidad de barrido 100 mV s⁻¹ y atmósfera de N₂. El área efectiva del electrodo se determinó integrando el área bajo el pico catódico característico del oro y próximo a + 0,9 V.

Formación de monocapas de tioles (SAMs)

El electrodo de hilo de oro, una vez calculada su área efectiva, se sumergió en una disolución 1mM de ácido DL-6,8-tióctico preparada en etanol-H₂O (2:1) durante 24 horas para formar una monocapa de ácido tióctico (SAM-TOA). Seguidamente se lavó con etanol-H₂O (2:1) durante 5 minutos y luego se secó al aire (Figura 2).



Figura 3. Activación de los grupos carboxílicos de la monocapa.

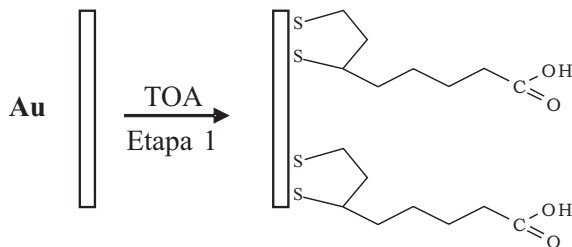


Figura 2. Formación de una monocapa de tioles.

Activación de los grupos carboxílicos de la monocapa

Se realizó sumergiendo el electrodo de SAM-TOA durante 3 horas en una solución de N-hidroxisuccinimida 0,1 M y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC) 0,1 M en dimetilsulfóxido, formándose SAM-TOA-EDAC. Finalmente se lavó 5 minutos en dimetilsulfóxido (Figura 3).

Acoplamiento del ligando

Se realizó la amidación de los ésteres de succinimida de la SAM-TOA-EDAC, introduciendo el electrodo en una disolución de ANTA 50 mM preparada en DMF-H₂O (1:1), formándose SAM-TOA-EDAC-ANTA. Seguidamente se lavó durante 5 minutos en agua bidestilada y se introdujo el electrodo unos segundos en KOH 0,1 M (Figura 4).

Formación del quelato metálico

Se llevó a cabo mediante la incubación del electrodo SAM-TOA-EDAC-ANTA en disolución acuosa de CoCl₂·6H₂O 40 mM durante 2 horas, obteniéndose así SAM-TOA-EDAC-ANTA-Co(II) en atmósfera saturada de nitrógeno. Finalmente se lavó el electrodo en agua bidestilada quedando

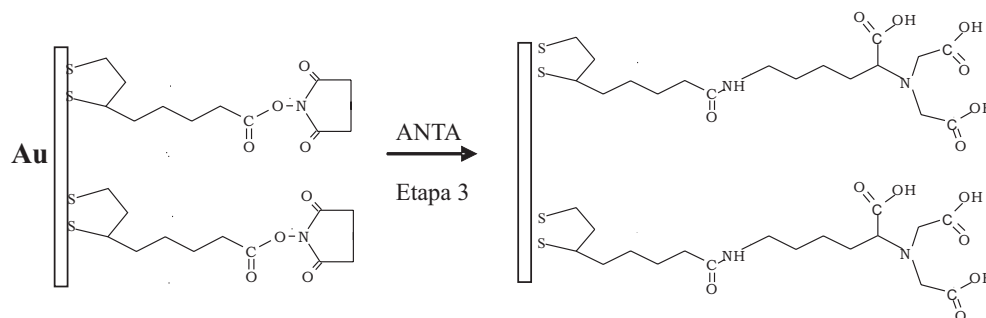


Figura 4. Acoplamiento del ligando ANTA.

así preparado para la posterior unión de la proteína (Figura 5).

Unión de la proteína peroxidasa de rábano HRP recombinante, modificada genéticamente con cola de seis histidinas (HRP- N_{His})

Los electrodos modificados [SAM-TOA-EDAC-ANTA-Co(II)] se incubaron en una disolución enzimática de la proteína 0,1 mg/mL en PBS a pH 8,0 durante 1 hora. Seguidamente se lavaron durante 5 minutos en la misma solución tampón y se colocaron en la celda electroquímica.

Caracterización electroquímica de los soportes de oro

La voltametría cíclica en H_2SO_4 0,5 M de un electrodo de oro preparado según el procedimiento descrito en la metodología, mostró los picos anódico y catódico del óxido. Estos picos se encuentran próximos a +1,1 y +0,9 V respectivamente, característicos de una superficie de oro policristalina limpia [20, 21]. A partir del pico de reducción a 0,90 V, se puede cuantificar el área de los electrodos, obteniéndose para los hilos de oro un valor de $0,18 \pm 0,05 \text{ cm}^2$ [11].

Ensayos electroquímicos

Los electrodos modificados [SAM-TOA-EDAC-ANTA-Co(II)] se colocaron en la celda electroquímica, previamente desoxigenada mediante burbujeo con corriente de N_2 , conteniendo 1.980 μL de PBS a pH 7,0 y 20 μL de tionina 1 mM, como mediador redox, realizando la voltametría cíclica tras incubación en HRP- N_{His} 7,7 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Posteriormente se añadió a la misma di-

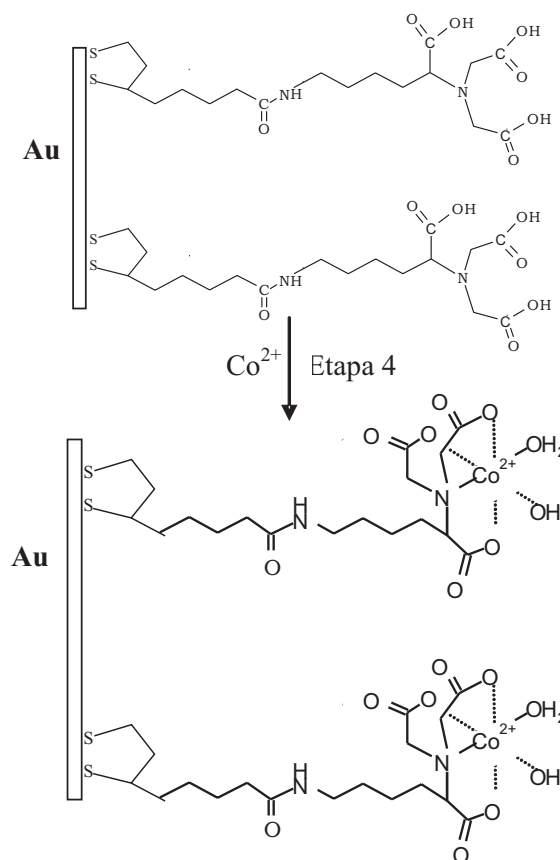


Figura 5. Formación de quelato metálico con Co(II).

solución H_2O_2 a diferentes concentraciones y se realizaron, en cada caso, nuevas voltametrías. Antes de medir el efecto catalítico se realizaron diferentes voltametrías con el fin de obtener las condiciones óptimas de trabajo, respecto a pH, concentración de tionina y concentración de peroxidasa.

Resultados y Discusión

Caracterización de las monocapas generadas por sondas electroquímicas

La construcción de la monocapa paso a paso ha sido caracterizada en nuestro laboratorio mediante la utilización de técnicas electroquímicas. Particularmente útil ha sido la voltametría cíclica utilizando dos especies electroactivas, ferricianuro de potasio y hexa amino-rutenio [9, 11-13]. En nuestro caso realizamos voltametrías cíclicas en electrodos de oro desnudo, modificados con monocapas SAM-TOA, con monocapas SAM-TOA-EDAC-ANTA y monocapas SAM-TOA-EDAC-ANTA-Co(II), en disoluciones 1mM de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$ y 1 mM de $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{+3}$ en KCl 1 M a pH 5,5. La velocidad de barrido fue de 100 mV s^{-1} y las ventanas de potencial de 400 a -100 mV y de 100 a -450 mV vs Ag/AgCl respectivamente. Los resultados obtenidos en las diferentes voltametrías cíclicas con ambas disoluciones, se observan en la Tabla 1.

Estos resultados muestran un comportamiento reversible en ambas disoluciones para el electrodo de oro desnudo. Con respecto al electrodo modificado con monocapa SAM-TOA, se observa la supresión de la respuesta del ferricianuro debido a la repulsión de cargas entre los carboxilatos y las cargas negativas del $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$. En este mismo electrodo, se obtiene una respuesta voltamétrica de $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{+3}$, no observando efecto alguno en el comportamiento de la curva voltamétrica respecto a la obtenida con electrodos de oro desnudos, sólo una pequeña diferencia en la variación del potencial de pico (ΔE_p). La caracterización electroquímica de la monocapa

SAM-TOA-EDAC-ANTA, también muestra la supresión de la respuesta del ferricianuro, observando en la respuesta voltamétrica del $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{+3}$ un valor de $\Delta E_p \approx 60 \text{ mV}$. En cuanto a la caracterización electroquímica de la monocapa SAM-TOA-EDAC-ANTA tras su incubación en disoluciones anaerobias de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, se restaura parcialmente la respuesta al ferricianuro, lo que indica la neutralización de los carboxilatos por la incorporación del metal. La respuesta al $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{+3}$, es similar a la obtenida en la monocapa SAM-TOA-EDAC-ANTA manteniendo el valor de ΔE_p .

Recubrimiento de las superficies de oro con monocapas autoensambladas de tioles (SAMs)

Los electrodos de oro se han modificado con una monocapa de ácido tióctico (SAM-TOA) por inmersión de éstos en una disolución 1 mM del tiol en etanol-agua (2:1). Trabajos previos han demostrado que estas monocapas son muy apropiadas para estudios electroquímicos, dada su buena estabilidad y permeabilidad a iones y moléculas de disolvente [16, 17]. Para comprobar si ha habido formación de la monocapa y estimar su integridad se efectuaron voltametrías cíclicas en KOH 0,5 M bajo corriente de N_2 con el electrodo modificado (SAM-TOA) en el rango entre -0.2 hasta -1.2 V vs Ag/AgCl, estimándose el recubrimiento de la superficie por átomos de azufre mediante integración de las corrientes de desorción reductivas experimentales. En la Figura 6 se muestra el voltamograma cíclico de desorción, donde se observa una onda próxima a $-0,9 \text{ V}$ característica de los tiocompuestos adsorbidos sobre oro.

Tabla 1
Potenciales obtenidos con disoluciones de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$ 1 mM y $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{+3}$ 1 mM para los electrodos desnudos y modificados

	Electrodo $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$ 1 mM		Ru(NH_3) $_6^{+3}$ 1 mM	
	Potencial catódico (mV)	Potencial anódico (mV)	Potencial catódico (mV)	Potencial anódico (mV)
Oro desnudo	150	210	-180	-120
SAM-TOA	-	-	-150	-100
SAM-TOA-EDAC-ANTA	-	-	-210	-150
SAM-TOA-EDAC-ANTA-Co(II)	130	410	-210	-150

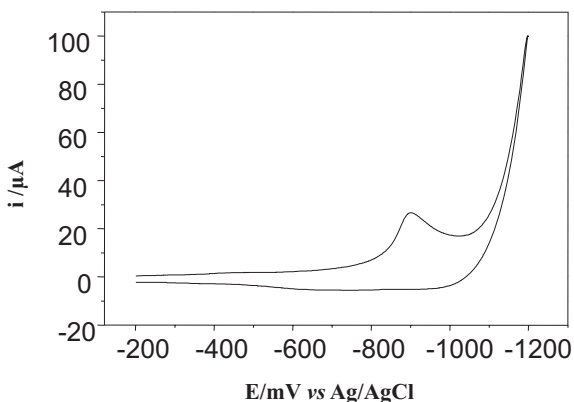


Figura 6. Voltamograma cíclico típico de desorción reductiva en KOH 0,5 M de un electrodo de hilo de oro modificado con SAM-TOA. Velocidad de barrido 100 mV s^{-1} . Atmósfera de N_2 .

Para estimar el recubrimiento de la superficie por átomo de azufre, se determina el área, amperios. milivoltios (A.mV) bajo la curva del pico de desorción y al dividir entre la velocidad de barrido (100 mV s^{-1}), obtenemos el valor de la carga en coulombios (C). Como se sabe, la carga de un electrón es igual a $1,602 \times 10^{-19} \text{ C}$., con lo que se calcula el número de electrones correspondiente a la carga antes estimada. Relacionando estos electrones con el número de Avogadro ($6,02 \times 10^{23}$ moléculas) y dividir este valor entre el área geométrica del electrodo de oro (obtenida de la voltametría cíclica en H_2SO_4 0,5 M), se obtienen los moles de átomo de azufre quimisorbidos a la superficie de oro, obteniéndose un valor de $(7,5 \pm 0,5) \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ ($n = 8$).

Es importante mencionar que la disponibilidad de electrodos recubiertos con monocapas muy estables es un factor fundamental para el éxito en la preparación de electrodos enzimáticos que deben soportar moléculas de proteína de elevado peso molecular. Resultados previos del laboratorio demostraron que la incorporación de enzima β -galactosidasa con motivos de unión a colina en superficies de oro funcionalizadas con SAM-TOA-colina persistía varios meses después de su preparación [12]. Asimismo los resultados descritos en este trabajo con electrodos recubiertos con monocapas de ANTA-Co(II) a los que se ha unido el enzima HRP- N_{His} y que habían sido almacenados en nevera durante más de 1 año,

mostraron una monocapa intacta así como actividad residual de peroxidasa, a pesar de que previamente había sido medida su actividad repetidas veces.

Actividad de la enzima inmovilizada sobre electrodos modificados con monocapa SAM-TOA-EDAC-ANTA-Co(II)

El valor de $\text{pH} = 7,0$ fue seleccionado de la bibliografía consultada [24-28]. Con respecto a la concentración de tionina se realizaron VC a diferentes concentraciones de ésta manteniendo el H_2O_2 en 1 mM y la peroxidasa en $7,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Los resultados obtenidos mostraron un aumento de la intensidad de pico con la concentración de tionina, alcanzando un *plateau* a partir de $10 \mu\text{M}$ de tionina. Este comportamiento es característico de un proceso electrocatalítico atribuible a la presencia de enzima activa incorporada al electrodo funcionalizado. En cuanto a la concentración de H_2O_2 también se realizaron VC a diferentes concentraciones manteniendo la tionina en $10 \mu\text{M}$ y la peroxidasa en $7,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Los resultados mostraron un aumento lineal de la intensidad de pico con la concentración de H_2O_2 alcanzando un máximo en 1 mM y descendiendo de manera progresiva a partir de este valor.

La Figura 7 muestra voltamogramas cíclicos obtenidos con uno de estos electrodos en presencia del mediador tionina $10 \mu\text{M}$ registrados antes (trazo a) y después de añadir H_2O_2 a una concentración final 0.2 mM (trazo b). En esta reacción enzimática la molécula de HRP transfiere dos electrones al H_2O_2 según el siguiente esquema, en el que las etapas 1 y 2 son enzimáticas y la etapa 3 electroquímica:

- 1) $\text{HRP} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{HRP(I)} + \text{H}_2\text{O}$
- 2) $\text{HRP(I)} + \text{S} \rightarrow \text{HRP(II)} + \text{S}^{\bullet}$
- 3) $\text{HRP(II)} + \text{S} \rightarrow \text{HRP} + \text{S}^{\bullet} + \text{H}_2\text{O}$,

donde HRP es la enzima reducida y HRP(I) y (II) son las formas intermedias oxidadas. S y S^{\bullet} son el sustrato donador de electrones, en este caso tionina, y el producto radical de su oxidación mono-electrónica respectivamente [25-27]. En este sentido podemos decir que la actividad enzimática, y por tanto la inmovilización de esta enzima,

puede seguirse electroquímicamente mediante la utilización de mediadores redox solubles. Además, en presencia de H_2O_2 , 0.2 mM, la onda voltamétrica del mediador (trazo a) se ha convertido en una onda de corriente que responde a una transferencia de carga reversible con control mixto, catalítico y difusional. Esta onda muestra un pico muy acusado de corriente a un potencial muy similar al del potencial estándar del mediador (trazo b). A concentraciones superiores de sustrato (trazos c y d), la curva de corriente en forma de pico va cambiando progresivamente a curvas en *plateau* lo que indica que la concentración de sustrato es lo suficientemente alta como para mantenerse igual a la del *bulk* entrando en un régimen en el que controla la reacción enzimática. A medida que aumenta la concentración de H_2O_2 , se observa en paralelo al cambio de forma de la onda voltamétrica, una disminución del valor de la corriente del *plateau* debido al bien conocido efecto inhibitor de la peroxidasa por su sustrato H_2O_2 (Figura 8). Es de mencionar que en ausencia de tionina no se observa corriente catalítica alguna lo que indica la ausencia de transferencia directa de electrones entre el grupo prostético de la enzima y la superficie del electrodo.

Especificidad de la unión a través de la cadena de polihistidinas

Con respecto a la especificidad de la unión a través de la cadena polipeptídica, se utilizó la peroxidasa nativa como control para establecer si realmente la incorporación de la proteína modificada $\text{HRP-N}_{\text{His}}$ a la monocapa con motivos ANTA-Co(II) se lleva a cabo a través de las colas de histidinas. Los resultados obtenidos se pueden apreciar en la Figura 9, donde se observa que los electrodos incubados en HRP nativa, en presencia de tionina y H_2O_2 muestran una corriente catalítica residual [voltamograma (b)], con un valor de corriente de pico catódica de $1,26 \mu\text{A}$ y el pico de corriente anódica tiende a desaparecer, casi indistinguible del voltamograma del mediador tionina en ausencia de peróxido de hidrógeno [voltamograma (a)], en claro contraste con el trazo c que corresponde a un electrodo similar pero incubado con la enzima modificada con colas de histidina, donde se alcanza un valor de $23,7 \mu\text{A}$ [voltamograma (c)]. En el recuadro insertado en

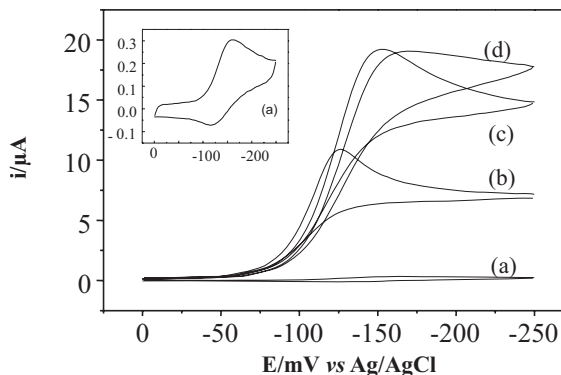


Figura 7. Voltamogramas cíclicos de electrodos de oro modificados con monocapas SAM-TOA-EDAC-ANTA-Co(II) tras incubación en N_{His} rec-HRP $7,7 \text{ ig.mL}^{-1}$. Con H_2O_2 : (a) 0, (b) 0,20 mM. (c) 0,60 mM. (d) 1 mM. Tionina $10 \mu\text{M}$. PBS a pH 7,0. Velocidad de barrido 5 mV s^{-1} . Atmósfera de N_2 .

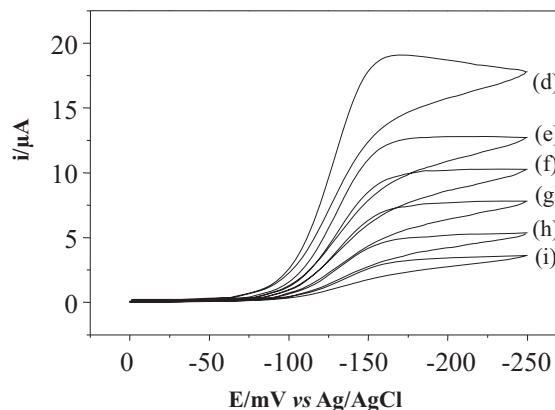


Figura 8. Voltamogramas cíclicos de electrodos de oro modificados con monocapas SAM-TOA-EDAC-ANTA-Co(II) tras la incubación en N_{His} rec-HRP $7,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Con H_2O_2 : (d) 1 mM, (e) 1,8 mM. (f) 2,4 mM. (g) 3,6 mM. (h) 6 mM. (i) 12 mM. Tionina $10 \mu\text{M}$. PBS a pH 7,0. Velocidad de barrido 5 mV s^{-1} . Atmósfera de N_2 .

la Figura 9, se muestran los voltamogramas (a) y (b), en una escala ampliada donde se aprecia mejor la corriente catalítica residual obtenida con un electrodo incubado en $\text{HRP}_{\text{nativa}}$.

Una respuesta catalítica tan débil indica que la proteína sin cola de histidinas se inmoviliza sobre el electrodo probablemente de forma

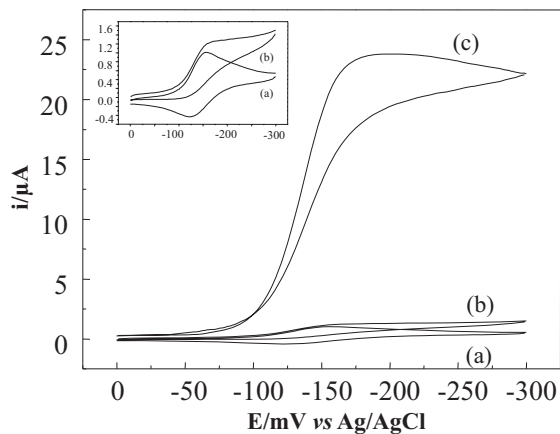


Figura 9. Voltamogramas cíclicos de electrodos de oro con monocapas SAM-TOA-EDAC-ANTA-Co(II) tras incubación en HRP $7.7 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. (a) HRP_{nativa} en ausencia de H_2O_2 . (b) Con HRP_{nativa} y H_2O_2 1 mM. (c) Con HRP_{rec-N_{His}} y H_2O_2 1 mM. Tionina 10 μM . PBS a pH 7,0. Velocidad de barrido 5 mV s^{-1} .

inespecífica, ya que una vez lavado el electrodo con PBS a pH 7,0 la señal tiende a desaparecer, a diferencia del electrodo modificado con HRP-N_{His} que retiene una corriente catódica considerable tras los lavados.

Conclusiones

Las monocapas de ácido ditióctico autoensambladas por quimisorción sobre oro, tras su activación con N-hidroxisuccinimida, prometen ser una buena plataforma para la síntesis de interfases idóneas que permiten la unión específica de macromoléculas biológicas a soportes de oro policristalino.

La especificidad de la unión entre secuencias repetitivas de histidinas en la proteína y los complejos octaédricos de iones cobalto con vacantes de coordinación, queda demostrada dado que cuando se utilizó la peroxidasa nativa como control, se obtuvo una respuesta catalítica muy débil probablemente debido a una unión inespecífica.

Con las condiciones de trabajo establecidas, podemos decir que los resultados obtenidos muestran un comportamiento característico de un proceso electrocatalítico atribuible a la presencia de enzima activa incorporada al electrodo

funcionalizado, dado que una vez inmovilizada la enzima modificada con colas de histidina pudimos observar la respuesta catalítica, lo cual no ocurre cuando la peroxidasa no presenta colas de histidina.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Instituto de Catálisis y Petroleoquímica del CSIC (Madrid-España) y a la Universidad de Los Andes (Mérida-Venezuela) por la colaboración prestada en la realización de este trabajo. Igualmente agradecen a la Dra. Elena E. Ferapontova y a la Dra. Irina Gazaryan de la Moscow State University por la preparación y donación de las proteínas modificada y nativa respectivamente.

Referencias Bibliográficas

1. Lu, B.; Xie, J.; Lu, C.; Wu, C. y Wei, Y., "Oriented Immobilization of Fab' Fragments on Silica Surfaces", *Anal. Chem.*, 67, (1995), 83-87.
2. Hong, H.G.; Jiang, M.; Sligar, S.G. y Bohn, P.W. "Cysteine-Specific Surface Tethering of Genetically Engineered Cytochromes for Fabrication of Metalloprotein Nanostructures", *Langmuir*, 10, (1994), 153-158.
3. Stayton, P.S.; Olinger, J.M.; Jiang, M.; Bohn, P.W. y Sligar, S.G., "Genetic Engineering of Surface Attachment Sites Yields Oriented Protein Monolayers", *J. Am. Chem. Soc.*, 114, (1992), 9298-9299.
4. Darder, M. M., "Estrategias de Inmovilización de Enzimas Redox en el Desarrollo de Biosensores Amperométricos", Tesis Doctoral, (2000), Universidad Autónoma de Madrid. Madrid (España).
5. Willner, I. y Katz, E., "Integration of Layered Redox Proteins and Conductive Supports for Bioelectronic Applications", *Angew. Chem. Int. Ed.*, 39, (2000), 1180-1218.
6. Gaberc-Porekar, V. y Menart, V. "Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography". *J. of Biochem. Biophys. Methods*, 49, (2001), 335-360.
7. Zhong, CH-J. y Porter, M.D., "Designing Interfaces at the Molecular Level", *Anal. Chem.*, 67, (1995), 709A-715A.

8. Ulman, A., "Self-Assembled Monolayers", en: *An Introduction to Ultrathin Organic Films from Langmuir-Blodgett to Self-Assembly*, Academic Press, Inc., San Diego.(1991), 237-304.
9. Matheus P., "Diseño y Preparación de Electrodo Enzimáticos Basados en Interacciones Específicas: Desarrollo de Estrategias para su Estabilización", Tesis Doctoral, (2003), Universidad Autónoma de Madrid. Madrid (España).
10. Madoz-Gúrpide, J.; Abad, J.M.; Fernández-Recio, J.; Vélez, M.; Vázquez, L.; Gómez-Moreno, C. y Fernández, V.M., "Modulation of Electroenzymatic NADPH Oxidation Through Oriented Immobilization of Ferredoxin:NADP⁺ Reductase onto Modified Gold Electrodes", *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, (2000), 9808-9817.
11. Madoz J., "Funcionalización de Electrodo de Oro para la Inmovilización Específica, Orientada y Reversible de Enzimas Manipulados Genéticamente: Su Aplicación en el Desarrollo de Biosensores", Tesis Doctoral, (1998), Universidad Autónoma de Madrid. Madrid (España).
12. Madoz, J., Kuznetsov, B.A.; Medrano, F.J.; García, J.L. y Fernández, V.M., "Functionalization of Gold Surfaces for Specific and Reversible Attachment of a Fused β -Galactosidase and Choline-Receptor Protein", *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, (1997), 1043-1051.
13. Krysinski, P. y Brzostowska-Smolka, M., "Three-Probe Voltammetric Characterization of Octadecanethiol Self-Assembled Monolayer Integrity on Gold Electrodes". *J. Electroanal. Chem.*, **424**, (1997), 61-67.
14. Porter, M.D.; Bright, T.B.; Allara, D.L. Y Chidsey, C.E.D., "Spontaneously Organized Molecular Assemblies. 4. Structural Characterization of n-alkyl thiol Monolayers on Gold by Optical Ellipsometry, Infrared Spectroscopy, and Electrochemistry", *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, (1987), 3559-3568.
15. Wagner, C. D.; Riggs, W. M.; Davis, L. E. y Moulder, J. F. en: "Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy", Muilenberg, G. E., ed., Perkin-Elmer Corp., Eden Prairie, MN (1979).
16. Bergmeyer, H.U.; Gawehn, K. y Graßl, M., "Enzyme als Biochemische Reagentien" in: *Methoden der enzymatischen Analyse*, (I) Verlag Chemie, Weinheim. (1970), 526-528.
17. Grigorenko, V.; Chubar, T.; Kapeliuch, Y.; Borchers, T.; Spener, F. y Egorov, A., "New Approaches for Functional Expression of Recombinant Horseradish peroxidase C in *Escherichia coli*", *Biocatalysis and Bio-transformation*, **17**, (1999), 359-379.
18. Egorov, A.M.; Gazaryan, I.G.; Kim, B.B.; Doseeva, V.V.; Kapeliuch, J.L.; Vervovkin, A.N. y Fechina, V.A., "Horseradish peroxidase isozyme C.A. comparative study of native and recombinant enzyme produce by *E. coli* transformants. *Annals New York Academy of Sciences*, **721**, (1994), 73-82.
19. Bradford, M. M., "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal. Biochem.*, **72**, (1976), 248-254.
20. Abad, J.M.; Vélez, M.; Santamaría, C.; Guisán, J.M.; Matheus, P.R.; Vázquez, L.; Gazaryan, I.; Gorton, L.; Gibson, T. y Fernández, V.M., "Immobilization of Peroxidase Glycoprotein on Gold Electrodes Modified with Mixed Epoxy-Boronic Acid Monolayers", *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, (2002), 12845-12853.
21. Malem, F. y Mandler, D., "An easy method to prepare gold electrodes", *J. Electrochem. Soc.*, **139**, **7**, (1992), L65.
22. Vijayamohanan, K. y Aslam, M., "Applications of Self-Assembled Monolayers for Biomolecular Electronics", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **96**, (2001), 25-39.
23. Flink, S.; Van Veggel, F.C.J.M. y Reinhoudt, D.N., "Sensor Functionalities in Self-Assembled Monolayers", *Adv. Mater.*, **12**, (2000), 1315-1328.
24. Limoges, B.; Moiroux, J. y Savéant, J.-M., "Kinetic Control by the Substrate and the Cosubstrate in Electrochemically Monitored Redox Enzymatic Immobilized Systems. Cat-

- alytic Responses in Cyclic Voltammetry and Steady State Techniques”, *J. Electroanal. Chem.*, 521, (2002), 8-15.
25. Abad, J. M., “La Microbalanza de Cristal de Cuarzo como Transductor en el Desarrollo de Biosensores”, Tesis Doctoral, (2000), Universidad Autónoma de Madrid. Madrid (España).
26. Gorton, L.; Lindgren, A.; Larsson, T.; Munteanu, F. D.; Ruzgas, T. y Gazaryan, I. “Direct electron transfer between hemo-containing enzymes and electrodes as basis for third generation biosensors”, *Anal. Chim. Acta*, 400, (1999), 91-108.
27. Ruzgas, T.; Csöregi, E.; Emnéus, J.; Gorton, L. y Marko-Varga, G. “Peroxidase-Modified Electrodes: Fundamentals and Application”, *Anal. Chim. Acta*, 330, (1996), 123-128.
28. Pandey, P. C.; Upadhyay, S.; Pathak, H. C. y Pandey, C. M. D. “Sensitivity, selectivity and reproducibility of some mediated electrochemical biosensors/sensors”. *Anal. Lett.*, 31, (1998), 2327-2348.

Recibido el 22 de Mayo de 2006

En forma revisada el 02 de Julio de 2007