

# ANEXOS

## I Protocolos

1. Protocolo para la selección de la solución de bloqueo
2. Protocolo para el desarrollo del biosensor enzimático
3. Protocolo para el desarrollo del biosensor plasmónico

## II Tablas de resultados

## III Abreviaturas

## I PROTOCOLOS:

SELECCIÓN DE LA SOLUCIÓN DE BLOQUEO
Se fija el antígeno de estudio en una placa de 96 pocillos
Incubación O/N a 4 °C
Se añade solución de bloqueo
Incubación de 2h a 37 °C
Se añade anticuerpo primario ( $\alpha$ -OVA o $\alpha$ -colágeno)
Incubación de 1h a 37 °C
Se añade anticuerpo secundario ligado a HRP (específico para Fc de ratón)
Incubación de 1h a 37 °C
Lavados con PBS+Tween 0,05% (3x, 5 min, 25 °C)
Lavados con PBS (3x, 5 min, 25 °C)
Se añade el sustrato de la peroxidasa: TMB
Se para la reacción con HCl 0,1 N
Se mide la señal de absorbancia a 450 nm en un lector de placas ELISA

**Tabla A1.** Protocolo seguido para seleccionar la solución de bloqueo, basado en el método ELISA.




BIOSENSOR ENZIMÁTICO
Se preparan las disoluciones Ag/Ab para dejar incubando 2h a 37 °C y O/N a 4 °C
Se fija antígeno en una placa de 96 pocillos
Incubación de 20 min a 37 °C
Se añade solución de bloqueo (leche en PBS o BSA en PBS)
Incubación de 2h a 37 °C
Centrifugación de las disoluciones Ag/Ab para quedarnos con el SN
Quitar solución de bloqueo y añadir SN de la centrifugación
Incubación de 3h a 37 °C
Lavados con PBS+Tween 0,05% (2x, 5 min, 25 °C)
Se añade anticuerpo secundario ligado a HRP
Incubación de 1h a 37 °C
Lavados con PBS+Tween 0,05% (3x, 5 min, 37 °C)
Lavados con PBS (3x, 5 min, 37 °C)
Se añade el sustrato de la peroxidasa: TMB
Se para la reacción con HCl 0,1 N
Se mide la señal de absorbancia a 450 nm en un lector de placas ELISA

**Tabla A2.** Protocolo seguido para desarrollar el biosensor enzimático, basado en el método ELISA.


BIOSENSOR PLASMÓNICO
Se preparan las disoluciones Ag/Ab para dejar incubando 2h a 37 °C y O/N a 4 °C
Se fija antígeno a la membrana
Incubación de 20 min a 37 °C
Se añade solución de bloqueo (leche en PBS)
Incubación de 2h a 37 °C
Centrifugación de las disoluciones Ag/Ab para quedarnos con el SN
Quitar solución de bloqueo y añadir SN de la centrifugación
Incubación de 2h a 37 °C
Se añade anticuerpo secundario biotinilado
Incubación de 1h a 37 °C
Lavados con PBS+Tween 0,5% (2x, 2 min, 25 °C)
Se añaden NNs funcionalizados con estreptavidina
Incubación de 30 min a 37 °C
Lavados con NaP 10 mM NaCl 0,3 M (2x, 5 min, 37 °C)
Lavados con PBS+Tween 0,5% (2x, 5 min, 37 °C)
Se irradia la muestra con láser NIR


**Tabla A3.** Protocolo seguido para desarrollar el biosensor plasmónico. La detección de antígeno se realiza de forma similar a un ELISA competitivo, pero la transducción de señal es llevada a cabo por los NNs.


## II TABLAS DE RESULTADOS:




Ensayo	OVA			Abs <sub>450nm</sub>
	Antígeno 	Ag/Ab 	Ag-Ab 	
1	0	0	0	0,0579
	0	0/1	1	0,0657
	1	0/1	1	3,8189
	1	0,2/1	0,8	3,8440
	1	0,4/1	0,6	3,8228
	1	0,6/1	0,4	3,8100
	1	0,8/1	0,2	3,7813
	1	1/1	0	3,7530
2	0	0	0	0,0554
	0	0/1	1	0,0548
	1	0/1	1	2,1417
	1	0,2/1	0,8	2,0953
	1	0,4/1	0,6	1,9581
	1	0,6/1	0,4	2,0625
	1	0,8/1	0,2	2,0291
	1	1/1	0	1,9332
3	0	-	0	0,0609
	0	0/1	1	0,0595
	1	0/1	1	0,2471
	1	0,2/1	0,8	0,2191
	1	0,4/1	0,6	0,2182
	1	0,6/1	0,4	0,2289
	1	0,8/1	0,2	0,2199
	1	1/1	0	0,2067
4	0	0/0	0	0,1203
	0	0/1	1	0,1071
	4	0/1	1	2,7156
	4	0,2/1	0,8	2,8921
	4	0,4/1	0,6	2,1207
	4	0,6/1	0,4	2,7124
	4	0,8/1	0,2	2,6417
	4	1/1	0	2,6728
	4	2/1	0	2,5292
	4	5/1	0	1,9162
	4	10/1	0	1,7365

**Tabla A4.** Resultados obtenidos durante la optimización del biosensor enzimático de OVA. Tanto las cantidades de antígeno fijado a la membrana como las del antígeno y anticuerpo incubados O/N son relaciones molares. Los valores en naranja corresponden a ensayos control. En los diferentes ensayos se varían las relaciones molares antígeno-anticuerpo, los tiempos y temperaturas de incubación y los lavados. Sin embargo, al medir la absorbancia a 450 nm, no se aprecia en ningún caso una respuesta lineal dependiente de la concentración de antígeno detectada.


Antígeno fijado a la membrana: 


Antígeno y anticuerpo incubado O/N: 


Anticuerpo libre teórico para unirse en el pocillo: 

Ensayo	Colágeno			Abs <sub>450nm</sub>
	Antígeno 	Ag/Ab 	Ag-Ab 	
1	0	-	0	0,2619
	0	0/1	1	0,5228
	1	0/1	1	0,9131
	1	0,2/1	0,8	1,1286
	1	0,4/1	0,6	1,0432
	1	0,6/1	0,4	0,8805
	1	0,8/1	0,2	1,0681
	1	1/1	0	0,9739
2	0	-	0	0,1091
	0	0/1	1	0,0826
	1	0/1	1	0,2236
	1	0,2/1	0,8	0,1699
	1	0,4/1	0,6	0,2357
	1	0,6/1	0,4	0,2488
	1	0,8/1	0,2	0,2759
	1	1/1	0	0,1950
3	0	-	0	0,0759
	0	0/1	1	0,0704
	0,5	0/1	1	0,0831
	1	0/1	1	0,1280
	3	0/1	1	0,3196
	5	0/1	1	0,4092
4	0	-	0	0,0699
	0	0/1	1	0,0720
	1	0/1	1	0,4776
	5	0/1	1	0,8791

**Tabla A5.** Resultados obtenidos durante la optimización del biosensor enzimático de colágeno. Tanto las cantidades de antígeno fijado a la membrana como las del antígeno y anticuerpo incubados O/N son relaciones molares. Los valores en naranja corresponden a ensayos control. En los diferentes ensayos se varían las relaciones molares antígeno-anticuerpo, los tiempos y temperaturas de incubación y los lavados. Sin embargo, al medir la absorbancia a 450 nm, no se aprecia en ningún caso una respuesta lineal dependiente de la concentración de antígeno detectada.

Antígeno fijado a la membrana: 

Antígeno y anticuerpo incubado O/N: 

Anticuerpo libre teórico para unirse en el pocillo: 

### III ABREVIATURAS:

$\alpha$ : “anti”

Ab: *Antibody* (Anticuerpo)

Ag: *Antigen* (Antígeno)

BSA: *Bovine Serum Albumin* (Albúmina de suero bovino)

EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (Ensayo de inmunosorbente ligado a enzima)

Fc: Fragmento cristizable

HRP: *Horseradish Peroxidase* (Peroxidasa de rábano)

IUPAC: *International Union of Pure and Applied Chemistry* (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada)

LSPR: *Localized Surface Plasmon Resonance* (Resonancia de plasmón de superficie localizado)

MES: Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico

NIR: *Near Infrared* (Infrarrojo cercano)

NNs: NanoNachos

NPs: NanoPartículas

NSs: *NanoSpheres* (Nanoesferas)

O/N: *OverNight*

OVA: Ovoalbúmina

PAGE: *Polyacrilamide Gel Electrophoresis* (Electroforesis en gel de poliacrilamida)

PBS: *Phosphate Buffered Saline* (Tampón fosfato salino)

PEG: Polietilenglicol

S-NHS: Sulfo-N-hidroxisuccinimida

SDS: Dodecilsulfato sódico

SEM: *Scanning Electron Microscope* (Microscopio electrónico de barrido)

SN: Sobrenadante

TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbencidina

UV-Vis: Ultravioleta-Visible