

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 232**

51 Int. Cl.:

G01N 21/77 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

B82Y 15/00 (2011.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.11.2009 E 09827053 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2015 EP 2368115**

54 Título: **Ensayo de detección de analito**

30 Prioridad:

21.11.2008 AU 2008906057

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

09.09.2015

73 Titular/es:

GENERA BIOSYSTEMS LIMITED (50.0%)

1 Dalmore Drive

Scoresby, Victoria 3179, AU y

THE UNIVERSITY OF MELBOURNE (50.0%)

72 Inventor/es:

POETTER, KARL FREDERICK;

NUHIJI, EDIN y

MULVANEY, PAUL

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 545 232 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Ensayo de detección de analito

5 Campo

La presente invención se refiere al campo de la detección de analitos: más particularmente, la presente invención se refiere a la detección de analitos rápida y sensible con biosensores mediante el uso de un ensayo basado en el modo de galería de murmullos (WGM).

10

Antecedentes

Los detalles biográficos de las publicaciones mencionadas por el autor en esta memoria descriptiva se recogen alfabéticamente al final de la descripción.

15

La referencia a cualquier técnica anterior en esta memoria descriptiva no es, y no debería interpretarse como, un reconocimiento ni cualquier forma de sugerencia de que esta técnica anterior forma parte del conocimiento general habitual en cualquier país.

20

Los modos ópticos circulares de los resonadores monolíticos se denominan "modos de galería de murmullos" (WGM) o "resonancias dependientes de la morfología" (MDR). Dichos modos o resonancias son trayectorias cerradas de luz (ondas luminosas verticales) apoyadas por las reflexiones internas totales procedentes de los bordes de un resonador. Un WGM se produce cuando las ondas luminosas verticales de un perfil de emisión en particular están confinadas por una reflexión interna casi total en el interior de la superficie de una cavidad esférica dieléctrica (Moller *et al*, Applied Physics Letters 83 (13): 2686 - 2688, 2003).

25

La tecnología de WGM se describe con detalle en la Publicación de Patente Internacional N° WO 2005/116615. La tecnología de WGM se basa, en parte, en el fenómeno de que los fluoróforos permiten la generación de un perfil distintivo de WGM. Los fluoróforos están incorporados en puntos cuánticos que son incorporados en las micropartículas por difusión o pueden ser incorporados durante su elaboración. El tipo de fluoróforo no está limitado, y puede ser, por ejemplo, un colorante orgánico, un lumóforo basado en tierras raras, un nanocristal semiconductor de diversas morfologías y composiciones, un material de fósforo u otro material que emite la luz cuando es iluminado. Después se une este fluoróforo o una mezcla del mismo a las partículas microesferoidales. Cuando un analito objetivo interactúa con un compañero de unión inmovilizado en la partícula microesferoidal, se modifica el perfil de WGM, permitiendo la detección del acontecimiento de unión.

30

35

El WGM sólo permite la emisión de ciertas longitudes de onda a partir de la partícula. El resultado de este fenómeno es que en las habituales amplias bandas de emisión (10 - 100 nm de ancho) de, por ejemplo, un fluoróforo, quedan constreñidas y aparecen como una serie de picos afilados correspondientes efectivamente a los patrones de luz de modo vertical dentro de la partícula. El perfil de WGM es extremadamente sensible a los cambios en la superficie de la partícula microesferoidal y el perfil de WGM se modifica cuando la partícula microesferoidal interactúa con los analitos o con las moléculas de su entorno.

40

La detección de analitos raros en muestras de origen diverso requiere un medio de detección sensible, versátil y práctico. Existe una necesidad de idear métodos para aumentar la sensibilidad, la versatilidad y la practicidad del WGM para la detección de analitos.

45

Nuhui *et al.* (Small 2007, vol. 3, no. 8, páginas 1408 - 1414) divulgan el uso de microesferas de sílice funcionalizadas en la detección basada en WGM de analitos de ácidos nucleicos.

50

Sumario

La presente invención proporciona un método sensible y reactivos basados en ensayos de detección con el modo de galería de murmullos (WGM) para la detección de analitos de ácidos nucleicos en un medio acuoso.

55

En particular, la aspiración de la presente invención es describir un método mediante el cual los analitos de ácidos nucleicos no marcados pueden ser detectados rutinariamente en un medio acuoso mediante la explotación de las sensibilidades de los WGM en el entorno. La referencia a un medio tal como un líquido y un gas incluye soluciones acuosas y tampones biológicos, y aire.

60

El método y los reactivos de la presente invención se basan, por un lado, en la inesperada determinación de que el recubrimiento de microesferas con un fluoróforo *per se*, por oposición a mediante el uso de puntos cuánticos individuales, mejora la sensibilidad de la detección basada en el WGM. Por otro lado, la selección de una partícula, tal como una partícula con grupos químicos funcionalizados en su superficie, aumenta cuando se produce el recubrimiento tanto con puntos cuánticos como con un fluoróforo directo. Aún por otro lado, la partícula se elige con

65

un índice de refracción mayor con respecto al medio en el que se lleva a cabo el ensayo. En una forma de realización, la partícula microesferoidal tiene un índice de refracción mayor de 1,40.

Consecuentemente, la presente invención concierne a un método de detección de un analito de ácido nucleico en una solución acuosa, método que comprende someter microesferas de melamina formaldehído recubiertas con un fluoróforo y una multiplicidad de ligandos de ácidos nucleicos a un medio de detección de WGM para la identificación de un acontecimiento de unión entre los ligandos y el analito que se une al ligando, en el que las microesferas tienen un índice de refracción mayor que el medio que comprende el analito. En una forma de realización, la partícula microesferoidal tiene un índice de refracción mayor de 1,40.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la invención comprende un método para la detección de un analito en una solución acuosa, que comprende las etapas de:

- (i) anclar una multiplicidad de ligandos de ácidos nucleicos al analito de ácido nucleico a una población de partículas microesferoidales de melamina formaldehído que están marcadas con un fluoróforo o que comprenden un punto cuántico;
- (ii) poner en contacto las partículas microesferoidales con una muestra de control negativo y determinar un espectro del momento inicial;
- (iii) poner en contacto las partículas microesferoidales con una muestra que supuestamente comprende el analito de ácido nucleico durante un tiempo y en unas condiciones suficientes para facilitar un acontecimiento de unión entre el analito de ácido nucleico y su respectivo ligando; y
- (iv) someter las partículas microesferoidales a un medio de detección de modos de galería de murmullos (WGM) para la detección de un acontecimiento de unión.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un método para la detección de un acontecimiento de unión entre un analito de ácido nucleico y un ligando de ácido nucleico en una solución acuosa, que comprende las etapas de: (i) anclar una multiplicidad de ligandos de ácidos nucleicos a una población de partículas microesferoidales de melamina formaldehído marcadas con un fluoróforo o marcadas con un punto cuántico; (ii) poner en contacto las partículas microesferoidales con una muestra de control negativo y determinar un espectro del momento inicial; (iii) poner en contacto las partículas microesferoidales con una muestra que supuestamente comprende el analito de ácido nucleico durante un tiempo y en unas condiciones suficientes para facilitar un acontecimiento de unión entre el analito de ácido nucleico y su respectivo ligando; y (iv) someter las partículas microesferoidales a un medio de detección de WGM para la detección de un acontecimiento de unión.

Los ligandos anclados a las partículas microesferoidales son moléculas de ácidos nucleicos y los analitos que se van a detectar pueden ser moléculas de ácidos nucleicos complementarios.

En otra forma de realización, el ligando de ácido nucleico y/o el analito es una molécula de ADN que comprende una secuencia de ADN monocatenario.

Otro aspecto de la presente invención proporciona el uso de un método que comprende las etapas de: (i) anclar una multiplicidad de ligandos de ácidos nucleicos a una población de partículas microesferoidales de melamina formaldehído marcadas con un fluoróforo o marcadas con un punto cuántico, en una solución acuosa (ii) poner en contacto las partículas microesferoidales con una muestra de control negativo y determinar un espectro del momento inicial; (iii) poner en contacto las partículas microesferoidales con una muestra que supuestamente comprende el analito durante un tiempo y en unas condiciones suficientes para facilitar un acontecimiento de unión entre el analito de ácido nucleico y su respectivo ligando; y (iv) someter las partículas microesferoidales a un medio de detección de WGM en la elaboración de un ensayo para la detección de un acontecimiento de unión entre un analito de ácido nucleico y un ligando de ácido nucleico.

En una forma de realización adicional, las microesferas pueden ser recicladas. Además, el ensayo puede llevarse a cabo en un tampón biológico o en un fluido biológico complejo.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos se denominan mediante un número identificador de la secuencia (ID. SEC. N°). Las ID. SEC. N° se corresponden numéricamente con los identificadores de secuencia <400> 1 (ID. SEC. N°: 1), <400> 2 (ID. SEC. N°: 2), etc. En la Tabla 1 se proporciona un sumario de los identificadores de secuencia.

En la Tabla 1 se proporciona un sumario de los identificadores de secuencia usados a lo largo de la memoria descriptiva en cuestión.

Tabla 1

Sumario de los identificadores de secuencia	
ID. DE SECUENCIAS Nº	DESCRIPCIÓN
1	oligonucleótido- <i>enl</i>
2	oligonucleótido - α - <i>enl</i>
3	oligonucleótido - α - <i>enl</i> de 40 bases
4	oligonucleótido - α - <i>enl</i> de 20 bases
5	oligonucleótido - α - <i>enl</i> de 10 bases
6	oligonucleótido - <i>Control</i> (secuencia objetivo aleatoria no específica)
7	Secuencia de ADN objetivo SNP humano - rs 10434
8	Secuencia de sonda de ADN complementario de SNP humano rs10434 - α -rs10434 A
9	Secuencia de sonda de ADN desparejado de SNP humano rs 0434 - α -rs10434 B
10	Región del SNP humano rs 10434
11	Cebador directo
12	Cebador inverso

Breve descripción de las figuras

- 5 Algunas figuras contienen representaciones o entidades en color. Las fotografías en color están disponibles previa solicitud al Titular de la Patente o en una Oficina de Patentes apropiada. Pueden aplicarse cargos si se obtiene a partir de una Oficina de Patentes.

10 La Figura 1 es una representación gráfica de un biosensor de ADN mediante WGM que muestra unos desplazamientos coherentes y medibles después de la unión. Estas mediciones se han llevado a cabo en una solución acuosa que contiene tampones de pH y un electrólito. Se observó un desplazamiento demostrable en el perfil de WGM para cada una de las microesferas 9, 10, 11 y 12 (A, B, C y D respectivamente) después de que las microesferas o las partículas microesferoidales se pusieran en contacto con un analito de ácido nucleico complementario del compañero de unión del analito de ácido nucleico anclado en la superficie de las microesferas. Cada una de las microesferas tenía un diámetro de 5,6 μ m.

15 La Figura 2 es una representación esquemática del medio de detección y del aparato de WGM.

20 La Figura 3 es una representación gráfica de espectros de WGM generados con una luz incidente de 6,3 μ W, de 50,2 μ W, de 214,5 μ W y de 1.160,5 μ W (A, B, C y D respectivamente). La fuente luminosa tenía una longitud de onda de 532 nm y el tiempo de exposición era de 200 ms.

25 La Figura 4 es una representación gráfica del perfil de WGM generado después de la iluminación de las partículas microesferoidales con luz incidente (532 nm, 50 μ W) durante 10, 60, 200 y 1.000 ms (A, B, C y D, respectivamente). La visibilidad disminuyó gradualmente hasta un tiempo de exposición de 5 segundos (E).

La Figura 5 es una imagen fotográfica de las partículas microesferoidales de la presente invención inmovilizadas en la superficie de un cubreobjetos de vidrio.

30 La Figura 6 es una representación fotográfica que muestra las etapas de la reacción química simplificadas mediante el uso de una partícula de sílice funcionalizada con grupos mercaptano. Mediante la unión covalente se consigue la conjugación fragmentos de nucleótidos-acriloilo marcados fluorescentemente. Este proceso da lugar a una fabricación robusta y rentable de microesferas fluorescentes que propagan los WGM.

35 La Figura 7 es una representación gráfica que muestra la gráfica de las posiciones de los picos de los cuatro picos principales de WGM a partir de una única microesfera, en función de la fase del ensayo en la que fueron registrados. La gráfica muestra claramente los principales desplazamiento hacia el rojo de los picos durante la hibridación, el desplazamiento hacia el azul durante la desnaturalización y de nuevo el desplazamiento hacia el rojo tras una exposición de nuevo al objetivo.

40 La Figura 8 es una representación fotográfica que muestra una visión general de la síntesis de partículas y del ensayo de hibridación mediante WGM. Parte A) indica las características clave de las microesferas de SiO₂ de 7,50 μ m modificadas con el oligonucleótido *enl* de 70 bases. TMR = colorante de marcaje de tetrametil rodamina;

Parte B) Preparación de la placa de ensayo de las partículas las partículas son inmovilizadas sobre el sustrato de hibridación, a lo que sigue la adquisición de la señal de emisión (pretratamiento); Parte C) Las placas de ensayo se tratan con una sonda de ADN o con una solución de control, seguido del lavado del sustrato y finalmente la adquisición de la señal de emisión; Parte D) La etapa final implica el análisis de las señales pre / post-emisión a partir de una única partícula, las posiciones de los picos del espectro adquirido se comparan para determinar el efecto de la solución de tratamiento.

La Figura 9 es una representación fotográfica que muestra los resultados de la señal de emisión típica de WGM y la espectroscopia de partícula única. Una señal de emisión típica capturada en el aire a partir de una partícula de sílice oligo-modificada de 7,50 μm mediante el uso de configuraciones de caracterización del WGM A) Acoplado a un espectrómetro Ocean Optics ($\pm 0,9$ nm) y B) a un espectrómetro Triax ($\pm 0,05$ nm); C) El concepto de espectroscopia de partícula única, el esquema muestra dos partículas, la microesfera marcada A y B cada una de la misma muestra, ambas partículas han sido modificadas químicamente de forma idéntica. Nótese que las señales de emisión adquiridas a partir de las partículas individuales son distintivamente únicas.

La Figura 10 es una representación gráfica que muestra los datos del desplazamiento espectral de una microesfera individual a partir de una selección de sensores usados en un ensayo de hibridación de ADNc basado en la concentración. A) Las posiciones de los picos están representadas antes (cajas con la línea verde continua) y después de la hibridación (estrellas lisas con la línea roja) frente a la concentración de ADNc referida con respecto a cuatro longitudes de onda de referencia. En las partículas seleccionadas se observó un desplazamiento en todas las señales de WGM después de la hibridación. Nótese los desplazamientos hacia el rojo reproducibles en los perfiles de modo resultantes cuando se hibridaron partículas oligo-modificadas de 70 bases con unas concentraciones de ADNc de entre 10^{-7} y 10^{-14} M, adicionalmente no era evidente ningún pico coherente en la muestra de control; B) Los desplazamientos ($\Delta\lambda$) en función de la concentración de ADNc. Los cálculos del error del desplazamiento del pico alrededor de la $\lambda_{\text{máx}}$ se calcularon como $\pm 0,44$ nm; C) Análisis de la posición del pico a partir de la misma partícula objetivo *en1* antes y después de la exposición a una muestra concentrada 10^{-18} M de ADN complementario no marcado. Los resultados indican cada desplazamiento hacia el rojo del pico fluorescente tras la exposición a la solución de la sonda de ADN no marcada con una concentración de attomoles.

La Figura 11 es una ilustración esquemática de la química de la reacción utilizada para funcionalizar las partículas en bruto de melamina formaldehído (MF) con fragmentos de oligonucleótido monocatenario marcado. Nótese que la reacción se completa en una única etapa a la temperatura ambiente mediante el uso únicamente de tampón. Los fragmentos se unen covalentemente a los grupos -NH de la superficie de la partícula.

La Figura 12 es una representación gráfica que muestra la excitación de la partícula conseguida mediante una lámpara de mercurio de 80 W y un bloque de filtro de 420 - 490 nm. Las señales de emisión capturadas en el aire y en agua a partir de microesferas oligo-modificadas (TMR) de 30 bases de 7,50 μm . A) Sílice; B) Melamina. Las microesferas se sumergieron en una única gota de Milli-Q y se analizaron espectralmente, y el agua se evaporó antes de tomar los escáneres en el aire. Nótese que en el ejemplo de la partícula de melamina excitada, después de la adición de agua todavía podía observarse la señal de emisión de WGM. Los espectros de momento inicial adquiridos a partir de una única partícula de MF de 7,52 μm antes de la funcionalización con el oligonucleótido, a través de una integración de 2 s mediante el uso de un espectrómetro TRIAX 550 ($\pm 0,05$ nm); C) Aire; D) Solución (Milli-Q H₂O).

La Figura 13 es una representación gráfica que muestra las mediciones de la señal de emisión, tomadas mediante el uso de lacas de ensayo derivadas de diversos materiales de composite; la excitación de la partícula se consiguió mediante una lámpara de mercurio de 80 W y un filtro de bloque de 420 - 490 nm. A) Placa en una disposición de sílice enrejillada; B) Placa de cultivo celular de 96 pocillos basada en polímero; C) Placa de policarbonato de 384 citopocillos; D) Placa de microtitulación de 384 pocillos de calidad óptica.

La Figura 14 es una representación gráfica que muestra el análisis de estabilidad térmica las partículas de MF de 7,52 μm funcionalizadas con un oligonucleótido (TMR). Las partículas se sumergieron en una solución con calor constante a 90 °C durante un período de 3 h en Milli-Q, en tampón o en MES (pH 5,4). Se recogió un WGM a partir de cada partícula del ensayo mediante la utilización de una lámpara de mercurio de 80 W y un bloque de filtro de 420 - 490 nm. Nótese que la partícula seleccionada calentada en MES muestra una notable reducción en su señal de emisión de WGM (espectros de puntos) con respecto a las partículas de MF oligo-modificadas seleccionadas tratadas con PBS (espectro negro) y tratadas con Milli-Q (espectro gris).

La Figura 15 es una representación gráfica que muestra el estudio de unión por hibridación termociclada. Se creó un gradiente de temperatura en dos etapas (37 °C - 72 °C) mediante el uso de una fase de microscopio termorregulada acoplada a la configuración confocal / TRIAX. El ADN objetivo (T_m de 71,2 °C) era complementario de los fragmentos objetivo rs10434 unidos a la partícula. Los ciclos de hibridación se completaron en una única microesfera con H₂O Milli-Q (control) y el ADN objetivo. Se capturó una señal fluorescente en cada gradiente de temperatura y se observó la $\Delta\lambda$. A) Ciclo de hibridación uno de Control; B) Ciclo de hibridación dos de Control; C) Ciclo de hibridación uno de la sonda objetivo; D) Ciclo de hibridación dos

de la sonda objetivo. Todos los picos fluorescentes se desplazaron hacia el azul a la temperatura máxima del ciclo (72 °C) [únicamente cuando está presente el ARN objetivo] y se desplazaron hacia el rojo cuando la temperatura de la fase era $< T_m$ de la sonda objetivo.

5 Las Figuras 16 (A) y (B) son representaciones gráficas que muestran (A) líneas continuas del WGM de las microesferas de melamina: las líneas continuas son los WGM de las microesferas de melamina formaldehído individuales obtenidos en el aire. Los espectros adquiridos en los medios acuosos se muestran con líneas discontinuas; (B) WGM de las microesferas de sílice: las líneas continuas son los WGM de las microesferas de sílice individuales obtenidos en el aire. Los espectros adquiridos en los medios acuosos se muestran con líneas discontinuas. La adquisición en agua produjo una fluorescencia muy leve y ningún WGM.

10 La Figura 17 es una representación gráfica del inmunoensayo de WGM del anticuerpo. Se inmovilizó una única partícula de MF de 7,52 μm funcionalizada con un anticuerpo $\alpha\text{-IgM}$ humano marcado con FITC en un único micropocillo. Todo el ensayo se llevó a cabo a la temperatura ambiente. La partícula no tratada fue excitada a través de un láser de Ar⁺ para obtener una señal de referencia, después se trató con Milli-Q seguido de IgM humana no marcada. Con respecto al WGM no tratado, el conjunto de picos representativos indica un típico desplazamiento hacia el rojo de varios nanómetros que se produjo después del tratamiento con la IgM. Se apreció un desplazamiento mínimo 30 min después de la adición. Los espectros se adquirieron mediante una configuración Triax 550 / CCD confocal (resolución espectral de $\pm 0,05$ nm).

20 Descripción detallada

A lo largo de esta memoria descriptiva, salvo que el contexto lo requiera de otra forma, se entenderá que la palabra "comprender", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", simplemente es la inclusión de un elemento o número entero o grupo de elementos o de números enteros establecidos, pero no la exclusión de ningún otro elemento o un número entero o grupo de elementos o de números enteros.

30 Según se usa en la actual memoria descriptiva, las formas singulares "un", "una" y "el / la" incluyen los aspectos plurales salvo que el contexto lo indique claramente de otro modo. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un ligando" incluye un único ligando así como dos o más ligandos; la referencia a "un analito" incluye un único analito así como dos o más analitos; la referencia a "el fluoróforo" incluye un único fluoróforo, así como dos o más fluoróforos; la referencia a "la invención" incluye aspectos individuales o múltiples de una invención; y así sucesivamente.

35 La presente memoria descriptiva describe una multiplicidad de compañeros de unión de analitos o ligandos conjugados con partículas microesferoidales recubiertas con un fluoróforo. Cuando se iluminan estas partículas emiten un espectro o perfil "de momento inicial" de los modos de galería de murmullos (WGM). Cada población de partículas microesferoidales tiene una firma de momento inicial única de los WGM. Este perfil del momento inicial es alterado por la unión de los analitos al compañero de unión del analito o ligando en la superficie de las partículas microesferoidales, provocando un desplazamiento detectable en el espectro de los WGM.

40 Las partículas microesferoidales usadas de acuerdo con la presente invención incluyen microesferas recubiertas con fluoróforos, que, cuando son iluminadas, emiten una luz fluorescente. La luz emitida es atrapada en la microesfera y resuena en la microesfera creando un espectro de longitudes de onda individuales denominado modos de galería de murmullos o "WGM". El recubrimiento de las partículas microesferoidales con un fluoróforo, por oposición a mediante el uso de puntos cuánticos individuales, mejora la sensibilidad de la detección basada en WGM. La presente invención se amplía a las partículas microesferoidales de melamina formaldehído recubiertas con un fluoróforo (es decir, sin el uso de puntos cuánticos) o al uso de puntos cuánticos junto con las partículas de melamina formaldehído. Las partículas microesferoidales tienen un índice de refracción mayor con respecto al medio acuoso que comprende el analito. En una forma de realización, la partícula microesferoidal tiene un índice de refracción mayor de 1,40.

Según se usa en el presente documento, se entiende que el término "punto cuántico" o "QD" engloba las partículas conocidas en la materia como nanopartículas semiconductoras, nanocristales, puntos cuánticos o partículas Q.

55 Los términos "partículas microesferoidales" y "microesferas" se usan de forma intercambiable en el presente documento e incluyen partículas esféricas que comprenden cualquier material, homogéneo o de otra manera que pueda producir uno o más perfiles de WGM basados en su fluoróforo. Como será evidente para los expertos en la materia, puede usarse prácticamente cualquier material, homogéneo o de otra manera, para la partícula microesferoidal. Las partículas microesferoidales descritas en el presente documento también pueden comprender más de una sustancia, y como tal pueden comprender cubiertas, aleaciones o mezclas de sustancias orgánicas y/o inorgánicas. Para la cuantificación de los datos generados por los métodos descritos en el presente documento resulta ventajoso que la partícula microesferoidal comprenda un material sustancialmente homogéneo con un índice de refracción isotrópico y que también sea no absorbente (distinto al fluoróforo, que se describe adicionalmente a continuación).

65

Las partículas microesferoidales descritas en el presente documento pueden comprender un material elegido de la lista que consiste en: melamina o un derivado químico de la misma tal como melamina formaldehído; sílice; látex; titanio; dióxido de estaño; ytrio; alúmina; otros óxidos metálicos binarios; perovskitas y otros óxidos metálicos piezoeléctricos; PLGA; sacarosa; agarosa; y otros polímeros.

5 Las partículas microesferoidales descritas en el presente documento pueden estar funcionalizadas por fracciones químicas tales como con grupos amina, aldehído, sulfato o tiol, carboxilo, carboxilasa y/o hidroxilo. Las partículas microesferoidales pueden ser partículas de amina-aldehído tales como, pero no se limitan a, partículas de melamina formaldehído (MF), las partículas usadas de acuerdo con la invención. Las partículas de MF proporcionan un robusto sustrato de conjugación para los oligonucleótidos objetivo modificados con acrilóilo y las proteínas a las que se unen. El enlace covalente permanece intacto después de la exposición a soluciones con un pH elevado y a temperaturas extremas, por lo que pueden conseguirse unos WGM de alta calidad tras el tratamiento.

15 La melamina es un trímero de cianamida y también se conoce como: 1,3,5-triazin-2,4,6-triamina; 2,4,6-triamino-s-triazina; cianurotriamida; cianurotriamina o cianuramida. En los métodos de la invención, la melamina es melamina formaldehído.

También se describe en el presente documento el uso de partículas magnéticas en el ensayo de WGM. Dichas partículas podrían presentarse en unas posiciones fijas muy precisas. La inmovilización de partículas facilitada magnéticamente permite el análisis individual de partículas aisladas y aliviar la necesidad de fabricar sustratos de inmovilización a medida.

25 Pueden seleccionarse partículas con un elevado índice de refracción que soporten los WGM en disolución, tales como sílice coloidal, zirconio o titanio. Alternativamente, los materiales de las microesferas con cubierta con un índice de refracción mayor proporcionan una útil plataforma de sensor ideal. Estas partículas contienen unos elevados modos de orden radial en la capa adsorbida y, como resultado, deberían permitir la adquisición de espectros de WGM de Q elevado, que contienen los modos de orden mayor.

30 El empleo de nanocristales semiconductores (por ejemplo, de CdSe, CdTe, CdS) proporciona otra alternativa fluorescente robusta. Una partícula fluorescentemente estable que soporta los WGM en disolución puede ser producida mediante la adsorción de una monocapa de nanocristales a una microesfera homogénea, seguido de una cubierta estabilizante con un elevado índice de refracción. A continuación se proporciona una lista de materiales y de partículas con un elevado índice de refracción, disponibles comercialmente:

35 El término fluoróforo es general y no se limita a los colorantes orgánicos, sino que incluye cualquier producto químico, molécula o material, que tiene la propiedad de emitir luz con una longitud de onda bien definida cuando es iluminada. Esto incluye, pero no se restringe a: colorantes orgánicos, complejos organometálicos, puntos cuánticos (incluyendo nanovarillas, nanocables y otras morfologías, QD recubiertos y no recubiertos, aleaciones y mezclas de los mismos), iones de tierras raras o mezclas de los mismos, conversores ascendentes y también fluoróforos emisores de infrarrojo, que pueden ser ventajosos en las muestras absorbentes. También pueden incorporarse otros materiales tales como materiales fluorescentes defectuosos tales como diamantes que contienen defectos o vacíos inducidos por nitrógeno.

45 Los WGM pueden ser generados por fluoróforos que están unidos a la superficie de la microesfera, pero también pueden ser generados cuando el fluoróforo está incluido o distribuido en la microesfera. La distribución de los fluoróforos afecta a la intensidad de los diferentes modos de WGM, pero para los propósitos de esta invención, no se hace ninguna distinción en si los fluoróforos están en la superficie o dentro de la microesfera.

<i>Metales</i>
Titanio, TiO ₂ (2,20), Aluminio Al ₂ O ₃ (1,77), Mylar (1,65), Cobre Cu (2,43), Platino Pt (2,33)
<i>Minerales (gemas)</i>
Diamante (2,42), Cuarzo (1,54 - 1,55), Rubí (1,76 - 1,78), Zafiro (1,76 - 1,78), Estrella de zafiro (1,76 - 1,77), Granate (1,79 - 1,81), Espinela (1,72 - 1,73), Espinela azul (1,72 - 1,74), Espinela roja (1,71 - 1,74), Rubí estrella (1,76 - 1,77), Tanzanita (1,69 - 1,70), Topacio (1,61 - 1,63), cristal (2,00)
<i>Plásticos</i>
La resina de Melamina Formaldehído (C ₅ H ₈ N ₆ O) _n [no debe confundirse con melamina] (1,68), se elabora mediante un proceso de polimerización de melamina con formaldehído
<i>Cerámicas</i>
Cerámica de Silicato de Zirconio (2,00 - 2,20), Zirconio ZnO ₂ (2,40)
<i>Vidrio</i>

<i>Metales</i>
Vidrio con un elevado índice de refracción (2,00), sílice fusionada (cuarzo 1,46), vidrio Pirex (1,47), Plexiglás (1,48)
<i>Materiales transparentes habituales</i>
Lucita (1,49)

La presente invención se basa, en parte, en la determinación de que el medio de detección de WGM no requiere que las microesferas estén recubiertas con puntos cuánticos.

5 La presente memoria descriptiva describe un método de detección de un analito en un medio, comprendiendo el método someter microesferas recubiertas con un fluoróforo y una multiplicidad de ligandos a un medio de detección de WGM para la identificación de un acontecimiento de unión entre uno más ligandos y un analito de unión al ligando, en el que las microesferas tienen un índice de refracción mayor que el medio que comprende el analito.

10 También se describe un método para la detección de un analito en un medio, que comprende las etapas de:

- (i) anclar una multiplicidad de ligandos del analito a una población de partículas microesferoidales conjugadas con un fluoróforo en las que si la partícula microesferoidal es de melamina formaldehído entonces puede estar conjugada con el fluoróforo o comprender un punto cuántico;
- 15 (ii) poner en contacto las partículas microesferoidales con una muestra de control negativo y determinar un espectro del momento inicial;
- (iii) poner en contacto las partículas microesferoidales con una muestra que supuestamente comprende el analito durante un tiempo y en unas condiciones suficientes para facilitar un acontecimiento de unión entre el analito y su respectivo ligando; y
- 20 (iv) someter las partículas microesferoidales al medio de detección de modos de galería de murmullos (WGM) para la detección de un acontecimiento de unión. El método de la invención concierne a ligandos de ácidos nucleicos y a analitos y partículas microesferoidales de melamina formaldehído que están marcados con un fluoróforo o que comprenden un punto cuántico.

25 La referencia a "recubierta" o "conjugada" debería entenderse como la referencia a la incorporación de un fluoróforo en la superficie de una partícula microesferoidal sin la ayuda de un punto cuántico o de su equivalente funcional.

30 Según se usa en el presente documento, el término "fluoróforo" se refiere a cualquier molécula que muestre la propiedad de fluorescencia. Para los propósitos del presente documento, el término "fluorescencia" puede definirse como la propiedad de una molécula de absorber luz de una longitud de onda en particular y volver a emitir la luz con una longitud de onda más larga. El desplazamiento en la longitud de onda se refiere a una pérdida de energía que tiene lugar en el proceso. El término "fluoróforo" puede englobar una variedad de fluoróforos tales como fluoróforos químicos y colorantes.

35 El fluoróforo puede elegirse para que emita en cualquier longitud de onda en la que pueda ser fácilmente resuelto el perfil de los WGM. Esto depende de la proporción entre la longitud de onda de la emisión y el radio de la partícula. Dado que el radio de la esfera es arbitrario, la emisión puede elegirse adecuadamente entre los intervalos de ultravioleta (intervalo de longitudes de onda de desde aproximadamente 350 nm hasta aproximadamente 3 nm), de visible ((intervalo de longitudes de onda de desde aproximadamente 350 nm hasta aproximadamente 800 nm), de infrarrojo cercano ([NIR]) ((intervalo de longitudes de onda de desde aproximadamente 800 nm hasta aproximadamente 1500 nm) y/o de infrarrojo ([IR]) ((intervalo de longitudes de onda de desde aproximadamente 1500 nm hasta aproximadamente 10 μ m). Sin embargo, debido a la facilidad de detección, en una forma de realización particularmente preferida, el fluoróforo es detectable en el intervalo de longitudes de onda visible.

45 En una forma de realización particular, el fluoróforo emite radiación visible en respuesta a una excitación infrarroja. Dichos fluoróforos también se denominan en el presente documento "convertidores ascendentes".

50 Por lo tanto, la presente memoria descriptiva describe un método de detección de un analito, método que comprende poner en contacto al menos una población de partículas microesferoidales con una muestra que supuestamente comprende el analito, en el que cada partícula de una población de partículas microesferoidales comprende un fluoróforo que emite radiación visible en respuesta a una excitación infrarroja, y un supuesto compañero de unión inmovilizado del analito, en el que cada población de partículas tiene un perfil definido de los WGM, que la unión del analito el compañero de unión inmovilizado da como resultado un cambio en el perfil de los WGM cuando se compara con el perfil de los WGM el momento inicial, de al menos una población de partículas microesferoidales que es indicativo de la presencia del analito.

55 Las partículas microesferoidales pueden estar funcionalizadas por fracciones químicas tales como con amina, tiol y/o grupos aldehído, sulfato, carboxilato, grupos hidroxilo, óxido y/o alquinos. Adicionalmente, las partículas basadas en amina-aldehído tales como las de melamina formaldehído, proporcionan un sustrato útil para que se unan los

oligonucleótidos y las proteínas modificadas con acrilóilo. Las partículas de melamina formaldehído se usan de acuerdo con la invención.

5 Por lo tanto, la presente memoria descriptiva describe de forma general un método para la detección de un acontecimiento de unión entre un analito y un ligando, que comprende las etapas de: (i) anclar una multiplicidad de ligandos a una población de partículas microesferoidales funcionalizadas conjugadas con un fluoróforo; (ii) poner en contacto las partículas microesferoidales funcionalizadas con una muestra de control negativo y determinar un espectro del momento inicial; (iii) poner en contacto las partículas microesferoidales funcionalizadas con una muestra que supuestamente comprende el analito durante un tiempo y en unas condiciones suficientes para facilitar un acontecimiento de unión entre el analito y su respectivo ligando; y (iv) someter las partículas microesferoidales a un medio de detección de WGM para la detección de un acontecimiento de unión.

15 De acuerdo con la invención, las partículas de amina-aldehído son de melamina formaldehído. Por lo tanto, la presente invención proporciona un método para la detección de un acontecimiento de unión entre un analito de ácido nucleico y un ligando de ácido nucleico en un medio acuoso, que comprende las etapas de: (i) anclar una multiplicidad de ligandos de ácidos nucleicos a una población de partículas microesferoidales de melamina formaldehído marcadas con un fluoróforo; (ii) poner en contacto las partículas microesferoidales de melamina formaldehído con una muestra de control negativo y determinar un espectro del momento inicial; (iii) poner en contacto las partículas microesferoidales de melamina formaldehído con una muestra que supuestamente comprende el analito de ácido nucleico durante un tiempo y en unas condiciones suficientes para facilitar un acontecimiento de unión entre el analito de ácido nucleico activo y su respectivo ligando; y (iv) someter las partículas microesferoidales de melamina formaldehído a un medio de detección de WGM para la detección de un acontecimiento de unión.

25 En una forma de realización de la invención, también pueden usarse puntos cuánticos.

30 Por lo tanto, otro aspecto de la presente invención proporciona un método para la detección de un acontecimiento de unión entre un analito de ácido nucleico y un ligando de ácido nucleico en un medio acuoso, que comprende las etapas de: (i) anclar una multiplicidad de ligandos de ácidos nucleicos a una población de partículas microesferoidales de melamina formaldehído marcadas con puntos cuánticos (que pueden estar recubiertas con un fluoróforo); (ii) poner en contacto las partículas microesferoidales con una muestra de control negativo y determinar un espectro del momento inicial; (iii) poner en contacto las partículas microesferoidales con una muestra que supuestamente comprende el analito de ácido nucleico durante un tiempo y en unas condiciones suficientes para facilitar un acontecimiento de unión entre el analito de ácido nucleico y su respectivo ligando; y (iv) someter las partículas microesferoidales a un medio de detección de WGM para la detección de un acontecimiento de unión.

40 También se divulga un método para la detección de un acontecimiento de unión entre un analito y un ligando, que comprende las etapas de: (i) anclar una multiplicidad de ligandos a una población de partículas microesferoidales que tienen un índice de refracción mayor que el medio que comprende el analito, codificando las partículas microesferoidales para un fluoróforo; (ii) poner en contacto las partículas microesferoidales con una muestra de control negativo y determinar un espectro del momento inicial; (iii) poner en contacto las partículas microesferoidales con una muestra que supuestamente comprende el analito durante un tiempo y en unas condiciones suficientes para facilitar un acontecimiento de unión entre el analito y su respectivo ligando; y (iv) someter las partículas microesferoidales a un medio de detección de WGM para la detección de un acontecimiento de unión. De acuerdo con la invención, se usan analitos de ácidos nucleicos y ligandos y partículas microesferoidales de melamina formaldehído.

50 Las únicas limitaciones del fluoróforo es que la emisión debería dar como resultado una emisión en modo de cavidad.

55 Existen muchos colorantes fluorescentes disponibles en la materia que pueden usarse como fluoróforos de acuerdo con la presente invención. Una propiedad importante de un colorante fluorescente o de otro fluoróforo, que determina su potencial para ser usado, es la longitud de onda de excitación del fluoróforo; debe coincidir con las longitudes de onda disponibles de la fuente luminosa. Sin embargo, muchos colorantes fluorescentes diferentes y otros fluoróforos serán familiares para los expertos en la materia, y la elección del marcador fluorescente no limita en modo alguno la actual invención.

60 Los "fluoróforos" convenientes que pueden usarse para el marcaje de una partícula microesferoidal comprenden cualquier marcador fluorescente que sea excitable mediante el uso de una fuente luminosa elegida de entre el siguiente grupo:

- (i) *Láseres de ion argón* - comprenden una línea azul a 488 nm, que es adecuada para la excitación de muchos colorantes y fluorocromos que fluorescen en la región verde hasta roja; también hay disponibles láseres de argón regulables que emiten en un intervalo de longitudes de onda (a 458 nm, a 488 nm, a 496 nm, a 515 nm entre otras).

(ii) *Láseres de diodo* – tienen una longitud de onda de emisión de 635 nm. Otros láseres de diodo disponibles actualmente operan a 532 nm. Esta longitud de onda excita el yoduro de propidio (PI) de forma óptima. También hay disponibles láseres de diodo azul que emiten luz alrededor de los 476 nm. Dichos láseres de diodo pueden emplearse convenientemente para excitar los WGM en las partículas microesferoidales.

(iii) *Láseres de gas HeNe* - operan con la línea roja a 633 nm. Dichos láseres pueden emplearse convenientemente para excitar los WGM en las partículas microesferoidales.

(iv) *Diodos Emisores de Luz (LEDs)*

(v) *Láseres de HeCd* - operan a 325 nm. Dichos láseres pueden emplearse convenientemente para excitar los WGM en las partículas microesferoidales.

(vi) *Lámpara de arco de mercurio de 100 W* la fuente de luz más eficiente para la excitación de colorantes UV como Hoechst y DAPI.

(vii) *Lámparas de arco de Xe y lámparas halógenas de cuarzo* – pueden usarse como un medio para excitar los WGM y por lo tanto utilizan las partículas como sensores.

En una forma de realización en particular de la presente invención, los marcadores fluorescentes se eligen de entre: colorantes Alexa Fluor; colorantes BoDipy, incluyendo BoDipy 630/650 y BoDipy 650/665; colorantes Cy, particularmente Cy3, Cy5 y Cy 5.5; 6-FAM (Fluoresceína); Fluoresceína dT; Hexaclorofluoresceína (HEX); 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína (JOE); colorantes verde Oregon, incluyendo 488-X y 514; colorantes de Rodamina, incluyendo verde Rodamina, rojo Rodamina y ROX; Carboxitrametilrodamina (TAMRA); Tetraclorofluoresceína (TET); y rojo Texas.

Habitualmente se usan dos técnicas de tinción, la tinción interna y la tinción externa (marcaje de superficie) para marcar fluorescentemente las partículas microesferoidales. Las dos técnicas producen unas partículas con propiedades únicas, cada una beneficiosa para diferentes aplicaciones. La tinción interna produce partículas extremadamente estables normalmente con unas emisiones de fluorescencia estrechas. Estas partículas muestran a menudo una resistencia mayor a la fotodecoloración. Como el fluoróforo está en el interior de las partículas, los grupos de la superficie están disponibles para su uso en la conjugación con ligandos (proteínas, anticuerpos, ácidos nucleicos, etc.) en la superficie de la microesfera. Por esta razón, las partículas marcadas internamente se usan normalmente en aplicaciones de detección de analitos y de inmunoensayo. El marcaje de superficie implica la conjugación del fluoróforo con la superficie de la partícula microesferoidal. Debido a que los fluoróforos están en la superficie de la partícula, son capaces de interactuar con su entorno exactamente igual que los fluoróforos de una célula teñida. El resultado es una partícula estándar que muestra las mismas propiedades de excitación y de emisión que las muestras de células teñidas, en una variedad de condiciones diferentes, tales como la presencia de contaminantes o cambios en el pH. La naturaleza "sensible al medio circundante" de las partículas marcadas en su superficial las hace idealmente adecuadas para simular las muestras biológicas. Las partículas marcadas externamente se usan frecuentemente como controles y estándares de varias aplicaciones que utilizan una detección por fluorescencia. Sin embargo, la presente invención contempla la asociación de una partícula con un marcador fluorescente a través de cualquier medio.

Según se usa en el presente documento, debería entenderse que el término "fluoróforo" también engloba múltiples fluoróforos y mezclas de fluoróforos. Debe considerarse que el uso de todos estos fluoróforos en partículas microesferoidales está en el ámbito de los métodos y de los reactivos descritos en el presente documento.

De acuerdo con la presente invención, se ha demostrado que la emisión de cualquier fluoróforo en particular depende de la distribución del fluoróforo en la partícula microesferoidal, del tipo de fluoróforo y de la concentración del fluoróforo. Sin embargo, los métodos de la presente invención todavía son factibles independientemente de si el fluoróforo está en la superficie de la partícula microesferoidal, presente en forma de una cubierta en la partícula microesferoidal, ubicado en el núcleo de la partícula microesferoidal o de si está presente en más de una de las ubicaciones mencionadas.

Debería mencionarse que los métodos de la presente invención no se basan en la inactivación de la emisión por parte del fluoróforo. Los métodos de la presente invención se basan, sin embargo, en parte, en una modulación (es decir, en un cambio) en el perfil de WGM del fluoróforo como resultado de una interacción o de una asociación de un analito con un compañero de unión inmovilizado en la superficie de una partícula microesferoidal.

Cuando se trata de una radiación electromagnética, los WGM son resonancias electromagnéticas que pueden ser establecidas cuando la luz incidente interactúa con una partícula con un índice de refracción mayor que su medio circundante. Los WGM se producen a unas longitudes de onda resonantes en particular de luz para un tamaño de partícula dado, y la naturaleza de los WGM puede cambiar, entre otros, según el tamaño de la partícula que contiene los WGM y los índices de refracción tanto de la partícula como del medio circundante. Adicionalmente, el tamaño de

la partícula también puede afectar a los WGM establecidos en la misma. Los WGM se establecen cuando la luz incidente experimenta una reflexión interna total en la superficie de la partícula.

Una reflexión interna total (TIR) puede producirse en la interfase entre dos medios no absorbentes. Cuando un haz de luz que se propaga en el medio con el mayor índice de refracción se encuentra con una interfase en un medio con un menor índice de refracción a un ángulo de incidencia por encima de un ángulo crítico, la luz es reflejada totalmente y se propaga de nuevo el medio con el mayor índice de refracción. Como será evidente para una persona experta en la materia, en un medio tridimensional, la luz será reflejada muchas veces en la partícula con un mayor índice de refracción. En un WGM, la luz se concentra cerca de la circunferencia de la partícula y se le puede asignar un número de modo y un orden de modo. El número de modo, n , proporciona el número de longitudes de onda alrededor de la circunferencia de la partícula, y el orden de modo, l , proporciona el número de máximos en dependencia radial del campo electromagnético de la partícula.

Los emisores de fluorescencia incluidos en una partícula, según se definen en el presente documento, muestran unos perfiles definidos de WGM. Estos modos permiten que únicamente ciertas longitudes de onda de luz sean emitidas desde la partícula. El resultado de este fenómeno es que el espectro de emisión habitual relativamente ancho de un fluoróforo (por ejemplo, los fluoróforos normalmente emiten en un ancho de banda de 10 - 100 nm) se contraiga y aparezca como una serie de afilados "picos" correspondientes efectivamente a los patrones de modo vertical en la partícula. Las series de picos generadas como resultado del establecimiento de un WGM en la partícula microesferoidal de la presente invención se denominan en el presente documento "perfiles del modo de galería de murmullos" o "perfiles de WGM".

El perfil de WGM es extremadamente sensible tanto a la posición del fluoróforo incluido como a su concentración y configuración espacial entre sí. El tamaño de partícula y el índice de refracción son los 2 parámetros más importantes en la determinación de las longitudes de onda de emisión observadas en un perfil de WGM.

Se propone que la posición y la amplitud de uno o más de los picos de un perfil de WGM pueden estar fuertemente afectados por las interacciones o las asociaciones de la partícula microesferoidal con las moléculas de una muestra o del entorno externo.

En un ejemplo, la asociación o la unión de una molécula a una partícula microesferoidal altera el índice de refracción eficaz de la partícula microesferoidal, alterando el perfil de WGM generado por la partícula microesferoidal.

Cualquiera de los diversos medios conocidos en la materia es adecuado para la conjugación de fluoróforos en la superficie de las microesferas. Las superficies de la microesfera pueden ser optimizadas o funcionalizadas para la adsorción o la unión covalente de moléculas, incluyendo fluoróforos o cualquier molécula biológica o química.

La superficie de las microesferas puede ser funcionalizada mediante la adición de cualquier número de grupos funcionales, incluyendo: azida, alquino, maleimida, succinimida, epóxido, metacrilato, acrilóilo, amina, aldehído, sulfato o tiol; carboxilo; carboxilato; hidroxilo; etc.

Según se describe en el presente documento, las moléculas de ácidos nucleicos pueden ser unidas covalentemente a una superficie recubierta de azufre de una microesfera de sílice. Se usa una silanización con 3-mercaptopropiltrimetoxisilano seguido de un lavado exhaustivo para crear esta superficie. Las moléculas de ácidos nucleicos, por ejemplo, oligonucleótidos de ADN, se elaboran con grupos tiol o acrílico en 5' y se unen a los azufres libres de la superficie.

Los ligandos descritos en el presente documento incluyen los ligandos elegidos de entre el grupo que consiste en: ácidos nucleicos; anticuerpos; péptidos; polipéptidos; carbohidratos; lípidos; glucoproteínas; lipoproteínas; lipopéptidos; lipopolisacáridos; y pequeñas moléculas orgánicas y pequeñas moléculas inorgánicas. Cuando se recubren con un antígeno o con un anticuerpo, las partículas usan en un ensayo de "inmuno-WGM" o ensayo de "WGM inmuno-basado".

Los términos "ácidos nucleicos", "nucleótido" y "polinucleótido" incluyen ARN, ADNc, ADN genómico, formas sintéticas y polímeros mixtos, tanto hebras sentido como antisentido, y pueden ser modificados químicamente o bioquímicamente, pueden contener bases de nucleótidos no naturales o derivatizadas, como apreciarán fácilmente los expertos en la materia. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, marcajes, metilación, sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales por un análogo (tal como un anillo de morfolino), modificaciones internucleotídicas tales como enlaces sin carga (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.), enlaces con carga (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), fracciones colgantes (por ejemplo, polipéptidos), intercalantes (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), quelantes, alquilantes y enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos α -anoméricos etc.). También están incluidas las moléculas sintéticas que mimetizan los polinucleótidos en su capacidad para unirse a una secuencia designada a través de puentes de hidrógeno y de otras reacciones químicas. Dichas moléculas son conocidas en la materia e incluyen, por ejemplo, aquellas en las que los enlaces peptídicos sustituyen a los enlaces de fosfato en el esqueleto de la molécula.

El término "anticuerpo" se refiere a una proteína de la familia de las inmunoglobulinas que es capaz de combinarse, de interactuar o de asociarse de otro modo con un antígeno. Un anticuerpo es, por lo tanto, una molécula de unión a un antígeno. El término "antígeno" se usa en el presente documento en su sentido más amplio para referirse a una sustancia que es capaz de reaccionar con, o de unirse a, el sitio de unión al antígeno de un anticuerpo. Un antígeno también incluye el idiotipo de un anticuerpo.

El término "inmunoglobulina" se usa en el presente documento para hacer referencia a una proteína que consiste en uno más polipéptidos codificados sustancialmente por los genes de las inmunoglobulinas. Las moléculas de inmunoglobulina reconocidas incluyen las regiones constantes κ , λ , α , γ (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), δ , ϵ y μ , las cadenas ligeras (κ y λ), así como la miríada de regiones variables de inmunoglobulinas. Una forma de inmunoglobulina constituye la unidad estructural básica de un anticuerpo. Esta forma es un tetrámero y consiste en dos pares idénticos de cadenas de inmunoglobulina, teniendo cada par una cadena ligera y una pesada. En cada par, las regiones variables de las cadenas ligera y pesada son conjuntamente responsables de la unión a un antígeno, y las regiones constantes son responsables de las funciones efectoras del anticuerpo. Además de los anticuerpos, las inmunoglobulinas pueden existir en otras formas diversas que incluyen, por ejemplo, Fv, Fab, Fab' y (Fab')₂ y anticuerpos quiméricos, y todas estas variantes están englobadas por el término "anticuerpo" según se usa en el presente documento. Además, las inmunoglobulinas de otros animales (por ejemplo, de aves, mamíferos, peces, anfibios y reptiles) tienen una función similar pero una nomenclatura diferente, y éstas están también consideradas como "anticuerpos".

En una forma de realización, el ligando de unión al analito es una molécula de ADN que comprende un saliente de ADN monocatenario, y el analito que se va a detectar es una molécula de ácido nucleico capaz de hibridar con el ligando. Cuando se produce la hibridación es detectable un desplazamiento en el perfil de WGM. Por el contrario, cuando no hay hibridación entre las secuencias complementarias de ácidos nucleicos, no se produce ningún desplazamiento en el perfil de WGM.

En una forma de realización específica, los compañeros de unión del analito o los ligandos son moléculas de ADN preparadas mediante: (i) la digestión del ADN bicatenario con una enzima que genera un saliente de ADN monocatenario, por ejemplo, una endonucleasa de restricción y (ii) la digestión con una enzima exonucleasa. El ADN digerido resultante comprende un ADN monocatenario capaz de hibridar, entre otros, con ácidos nucleicos monocatenarios complementarios.

Una "endonucleasa de restricción", según se usa en el presente documento, significa una enzima nucleasa que hidroliza nucleótidos en unas secuencias específicas dentro de una molécula de ADN. Las endonucleasas de restricción comprenden las endonucleasas de restricción de Tipo I, de Tipo II y de Tipo III.

La Tabla 2 recoge un subconjunto de endonucleasas de restricción de Tipo I y de Tipo II que generan salientes en 5' de 4 bases.

Tabla 2

<i>Salientes en 5' de 4 bases de endonucleasas de restricción de Tipo I y de Tipo II</i>		
Enzima	Longitud del saliente	Secuencia
BamHI	4	GATC
EcoRI	4	AATT
HinDIII	4	AGCT
AflII	4	TTAA
AgeI	4	CCGG
ApaLI	4	TGCA
ApoI	4	AATT
BanI	4	Variable
BclI	4	GATC
BglII	4	GATC
BsaI	4	Variable
BsaJI	4	Variable
BsaWI	4	GGCC
BseYI	4	CCAG

ES 2 545 232 T3

BsiWI	4	GTAC
BsmAI	4	Variable
BsmBI	4	Variable
BsmFI	4	Variable
BsoBI	4	Variable
BspEI	4	CCGG
BshHI	4	CATG
BspMI	4	Variable
BsrFI	4	CCGG
BsrGI	4	GTAC
BssHII	4	CGCG
BssKI	4	CCNG
BssSI	4	TCGT
BstEII	4	GTNA
BstYI	4	GATC
BtgI	4	Variable
DpnII	4	GATC
EaeI	4	GGCC
KasI	4	GCGC
MboI	4	GATC
MfeI	4	AATT
MluI	4	CGCG
NcoI	4	CATG
NgoMIV	4	CCGG
NheI	4	CTAG
NotI	4	GGCC
PaeR7I	4	TCGA
PspGI	4	Variable
Sall	4	TCGA
Sau3AI	4	GATC
SexAI	4	Variable
Sfci	4	Variable
SgrAI	4	CCGG
SpeI	4	CTAG
StyI	4	Variable
TliI	4	TCGA
Tsp45I	4	Variable
Tsp509I	4	AATT
XbaI	4	CTAG
XhoI	4	TCGA
XmaI	4	CCGG

La Tabla 3 recoge un subconjunto de endonucleasas de restricción de Tipo I y de Tipo II que generan salientes en 3', en su mayor parte de cuatro bases de longitud.

Tabla 3

<i>Salientes en 3', en su mayor parte de 4 bases, de endonucleasas de restricción de Tipo I y de Tipo II</i>		
Enzima	Longitud del saliente	Secuencia
AatII	4	ACGT
Apal	4	CCGG
BanII	4	Variable
Bme1580I	4	Variable
BsiHKA1	4	Variable
Bsp1286I	4	Variable
BstXI	4	Variable
FseI	4	GGCC
HaeII	4	CGCG
Hpy99	4	Variable
KpnI	4	GTAC
NlaIII	4	GTAC
NsiI	4	ACGT
NspI	4	GTAC
PstI	4	TGCA
SacI	4	TCGA
SphI	4	GTAC
TspRI	8	Variable

5

"Exonucleasa", según se usa en el presente documento, significa una enzima nucleasa que hidroliza nucleótidos de los extremos de hebras de ADN. Un ejemplo de una enzima exonucleasa adecuada para la preparación de los ligandos de unión al analito y/o de los analitos que se van a detectar es una exonucleasa lambda (λ). La exonucleasa lambda es una exonucleasa de ADN bicatenario que degrada los ADN bicatenarios en la dirección de 5' hacia 3'. La exonucleasa lambda requiere que el extremo 5' del ADN sea bicatenario y esté fosforilado. La digestión con la exonucleasa lambda puede usarse preferiblemente para degradar hebras específicas de ADN bicatenario para generar ligandos de unión al analito y analitos de ADN monocatenario que van a ser detectados.

10

En una forma de realización específica, las partículas microesferoidales de la presente invención están recubiertas con ácidos nucleicos derivados de un agente patógeno tal como un virus, una bacteria, una levadura o un parásito. La detección de un acontecimiento de unión es indicativa de la presencia de ácidos nucleicos complementarios en la muestra, y por lo tanto es indicativa de la presencia del agente en la muestra y/o en la fuente de la muestra.

15

"Complementario", según se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de un emparejamiento preciso entre dos nucleobases de un compuesto oligomérico. Por ejemplo, si una nucleobase en una cierta posición de un oligonucleótido (un compuesto oligomérico) es capaz de unirse a través de un puente de hidrógeno con una nucleobase en una cierta posición de un ácido nucleico objetivo, siendo dicho ácido nucleico objetivo una molécula de ADN, de ARN o de un oligonucleótido, entonces la posición del puente de hidrógeno entre el oligonucleótido y el ácido nucleico objetivo se considera una posición complementaria. El oligonucleótido y la molécula adicional de ADN, de ARN o de un oligonucleótido son complementarios entre sí cuando un número suficiente de posiciones complementarias de cada molécula están ocupadas por nucleobases que pueden unirse entre sí a través de puentes de hidrógeno. Por lo tanto, "hibridable específicamente" y "complementario" son términos que se usan para indicar un grado suficiente de apareamiento preciso o de complementariedad a lo largo de un número suficiente de nucleobases, de forma que se produzca un enlace estable y específico entre el oligonucleótido y un ácido nucleico objetivo.

20

La presente memoria descriptiva describe partículas microesferoidales que son útiles para comprobar la presencia de una amplia variedad de analitos en una muestra individual.

25

30

No es necesario conocer la identidad del analito a detectar, ni es necesario marcar el analito ni el ligando, por ejemplo, con un marcaje fluorescente o radioactivo.

5 Debido a la sensibilidad del medio de detección de WGM, las partículas microesferoidales descritas en el presente documento son útiles para la detección de analitos raros que están presentes en una muestra a unas concentraciones bajas. Por ejemplo, dichas partículas son útiles para la detección de elementos traza o de contaminantes tales como alérgenos, pirógenos contaminantes microbiológicos o químicos en alimentos y en medicamentos; contaminantes o tóxicos en muestras medioambientales e industriales; explosivos; agentes de terrorismo biológico; etc. Según se usa en el presente documento el término "raro" significa que aparece infrecuentemente o que es poco común o que está en un número relativamente bajo o en una concentración relativamente baja.

15 Las partículas microesferoidales descritas en el presente documento son útiles para la identificación de analitos que previamente no se sabía que se unieran a un ligando en particular. Por ejemplo, las partículas microesferoidales están recubiertas con una enzima o con una molécula receptora en la que la conformación del sitio o del supuesto sitio de unión al ligando está intacta. Los analitos que se unen a dichas partículas representan los supuestos agonistas o antagonistas de la actividad enzimática o de la unión receptor-ligando. En otras palabras, las partículas microesferoidales son útiles en la identificación y el diseño de fármacos.

20 El diseño racional de fármacos permite la producción de análogos estructurales de los polipéptidos biológicamente activos de interés, o de pequeñas moléculas con las que interactúan (por ejemplo, agonistas, antagonistas, inhibidores o potenciadores) con objeto de confeccionar fármacos que, por ejemplo, son más activos, o formas estables del polipéptido, o que, por ejemplo, potencien o interfieran en la función de un polipéptido *in vivo*. Véase, por ejemplo, Hodgson (Bio/Technology 9: 19 - 21, 1991). En una metodología, se determina en primer lugar la estructura tridimensional de una proteína de interés mediante cristalografía de rayos X, mediante un modelado por ordenador o lo más habitualmente, mediante una combinación de metodologías. La información útil relativa a la estructura de un polipéptido también puede obtenerse mediante un modelado basado en la estructura de proteínas homólogas. Un ejemplo de diseño racional de fármacos es el desarrollo de inhibidores de la proteasa del VIH (Erickson *et al.*, Science 249: 527 - 533, 1990). Además, las moléculas objetivo pueden ser analizadas mediante un escáner de alanina (Wells, Methods Enzymol. 202: 2699 - 2705, 1991). En esta técnica se sustituye un residuo de un aminoácido Ala y se determina su efecto sobre la actividad del péptido. Cada uno de los residuos de aminoácidos del péptido se analiza de esta manera para determinar las regiones importantes del péptido.

35 Las partículas microesferoidales descritas en el presente documento también son útiles para la detección de genes o de las proteínas para las que codifican asociadas a unas afecciones patológicas y enfermedades específicas. Por ejemplo, las partículas microesferoidales se recubren con un ligando específico o con una genoteca de ligandos que se sabe que son expresados en el cáncer humano, o por el contrario, con un anticuerpo o con una genoteca de anticuerpos específicos para un antígeno o antígenos que se sabe que están asociados con el cáncer. Por lo tanto, la detección de un acontecimiento de unión es indicativa de la presencia en una muestra de un analito que se sabe que está asociado con el cáncer. Debido a su sensibilidad, el método de detección de WGM proporciona, entre otros, un método para la detección temprana del cáncer.

45 El ligando o el analito que se va a detectar comprende un polimorfismo de nucleótido único (SNP) o una modificación post-traduccional específica.

50 Los métodos descritos en el presente documento son útiles para diversas aplicaciones en los campos de, por ejemplo, medicina, ciencia veterinaria, agricultura, ciencia forense, biotecnología, tecnología de los alimentos, ciencia de los deportes, ciencia nutricional, elaboración, diseño y desarrollo de fármacos, biodefensa, detección de materiales explosivos, insecticidas, fertilizantes y toxinas.

55 Adicionalmente, los métodos descritos en el presente documento son útiles para el diagnóstico de afecciones patológicas o de enfermedades que incluyen enfermedades genéticas, cáncer, trastornos autoinmunes, alergias, enfermedades infecciosas, cardiopatías, enfermedades neurológicas, proteopatías y enfermedades metabólicas, enfermedades y contaminaciones víricas y bacterianas, identificación de bacterias o de virus desconocidos o de otros microorganismos en muestras naturales.

60 Más adicionalmente, los métodos descritos en el presente documento son útiles, entre otros, para determinaciones tisulares, determinaciones del grupo sanguíneo, pruebas genéticas, pruebas farmacológicas, análisis de analitos en sangre, pruebas de alcohol, pruebas de embarazo, etc.

65 Los métodos descritos en el presente documento son particularmente útiles para el cribado de muestras biológicas para comprobar la presencia de un analito. Debe entenderse que una "muestra biológica" es una muestra derivada de una fuente biológica, tal como una muestra medioambiental, un extracto de un organismo, un extracto vegetal o animal, suero, orina, exudado, semen, plasma, una muestra de suelo, una muestra de río o precintada, una muestra extraterrestre, entre otras fuentes.

También se describe en el presente documento un biosensor. Un "biosensor", según se usa en el presente documento, significa un dispositivo sensor para la detección de cantidades, incluyendo cantidades muy pequeñas, o de cambios en una sustancia bioquímica o química, en el que se registra un acontecimiento de unión intermolecular y se traduce en datos.

5 "Biodetección", según se usa en el presente documento, significa cualquiera de una diversidad de procedimientos que usan sondas biomoleculares para medir la presencia o la concentración de moléculas biológicas, de estructuras biológicas, de microorganismos, etc., mediante la traducción de una interacción bioquímica en una señal física cuantificable.

10 Las aplicaciones de biodetección descritas en el presente documento incluyen: aplicaciones medioambientales, por ejemplo, la detección de pesticidas y de contaminantes en el agua de ríos; la detección remota de bacterias aerotransportadas o de esporas de las mismas, por ejemplo, en actividades anti-bioterroristas; la detección de patógenos; la determinación de los niveles de sustancias tóxicas antes y después de la biorremediación; la detección de organofosfatos; la medición analítica rutinaria de analitos bioquímicos; la detección de residuos de fármacos en alimentos, tales como antibióticos y promotores del crecimiento; el descubrimiento de fármacos y la evaluación de la actividad biológica de nuevos compuestos.

La presente memoria descriptiva describe, entre otros, un biosensor óptico basado en el sistema de detección de WGM. El biosensor puede ser compacto y portátil. Los biosensores descritos en el presente documento proporcionan un medio para la detección rápida y sensible de analitos.

20 El biosensor puede estar particularmente adaptado para un uso conveniente en laboratorios de investigación y analíticos y en el campo. El aparato de detección de WGM *per se* es adaptable para autocontención, miniaturización y portabilidad. Importantemente, está adaptabilidad permite una detección de analitos rápida y conveniente en la mesa de trabajo o en el campo, sin ninguna necesidad de componentes voluminosos y caros.

25 El aparato de detección de WGM no necesita una voluminosa fuente de potencia o fuente luminosa, ni un caro espectrofotómetro ni lente óptica. Por ejemplo, algunos aparatos proporcionan una lente objetivo de microscopio de 60X y se usa un espectrofotómetro no refrigerado con un ancho de ranura de 0,5 nm. El aparato de detección de WGM puede ser un biosensor.

Una fuente de potencia de desde aproximadamente 10 μ W hasta aproximadamente 2.000 μ W es suficiente para generar los datos espectrales de WGM de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento.

35 Las partículas microesferoidales conjugadas con un fluoróforo pueden ser expuestas a la luz durante aproximadamente 20 – 2.000 milisegundos. La luz a una longitud de onda de 532 nm es particularmente adecuada para la generación de los espectros de WGM de acuerdo con la presente invención.

40 En ciertos aspectos, las partículas microesferoidales se inmovilizan "horneando" en una matriz de soporte sólida, por ejemplo, de vidrio. El soporte sólido comprende un material al través del cual puede viajar el espectro de luz infrarroja, visible y ultravioleta.

45 Las microesferas pueden secarse en una superficie de vidrio durante unos tiempos mayores de 10 minutos a unas temperaturas por encima de 40 °C.

Un requisito clave del sistema es que los espectros pueden ser comparados automáticamente y pueden cuantificarse las diferencias entre antes y después de la unión. Esto se ha conseguido mediante el uso de una transformación logarítmica del espectro de tiempo-modo.

50 También se describe en el presente documento un kit para la detección de un analito mediante un medio de WGM. Dichos kits comprenden partículas microesferoidales conjugadas con un fluoróforo, a las que están unidas una multiplicidad de ligandos de unión al analito. Las partículas microesferoidales pueden estar inmovilizadas en una superficie de vidrio. La multiplicidad de ligandos que se va a anclar a las partículas microesferoidales puede estar diseñada para la detección de un conjunto específico de analitos. Por ejemplo, ensayar una muestra medioambiental para comprobar la presencia de uno o más patógenos humanos de significación en la salud pública, por ejemplo, *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus* resistente a la vancomicina y similares. Las microesferas pueden estar recubiertas con una genoteca de ácidos nucleicos derivada de otros diversos patógenos. Las combinaciones de ligandos para el anclaje a las partículas microesferoidales no están limitadas.

60 Cuando las partículas microesferoidales son de melamina formaldehído, el kit puede contener puntos cuánticos.

65 "Muestra medioambiental", según se usa en el presente documento, significa una muestra de cualquier material recogida a partir de una fuente medioambiental, tal como aire, agua o suelo. Una "fuente medioambiental", según se usa en el presente documento, se refiere al medio ambiente natural, a un medio ambiente artificial o a un medio ambiente extraterrestre. Otras muestras incluyen muestras de alimentos. Por lo tanto, el ensayo de WGM es útil en

la industria alimentaria, en los ensayos de aguas medioambientales, en la industria de la agricultura, en los ensayos de bio-terrorismo y en los ensayos farmacológicos.

Las partículas también pueden ser recicladas para un uso continuo y para el cribado de alto rendimiento.

Los cambios en el WGM indican la presencia de un analito. También es posible recoger información adicional a partir de los cambios en las intensidades relativas, en los anchos de la línea y en las longitudes de onda de los picos de WGM de una microesfera en particular.

La presente invención se describe adicionalmente mediante los siguientes Ejemplos no limitantes.

EJEMPLO 1

Las partículas microesferoidales (QSand- Marca registrada) conjugadas con una multiplicidad de ligandos de ADN muestran desplazamientos coherentes de los WGM cuando se unen a un analito

Las partículas microesferoidales conjugadas con un fluoróforo (QSand [marca registrada: partículas de sílice]) conjugadas con una multiplicidad de ligandos de ADN mostraron una diferencia medible y coherente después de su unión a un analito específico. Las partículas microesferoidales, de 4,87, de 5,6, de 6,8 o de 7,5 μm de diámetro, estaban conjugadas con una multiplicidad de moléculas de ADN de 22-mer con una etiqueta de TMR en la posición del nucleótido 1. Los WGM se adquirieron antes y después de la hibridación con el 22-mer complementario (Figura 1).

EJEMPLO 2

Optimización del aparato de WGM para la biodetección

Se evaluaron diversos parámetros con objeto de determinar si el sistema de detección de WGM podía ser adaptado para una miniaturización, autocontención y portabilidad.

La Figura 2 proporciona una ilustración esquemática del sistema de detección de WGM. En primer lugar se modificó la potencia de la fuente luminosa para determinar su efecto sobre la resolución de los WGM. Una potencia incidente de la fuente luminosa (532 nm, 200 milisegundos) de 6,3, de 50,2, de 214,5 o de 1.160,5 μW fue suficiente para resolver los WGM (Figura 3 B). Dicha potencia puede conseguirse con un láser de bajo coste estándar (un puntero luminoso).

Se modificó el tiempo de excitación con objeto de determinar su efecto sobre los WGM. Los WGM se evaluaron después de una exposición durante 10, 60, 200 y 1.000 milisegundos de luz incidente (50 μW , 532 nm). Se determinó que un tiempo de exposición tan corto como 200 ms era suficiente para resolver los WGM (Figura 4 C), disminuyendo la visibilidad hasta un tiempo de exposición de 5 segundos (Figura 4 E).

Se demostró que 200 milisegundos de exposición a una potencia luminosa de 50 microvatios eran adecuados para unos WGM de alta calidad.

EJEMPLO 3

Prototipo del biosensor de WGM

El prototipo del biosensor de WGM se construye según unas especificaciones que dan como resultado unos espectros de WGM bien resueltos antes y después de la unión de un analito a una partícula microesferoidal. El dispositivo mide aproximadamente 30 x 15 x 15 cm y pesa 2 - 5 kg, y está completamente autocontenido comprendiendo una fuente de potencia, una fuente luminosa, cámaras portadoras de muestras y un espectrofotómetro.

EJEMPLO 4

Inmovilización de las partículas microesferoidales

Las partículas microesferoidales (QSand [marca registrada: partículas de sílice]) se inmovilizaron en la superficie de un cubreobjetos de vidrio de microscopio en una configuración aleatoria (Figura 5). El cubreobjetos con las partículas QSand inmovilizadas (marca registrada) pudo ser acoplado directamente en la ranura del espectrómetro.

EJEMPLO 5

Desarrollo y caracterización de una plataforma de partícula única para la detección de oligonucleótidos objetivo no marcados, mediante el uso de Modos de galería de murmullos en microesferas fluorescentes individuales

En este Ejemplo, se demuestra el desarrollo de un sistema de biodetección barato, muy sensible, basado en los modos de galería de murmullos (WGM). El sistema comprende una microesfera de sílice funcionalizada con un fluoróforo y una densa monocapa de oligonucleótidos monocatenarios. La adsorción de la hebra complementaria provoca desplazamientos espectrales en el espectro de emisión de la microesfera que pueden ser registrados mediante el uso de un microscopio óptico convencional y un detector de CCD.

Materiales

Las microesferas de SiO₂ de 7,50 μm se adquirieron en Microparticles GmbH, Berlín, Alemania. Las partículas de sílice de 5,06 μm y 6,80 μm se adquirieron en (Bangs Laboratories Inc, EE.UU.). Los cubreobjetos reticulados fotograbados (de 18 x 18 mm) se adquirieron en Bellco Glass, Vineland, NJ, EE.UU. El (3-mercaptopropil) trimentoxisilano (MPS, al 95 %); el ortosilicato de tetraetilo (TEOS, al 98 %), la polivinilpirrolidona (PVP, PM de 40.000), el hidróxido de amonio (al 29,1 % % en peso de NH₃ en agua); el hidrato de (2-[N-morfolino] etansulfónico) (MES), el acetato de sodio (NaOAc), el persulfato de amonio (> 98 %) y el dimetilsulfóxido (> 99,9 %) se obtuvieron en Sigma-Aldrich. El ácido nítrico, el etanol, el metanol y el 2-propanol de calidad analítica fueron adquiridos en Merck, Victoria, Australia. La tetrametil rodamina marcada con colorante de éster de succinimidilo (TMR), el Bodipy 630/650 y el Alexa 647 fueron adquiridos en Molecular Probes, Eugene, EE.UU. En todo el proceso se usó agua de calidad Milli-Q (R > 18 M Ω cm). Los oligonucleótidos modificados con aciloilo fueron diseñados internamente y contruidos por Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, EE.UU. Los oligonucleótido contruidos se recibieron secos y se resuspendieron a 200 μM con H₂O Milli-Q ultrapurificada antes de su uso.

Instrumentación de caracterización

Configuración de la óptica Ocean

Los experimentos se realizaron con un microscopio Nikon Eclipse TE2000-S. La excitación de la fluorescencia de la microesfera se consiguió con una lámpara de mercurio de 80 W de Nikon a través de un filtro de bloque de 420 - 490 nm. Las señales de emisión del modo de galería de murmullos procedentes de las microesferas excitadas fueron capturadas en el aire con un espectrofotómetro QE6500 Ocean Optics. Todos los datos fueron capturados mediante el uso del correspondiente programa informático Spectra Suite. Normalmente los espectros de WGM se recogieron en 1 - 2 segundos con una resolución espectral de ± 0,9 nm con un tiempo de integración de 800 ms. La luz excitada a través del filtro se midió hasta una potencia de radiación coherente de 35,52 mW. Las partículas se visualizaron a través de un objetivo de inmersión en aceite Nikon Plan Fluor 100X, con una distancia de trabajo de 1,30 mm. La resolución espectral (± 0,9 nm) define la precisión con la que puede medirse la longitud de onda de un pico de fluorescencia. Los desplazamientos de los picos en una curva de respuesta de WGM pueden ser observados rutinariamente desde 0,1 nm hasta varios nm. La resolución óptica establecida por el fabricante indica que pueden detectarse rutinariamente unos picos con 0,14 nm – 7,7 nm de FWHM.

Cuando se utiliza el QE6500, generalmente se usaron los picos observados a 575 nm, 585 nm, 605 como picos de referencia debido a la baja proporción entre señal y ruido y a la nitidez de los picos individuales a estas longitudes de onda.

Microscopía confocal

En algunos casos se usó un espectrómetro TRIAX 550 enfriado con nitrógeno (Horiba Jovin Yvon, EE.UU.) unido a un microscopio confocal Lympus para recoger los espectros con una resolución espectral de ± 0,05 nm. Los resultados de ambos instrumentos eran los mismos dentro del error experimental. Se utilizó el espectrómetro TRIAX 500, que tiene unas mayores sensibilidad (resolución espectral calibrada ± 0,05 nm) y capacidades de intervalo de barrido (o – 1.500 nm) junto con la configuración de Ocean Optics para proporcionar una plataforma eficaz para confirmar y monitorizar los desplazamientos de los WGM, particularmente en la detección de unas muestras de ADN con una concentración extremadamente baja.

Los espectros de emisión en estado estacionario fueron registrados con un fluorímetro Jobin Yvon Fluorolog - 3. En el Ejemplo 6 A se aborda una descripción más amplia de la configuración del microscopio y de las condiciones de barrido usadas.

Microscopio electrónico de barrido (SEM)

Las imágenes de las microesferas también se recogieron mediante el uso de un SEM Philips de emisión de campo XL-30. Para hacer esto, las microesferas se lavaron con H₂O Milli-Q y se inmovizaron directamente en sustratos de sílice circulares de 12 mm, que a continuación se montaron en los soportes del SEM. Las muestras se recubrieron mediante un rociado con 3 - 5 nm de oro mediante el uso de un Edwards S150B Sputter Coater.

Diseño y construcción del fragmento de oligonucleótido

Las siguientes secuencias de oligonucleótidos monocatenarios objetivo y complementario fueron designadas aleatoriamente y nombradas con el único fin de esta investigación; por lo tanto, las homologías con secuencias génicas conocidas son pura coincidencia y deberían descartarse. Se sintetizaron las secuencias diseñadas y se encargaron en Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, EE.UU. Los oligonucleótidos se mantuvieron en forma de soluciones de trabajo a 200 µM en H₂O Milli-Q ultrapura.

Las secuencias de los oligonucleótidos y los nombres abreviados usados a lo largo de este Ejemplo se proporcionan a continuación. La modificación "iAm" proporciona un grupo amino interno libre (por ejemplo, usado para la fijación de los fluoróforos) en el fragmento de ADN que esencialmente es una base de nucleótido de T con el grupo -NH libre unido.

enl (T)
5' - /Acrd//iAm/ AT GGA ATT AAC CCT CAC TAA AGG GAG GAC AGC TAT GGA
CTG CTT CTA CAC AGT CTC CTG TAC CTG GGC A - 3' (SEC ID N°: 1)

α-enl (T)
5' - CAG GAG AC/iAm/GTG TAG AAG CAG TCC ATA GCT - 3' (SEC ID N°: 2)

40 base *α-enl* (T)
5' - GT CCT CCC CTT CAG GAG AC/iAm/GTG TAG AAG CAG TCC ATA GCT - 3'
(SEC ID N°: 3)

α-enl de 40 bases

20 base *α-enl* (T)
5' - CAG GAG AC/iAm/GTG TAG AAG CAG - 3' (SEC ID N°: 4)

α-enl de 20 bases

10 base *α-enl* (T)
5' - CAG GAG AC/iAm/G - 3' (SEC ID N°: 5)

α-enl de 10 bases

Control (secuencia objetivo aleatoria no específica)

(T)
5' - /Acrd//iAm/ TTA GGC CTA TGG ACA CGT GCG CAT GAT TTG CCT ATT CCG
AAT CCG CAG GAT GGG CCT TAC A - 3' (SEC ID N°: 6)

La secuencia /Acrd/ representa un grupo acrililo en 5' (Acrydite-marca registrada, Integrated DNA Technologies EE.UU.) unido a las secuencias de oligonucleótidos, y /iAm/ especifica la posición de una base de nucleótido de T que posee un grupo amino interno libre usado para la fijación del fluoróforo (Integrated DNA Technologies EE.UU.).

Métodos

20 Funcionalización de la superficie de las microesferas

Las microesferas de sílice usadas en esta investigación fueron funcionalizadas con grupos tiol mediante el uso de los procedimientos habituales de la bibliografía (Battersby *et al*, Chemical Communications 14: 1435 - 1441, 2002; Corrie *et al* Langmuir 22 (6): 2731 - 2737, 2006; Miller *et al*, Chemical Communication 38: 4783 - 4785, 2005; Johnston *et al*, Chemical Communications 7: 848 - 850, 2005; Verhaegh y Vanblaaderen Langmuir 10 (5): 1427 - 1438, 1994). Se lavaron alícuotas de 5 ml de las microesferas en bruto con 20 ml de H₂O Milli-Q mediante una centrifugación durante 2 min a 1.800 rpm. El sedimento se resuspendió en 20 ml de ácido nítrico 1,5 M seguido de una inversión suave con una rueda de agitación motorizada durante 30 min; el proceso se repitió tres veces. Después, las microesferas se lavaron con alícuotas de 20 ml de 2-propanol y se pusieron a reflujo en 2-propanol (20 ml) a 80 °C con agitación constante mientras se administraba MPS puro (100 µl) al 0,5 % v/v cada 30 min durante un período de 4 h para funcionalizar las partículas con grupos mercaptano. Las esferas funcionalizadas se lavaron a 1.800 rpm con 2-propanol y se resuspendieron en 10 ml de 2-propanol reciente. Esta suspensión de microesferas se dividió en alícuotas y se sedimentó a 8.000 rpm durante 5 s y se secó en un desecador en una atmósfera de

5 nitrógeno durante 230 min. Finalmente, se agitaron y se termocuraron para asegurar una evaporación completa del 2-propanol (90 °C) durante 30 min en un bloque de calentamiento. Todas las microesferas funcionalizadas se almacenaron desecadas a 4 °C en una atmósfera de nitrógeno. El procedimiento anterior da lugar a una funcionalización reproducible y densa de la superficie de sílice, y además asegura una reepitización cuantitativa de las microesferas después del almacenamiento.

Síntesis de microesferas dopadas con nanocrystal de superficie estratificada

10 Se usaron núcleos / cubiertas de nanocrystal de CdSe@ZnS que emitían en naranja con un máximo de emisión a 593 nm; FWHM de 32 nm. Se tomaron alícuotas a partir de una solución madre 10 µM. Las microesferas de sílice funcionalizadas con MPS se combinaron con nanocristales de cubierta de núcleo de CdSe@ZnS en una proporción de 1:2.5, se agitaron manualmente y después se pusieron en un rotador a unas rpm mínimas durante 15 min - 1 h. Después de la pasivación, se usó 2-propanol para emulsionar las dos fases, y la suspensión coloidal se agitó a 800 rpm durante 5 segundos; el sobrenadante se desechó a continuación y se llevaron a cabo varios lavados con CHCl₃ para eliminar los nanocristales libres o no adsorbidos. Se necesitaron 60 moléculas de PVP / nm² de área superficial en la microesfera para recubrir las microesferas pasivadas con CdSe@Zns, la PVP se disolvió con agitación durante 15 1 h en 9:1 de disolvente de reacción de CHCl₃:2-propanol. El sedimento de pasivación se resuspendió en la mezcla de reacción y se agitó ultravorticialmente y la reacción se dejó proceder durante una noche. El grupo amida polar del anillo de pirrolidona de la molécula de PVP facilita muy probablemente la quimiosorción en la superficie del nanocrystal a través de enlaces covalentes. Además, debido a los caracteres anfífilos de las moléculas, el recubrimiento ofrece estabilidad a la microesfera (hidrofobicidad y estabilidad en agua) y permite que la molécula sea absorbida en muchas superficies. Esto aumenta la afinidad de la partícula por el recubrimiento final de sílice sin el empleo de un agente de acoplamiento. Al día siguiente, las partículas que habían reaccionado se lavaron varias veces (8.000 rpm; 5 s) en 2-propanol y se mantuvieron a 4 °C en 2-propanol reciente. Las microesferas se recubrieron con una solución 1:200 de TEOS, se utilizó 1 ml de una solución de NH₃ al 4,2 % (en H₂O) por 1 ml de partículas recubiertas con PVP en la reacción y 1:200 volumen de TEOS (100 µl por 0,005 g de microesferas recubiertas con PVP). Se añadió TEOS con agitación y se dejó reaccionar durante una noche, seguido de varios lavados con 2-propanol. Todas las microesferas se mantuvieron suspendidas en 2-propanol y se mantuvieron a 4 °C.

Marcado específico con una base de oligonucleótido

30 Para marcar con colorante el grupo amino interno libre de las secuencias de oligonucleótido *enl* y *Control 5'* acrilóilo recibidas, se combinaron 15 µl de oligonucleótido madre 200 µM con 3,5' µl de TMR éster de succinimidilo-fluoróforo y 4,5 µl de una solución 1 M de NaHCO₃ en un tubo de eppendorf. La solución se incubó en la oscuridad (para 35 minimizar la fotodecoloración del colorante) durante 2 h a la temperatura ambiente con un mezclador ocasional. Para lavar y precipitar los oligonucleótidos marcados, la preparación se trató con una mezcla de 58 µl de H₂O Milli-Q, 10 µl de NaOAc y 200 µl de etanol, que se añadieron directamente a la reacción, y la solución se almacenó después en un congelador a -20 °C durante 30 min. Las muestras se centrifugaron entonces durante 20 min a 13.800 rpm y se eliminó el sobrenadante. Estas etapas se repitieron hasta que el sobrenadante de la muestra estaba exento de exceso de fluoróforo. Finalmente, los oligonucleótidos marcados se diluyeron hasta una solución de trabajo 200 µM con 100 µl de H₂O Milli-Q ultra-pura y se almacenaron en un congelador a -20 °C.

Acoplamiento del oligonucleótido de acrilóilo a las microesferas

45 Las microesferas funcionalizadas con tiol se derivatizaron con oligonucleótidos *enl* y *Control* objetivo modificados con 5' acrilóilo mediante el uso de los protocolos habituales (Hermanson, Bioconjugative Techniques, Sand Diego: Academic Press Incorporated, 785, 1996) como sigue: en el tubo de eppendorf se pesaron 0,002 g de microesferas de MPS funcionalizadas y después se saturaron con 100 µl de metanol mediante una microcentrifugación (a 8.000 rpm durante 5 s), y el sobrenadante se desechó. El sedimento se resuspendió en MES 0,5 M reciente (pH 5,4), seguido de la adición de 15 µl de oligo-secuencia marcada con TMR modificada con acrilóilo 200 µM (*enl* o *Control*) 50 junto con 100 µl de persulfato amonio reciente al 10 % p/v (p/v). La reacción se agitó vorticialmente y después se agitó suavemente con una rueda motorizada durante 1 hora. Las microesferas acopladas se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (tampón) [pH 9,0] y se sedimentaron con una microcentrífuga (8.000 rpm durante 5 s) para eliminar el sobrenadante. Todas las preparaciones de microesferas oligo-conjugadas se resuspendieron en 1 ml de tampón (2 g de esferas / litro) y se almacenaron a 4 °C. Los métodos utilizados para elaborar de forma rutinaria partículas de sílice modificadas con oligonucleótidos fluorescentes que producen los WGM presentados en este Ejemplo y presentados posteriormente en el Ejemplo 6 están ilustrados en la Figura 6. Estas partículas se 55 utilizan para demostrar las robustas y altamente sensibles capacidades de detección de los WGM cuando se utilizan en una plataforma de reconocimiento específica de ADN.

Método para la inmovilización de las microesferas en una placa matriz enrejillada

60 Para cada placa de ensayo se lavaron alícuotas de 10 µl (20 µg de microesferas por ensayo) de las microesferas *enl* o *Control 3* - 4 veces por separado en tubos de eppendorf con porciones de 1 ml de H₂O Milli-Q (8.000 rpm durante 5 s). Las microesferas lavadas se resuspendieron en 120 µl de H₂O Milli-Q y agitaron vorticialmente y se puntearon en placas de sílice enrejilladas individuales. Cada matriz con partículas se colocó después en un bloque / placa de

calentamiento (90 °C) para inmovilizar las partículas y evaporar completamente cualquier exceso de agua. Durante el calentamiento, las placas matriz se agitaron vorticialmente suavemente mediante el acoplamiento de una mezcladora vorticial al bloque de calentamiento para asegurar una dispersión exhaustiva de los coloides.

5 Condiciones del ciclo de hibridación

Como en las preparaciones para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Rychlik *et al*, Nucl. Acids Res. 18 (21): 6409 - 6412, 1990), se empleó un gradiente de temperatura en dos etapas para todos los ciclos de la reacción de hibridación. Una vez se había administrado el ADNc, la placa matriz se puso en un bloque de calentamiento a 90 °C durante unos tiempos que variaban entre 10 s - 5 min. A continuación las matrices se enfriaron hasta la temperatura ambiente durante 5 min para asegurar un tiempo suficiente para que las sondas de ADNc se aparearan con los oligonucleótidos objetivo.

15 Ensayo de hibridación de partícula única-ADNc

Se diluyó una muestra de la solución madre de ADNc 200 µM en PBS (1:40), y la muestra se agitó vorticialmente. Se aplicó una alícuota de 120 µl en cada placa matriz (suficiente para sumergir completamente el área de la matriz enrejillada). Cada matriz con partículas experimento después un único ciclo de hibridación de 90 s. Para el ensayo con el reactivo de control, cada rejilla se trató con 120 µl de las soluciones de control: H₂O Milli-Q, seguido de tampón (PBS), ADN no específico y ADNc (como anteriormente), y se llevó a cabo un ciclo de hibridación de 90 s para cada placa de tratamiento. Todas las matrices se dejaron reposar a la TA durante 5 min, después se lavaron suavemente con porciones de 100 µl de H₂O Milli-Q para eliminar cualquier ADN en la fase de disolución (sin reaccionar). Salvo que se indique de otro modo, el exceso de agua en todos los ensayos posteriores al tratamiento ADNc se eliminó mediante evaporación en un bloque de calentamiento (90 °C). Entonces se capturaron en el aire las mediciones de las señales de fluorescencia de excitación y de emisión procedentes de las esferas tratadas.

Ensayo de desnaturalización del ADNc

Se llevó a cabo la hibridación como anteriormente y después se efectuó la desnaturalización mediante el calentamiento de las muestras hibridadas en un bloque de calentamiento a 90 °C durante 30 s. Inmediatamente se eliminó el tampón mediante varios lavados de 100 µl con H₂O Milli-Q. Las etapas de desnaturalización se repitieron tres veces, seguido de la evaporación del exceso de líquido y finalmente la medición de la emisión desde las partículas seleccionadas.

35 Estudios de caracterización de las partículas

Aplicación de las partículas

La finalidad inicial de este Ejemplo implicaba la funcionalización superficial de las microesferas de sílice (< 10 µm) con cubiertas de núcleo de CdSe (emisor) para permitir la creación de una señal de WGM mediante una iluminación ultravioleta (UV) (Gomez *et al*, Small 1 (2): 238 - 241, 2005). Después las partículas de NC se cubrieron con varias capas estabilizantes orgánicas y se pretendía que la capa funcional final fuera con una biomolécula seleccionada. Desafortunadamente, la estabilidad de los nanocristales utilizados en los experimentos estaba comprometida; los tratamientos progresivos dieron lugar a una coherente fotodegradación y a la pérdida de unos picos discernibles de WGM antes de que pudiera realizarse cualquier posible conjugación con una molécula biológica. La significativa pérdida de fotoluminiscencia fue debida probablemente a la desorción / ruptura de la capa de nanocristal. La fotoestabilidad de los nanocristales estaba claramente comprometida cuando se exponían a los disolventes de reacción utilizados en la fase de recubrimiento con PVP y TEOS. La siguiente investigación perfila la metodología alternativa, que implicaba la funcionalización superficial de una microesfera con fragmentos oligoméricos monocatenarios marcados con colorante directamente en la superficie de una partícula funcionalizada con tiol. La metodología alternativa forma la base de los Ejemplos posteriores.

Ensayo de hibridación de partícula única

Cada microesfera funcionalizada individual muestra una huella única de WGM. Consecuentemente, es necesario que los bioensayos se lleven a cabo con las mismas partículas antes y después de la exposición a una solución de ensayo. Para conseguir esto, las partículas se inmovilizaron en una matriz de sílice enrejillada y se recogió un mapa detallado de las microesferas del objetivo *enl* y de *Control* de las rejillas de ensayo. Cada microesfera se numeró con respecto a otra cuya señal de emisión se estaba midiendo; después se cartografió su ubicación específica mediante el uso del correspondiente número de escaneo, que se anotó en un esquema gráfico que representaba una única rejilla grabada. Mediante el uso de las matrices enrejilladas, la misma microesfera podía ser reubicada rutinariamente después de la exposición a las diversas soluciones de ensayo y a los controles. Sin embargo, el índice de refracción de las microesferas es bastante bajo y fue difícil la obtención de unos espectros de WGM de alta calidad a partir de las microesferas sumergidas en la solución debido al bajo contraste del índice de refracción. Esto era un problema fundamental e inesperado. La discrepancia en el índice de refracción entre la sílice coloidal y el

agua es insuficiente para soportar un WGM. Consecuentemente, los protocolos se diseñaron de forma que todos los espectros pudieran ser recogidos en el aire.

Las placas matriz se trataron con un *does* de 120 μ l del α -*enl* complemento objetivo. La etapa inicial de hibridación implicaba la colocación de las rejillas de ensayo en un bloque de calentamiento a 90 °C; calentando lentamente la solución, cualquier ADN oligomérico o agregado que esté presente en la solución objetivo es peptizado para facilitar la hibridación con el ADN de sonda de la microesfera. El enlace de acrilóilo / sulfhidrilo formado cuando se conjugó el oligonucleótido de sonda con la superficie de las microesferas efectivamente unió e inmovilizó la secuencia de la sonda objetivo a la superficie de las esferas y no se vio afectada por el subsiguiente calentamiento a 90 °C. Las matrices se enfriaron durante 5 min a la TA para dejar un tiempo suficiente para que las sondas del ADNc de α -*enl* se aparearan con las microesferas objetivo de *enl*. Después se lavaron las rejillas y se eliminó todo el exceso de agua mediante evaporación en un bloque de calentamiento. Después del tratamiento con la sonda de α -*enl*, se reubicaron las mismas partículas individuales y se recogió un segundo conjunto de espectros en el aire. Se analizó fluorimétricamente el espectro de fluorescencia de la TMR marcada con colorante empleada para marcar las secuencias objetivo del oligonucleótido *enl* y del *control*. El intervalo de emisión del colorante mostró el rango esperado de la señal de emisión de las microesferas, que debería estar definido por el intervalo de emisión del fluoróforo seleccionado. La señal de emisión del WGM entra en el intervalo de excitación del colorante de TMR. Los espectros de WGM muestran un claro desplazamiento hacia el rojo, aunque no todos los picos cambian igualmente. Para la muestra mostrada, los desplazamientos de pico observados después de la hibridación del α -*enl* ADNc medidos a las longitudes de onda de 575 (1,1 nm), de 585 (1,5 nm), de 595 (1,1 nm) y de 605 nm (1,1 nm) son todos hacia longitudes de onda más largas en comparación con la señal de emisión previa a la hibridación, es decir la hibridación da lugar a unos desplazamientos hacia el rojo de los principales picos del espectro de WGM.

Unión no específica, reactivos de control y efectos del tampón

Entonces se estableció un ensayo de control para investigar los efectos de los reactivos de control sobre la señal del modo de galería. Se trató una única placa de ensayo con H₂O Milli-Q, una secuencia de ADN no específica y finalmente la sonda de ADNc. Se llevó a cabo un ciclo de hibridación de 90 s para cada tratamiento de etapa, las esferas seleccionadas se reubicaron y se recogieron los espectros de fluorescencia después de cada etapa. Cuando las microesferas se expusieron al tratamiento con Milli-Q y con ADN no específico no se observó ningún desplazamiento de pico coherente. Sin embargo se observaron desplazamientos hacia el rojo coherentes cuando la microesfera se expuso al ADNc (α -*enl*). La causa de los desplazamientos hacia el azul resultantes no está clara después del tratamiento con H₂O Milli-Q, sin embargo, en comparación con la exposición al ADN complementario objetivo, el resultado clave es que no se ha apreciado ninguna relación entre el tratamiento posterior con ADN no específico y el tratamiento con el reactivo de control. No hay ninguna preocupación relativa a la relación entre señal y ruido ya que el formato de partícula única del experimento se ajusta a esto, por lo que en esta etapa el resultado simplemente sugiere que el desplazamiento hacia el azul es un resultado aleatorio específico.

Ciclación del ensayo de WGM

El aspecto implicaba la comprobación de si los ensayos son reversibles, es decir, si la desnaturalización del ADN daría como resultado un desplazamiento hacia el azul a la posición original, y si la reacción de hibridación llevada a cabo una segunda vez sobre la misma microesfera también provocaría un desplazamiento hacia el rojo. Esto nos permitiría confirmar que los desplazamientos espectrales son debidos al reconocimiento biomolecular y no sólo a una unión no específica por parte del ADN. Adicionalmente, la capacidad para ciclar a lo largo de repetidos ciclos de adsorción-desorción permitiría el diseño de un ensayo estadísticamente más fiable, en el que podrían promediarse los desplazamientos de pico a lo largo de varios ciclos. Después de la hibridación del ADNc a la microesfera de sonda, se apareó a 90 °C en tampón diluido para intentar la desnaturalización del ADN y provocar la desorción de la secuencia objetivo.

Se registraron los espectros, y los desplazamientos se muestran en la Figura 7, junto con los resultados de un segundo ciclo de hibridación. Como puede observarse, un apareamiento prolongado en tampón diluido no da lugar a un desplazamiento hacia el azul de los cuatro picos principales, y una segunda hibridación da como resultado un desplazamiento hacia el rojo, lo que indica que los ciclos del ensayo pueden ser repetidos, aunque los desplazamientos observados no son coherentes con una reversibilidad completa. La Figura 7 es una representación amplificada de las posiciones de los picos en cada etapa del ensayo de hibridación a partir de una esfera reubicada seleccionada.

EJEMPLO 6

Detección de attomoles de objetivos oligoméricos sin marcar mediante el uso del modo de galería de murmullos en microesferas fluorescentes individuales

En este Ejemplo se determina la sensibilidad y el límite y la velocidad con la que puede llevarse a cabo el ensayo.

El Ejemplo 5 mostró que coloides de sílice individuales funcionalizados con fragmentos oligonucleótidos monocatenarios y pueden definir entre diferencias de bases de 10 nucleótidos de una sonda objetivo de ADNc. En este Ejemplo, los resultados demuestran que el sistema basado en los WGM es capaz de una detección rápida y específica de los fragmentos de ADN complementario objetivo a la temperatura ambiente (TA), a unas concentraciones sub-picomolares y en sólo unos pocos minutos mediante el uso de muestras de varios microlitros. Los resultados indican que es posible la detección de attomoles de fragmentos de ADN sin marcar sobre una base rutinaria.

Sección experimental

A continuación se describe un esquema simplificado que detalla los métodos de síntesis de partículas y del ensayo de hibridación (Figura 8). Los Fragmentos de ADN utilizados fueron como se usaron en el Ejemplo 5 junto con el aparato de caracterización del modo de galería de murmullos.

Instrumentación y métodos de caracterización

Se recogieron espectros con una mayor resolución en el aire con un microscopio de barrido láser FV-500 Olympus Fluoview IX71 (Olympus, EE.UU.) acoplado a un espectrómetro Triax 550 y a un detector externo CCD-3000v (Jobin Yvon, EE.UU.). Las partículas se visualizaron a través de un objetivo de inmersión en aceite Olympus UPlanSApo 100XO, con una distancia de trabajo de 0,13 mm. Los espectros pudieron ser recogidos a los 5 s - 2 min (dependiendo del intervalo de escaneo de longitudes de onda) con una resolución espectral de 0,05 nm. La fotoluminiscencia y los espectros de la muestra se recogieron mediante el uso de una cámara CCD enfriada con nitrógeno líquido (137 K). Las partículas se excitaron mediante un láser de Ar⁺ Melles Griot X2 multi-línea (Melles Griot, EE.UU.) normalmente a una potencia de excitación de 350 μ W. Las señales de emisión se recogieron normalmente con el punto central de la longitud de onda a un filtro de corte de desde 600 nm hasta 550 nm con un tiempo de integración de 2 s.

Métodos

Un entorno de ensayo 'real' es aquel en el que las partículas funcionalizadas son expuestas a diversos reactivos de control, analitos sin marcar específicos y no específicos y tampones de hibridación en las condiciones de reacción según se recogen en el Ejemplo 5. Una plataforma de detección competitiva actual comercializada debería ser capaz de detectar rutinariamente concentraciones sub-picomolares de analito. Este Ejemplo investiga si el ensayo de WGM puede llevarse a cabo a la temperatura ambiente y se determina el límite de detección del sistema presentado en el Ejemplo 5. Salvo que se indique de otro modo, los ensayos llevados a cabo en este Ejemplo fueron según se recoge en el Ejemplo 5.

Ensayo de sensibilidad de hibridación de la sonda complementaria

Para el siguiente ensayo de hibridación se llevaron a cabo diluciones sucesivas con la solución madre de ADNc de α -en1 200 μ M para crear soluciones objetivo cuya concentración de ADNc variaba desde 10^{-15} M hasta 10^{-7} M. Cada muestra se agitó vorticialmente meticulosamente y se aplicó una alícuota de 120 μ l de cada solución de sonda a matrices objetivo individuales de en1. Cada matriz con partículas se colocó después en un bloque de calentamiento a 90 °C y se llevó a cabo la reacción de hibridación durante 90 s. Las muestras se dejaron reposar a la temperatura ambiente durante 5 min y se lavaron suavemente con porciones de 100 μ l de H₂O Milli-Q. Después del tratamiento, las placas matriz se lavaron con H₂O Milli-Q para diluir el tampón de reacción salino y asegurar que cuando se evapore el exceso de reactante, esa deposición de sal - cristal en la placa de ensayo esté minimizada. Después se recuperaron las partículas y se midieron las pertinentes señales de emisión 'post-hibridación'.

Ensayos de la cinética de hibridación a la temperatura ambiente

Se prepararon cinco matrices con los sensores en1-objetivo inmovilizados. Los correspondientes mapas de partículas se anotaron y se recogieron los espectros de WGM mediante microscopía de fluorescencia y una excitación como se ha detallado más arriba. Dado que el ensayo se realizó a la TA, el tratamiento de la sonda preparado en tampón ($2,50 \times 10^{-8}$ M de α -en1) se calentó durante 10 min a 90 °C antes de su uso para asegurar que los fragmentos de ADN de α -en1 eran monocatenarios. Cada placa de matriz preparada se trató después con alícuotas de 120 μ l de la solución del α -en1 monocatenario $2,50 \times 10^{-8}$ M elaborada en tampón. Después las matrices se ensayaron durante un único ciclo de hibridación de 10 s, de 30 s, de 60 s, de 180 s o de 300 s a la TA. Después del tratamiento, las placas de matriz se dejaron reposar durante 5 min a la TA, se lavaron con H₂O Milli-Q y se secaron. Después se recuperaron los sensores y se midieron las pertinentes señales de emisión.

Investigación sobre la sensibilidad y la hibridación a la temperatura ambiente

Ensayo de WGM de partícula única

Se adquirieron las firmas del modo galería a partir de partículas de sílice de 7,50 μm funcionalizadas con fragmentos de oligonucleótido de con 70 bases marcados con TMR mediante el uso de dos configuraciones de caracterización. La primera, un microscopio de fluorescencia TE2000-S Nikon acoplado a un detector óptico CCD ocean ($\pm 0,9$ nm) (Figura 8 A), y se adquirieron espectros de mayor resolución mediante el uso de un microscopio de barrido láser Olympus Fluoview IX71 (Olympus, EE.UU.) acoplado a un espectrómetro TRIAX ($\pm 0,05$ nm) Figura 8 B. La característica clave de la plataforma de reconocimiento desarrollada es el método de "partícula única" utilizado para la evaluación de la partícula. El siguiente esquema (Figura 8 C) ilustra la razón fundamental del formato elegido y por qué es crucial en un sistema basado en WGM. El punto clave que se debe apreciar en el esquema es que el uso de las propiedades ópticas de los WGM en una plataforma de detección, promediando los espectros a partir del conjunto de resultados, no puede llevarse a cabo con éxito ya que como muestra el ejemplo las partículas modificadas de forma idéntica, a partir de la misma muestra, tienen una firma de emisión única. Finalmente, una única partícula actúa como su "propia referencia", y por lo tanto una única partícula puede contemplarse como un único experimento. Este parámetro formaba la variable analítica fundamental del ensayo de hibridación desarrollado.

15 *Sensibilidad*

Se preparó una dilución sucesiva inicial (tampón) de la solución madre de la sonda de ADNc con unas concentraciones que variaban desde 10^{-7} M hasta 10^{-15} M. Se capturaron las señales de emisión de una selección de microesferas individuales antes y después de la exposición al tratamiento con ADNc. Las longitudes de onda del pico de emisión o las posiciones de modo a las longitudes de onda cercanas a los 575, 585, 595 y 605 nm fueron analizadas en función de la concentración ADNc (Figura 9 A). La Figura 9 B presenta la relación entre el desplazamiento del pico ($\Delta\lambda$) del espectro de emisión en función de la concentración de ADNc. Existe un claro desplazamiento hacia el rojo del espectro de emisión después de la exposición para prácticamente todos los picos de emisión de los WGM en contraste con el ensayo del control (tratamiento con Milli-Q), que dio como resultado un desplazamiento del pico direccional no coherente. Para los propósitos del ensayo, es suficiente destacar que prácticamente todos los modos muestran un desplazamiento hacia el rojo después de la adsorción del ADN. Adicionalmente, es reversible después de la desnaturalización del ADN a unas temperaturas por encima de la temperatura de fusión. Dado que los desplazamientos $\Delta\lambda$ eran de sólo 1 - 4 nm para la mayoría de los ensayos, se realizó una investigación más detallada de los desplazamientos de modo mediante el uso de un espectrómetro Triax 550 con una resolución espectral de $\pm 0,05$ nm. La Figura 9 C presenta un espectro típico de WGM a partir de la misma partícula objetivo de *enI* antes y después de la exposición al ADNc.

Es importante reconocer que, dado que cada microesfera individual tiene su propia firma de WGM, la detección se basa únicamente en los desplazamientos observados o no observados con la misma microesfera individual. No es posible promediar los resultados de múltiples microesferas. En el momento actual, los desplazamientos reales observados para una detección positiva con cualquier microesfera individual son normalmente de 1 - 2 nm para las microesferas empleadas, y menos de esto para los controles. Por lo tanto, como los niveles de detección eran extremadamente bajos, cada experimento sólo pudo ser correlacionado con el comportamiento de la misma partícula. En datos tales como los mostrados en la Figura 9 A, en los que se muestran los resultados de diferentes microesferas, las diferencias en los desplazamientos absolutos de cada partícula no son significativas. Los criterios para la detección, independientemente de si son desplazamientos espectrales coherentes, son detectados por cualquier partícula individual para una exposición dada a los reactivos.

45 *Análisis*

La resolución espectral de la configuración de CCD empleada generalmente en esta investigación podría limitar la sensibilidad de los sensores de WGM. La sensibilidad depende de forma crítica de la resolución espectral del detector empleado. El detector Ocean Optics tiene una resolución de 0,9 nm, y los picos de emisión de WGM están atenuados debido a la baja resolución espectral. Por lo tanto no puede deducirse ninguna información a partir de las formas del modo. No obstante, estos espectrómetros simples permiten llevar a cabo el ensayo de forma barata y podría realizarse rutinariamente en el campo.

Los desplazamientos hacia el rojo inducidos por la hibridación son observados de forma rutinaria con partículas de 70 bases-oligomodificadas tratadas con concentraciones sub-picomolares de ADNc a partir de un volumen de dosis de 120 μl . Son necesarios un Benchtop, CCD enfriados con LN2 y monocromadores enrejados para la adecuada conservación y caracterización de los modos de WGM de las microesferas, pero para los propósitos del ensayo, dicha elevada resolución no es un prerrequisito. A las concentraciones más bajas de ADN se pueden observar pequeños desplazamientos aleatorios hacia el azul en las partículas post hibridadas. Estos indican que la emisión de WGM puede verse afectada por pequeñas perturbaciones tales como cambios ínfimos en el índice de refracción de la solución debidos a fluctuaciones en la temperatura y a la concentración de electrolitos. Esto determina el límite práctico final posible de la sensibilidad para estos bioensayos en un medio acuoso. Consecuentemente, únicamente se toman los desplazamientos hacia el rojo coherentes de cuatro o más picos para indicar un acontecimiento de detección positivo.

También se ha demostrado aquí que el sistema puede emplearse con éxito a la temperatura ambiente, estando la detección del objetivo indicada por los desplazamientos en el modo de resonancia en las señales de emisión de la

microesfera a los 10 segundos de exposición al ADNc. Esto minimiza los problemas asociados con una deposición y una cristalización salinas, los cambios en el pH, la sequedad y la contaminación que se producen cuando la temperatura del entorno de la microesfera aumenta para desnaturalizar cualquier sonda unida no específicamente y permite un apareamiento eficaz del ADN con las microesferas. Las mejoras mencionadas anteriormente son importantes para el desarrollo global de la plataforma de biodetección basada en los WGM para el análisis de ADN.

EJEMPLO 7

Detección en disolución de objetivos de polimorfismos de nucleótido único sin marcadores, mediante el uso de modos de galería de murmullos en microesferas individuales de Melamina

Un inconveniente de la plataforma de WGM basada en sílice es que no puede usarse completamente en disolución. En este Ejemplo, las limitaciones relacionadas con el actual sistema de WGM son aliviadas mediante el diseño de un protocolo de conjugación junto con el desarrollo de un sistema de genotipado basado en una solución muy sensible para el modo de galería de murmullos (WGM). El sistema comprende una microesfera de melamina formaldehído uniforme muy reticulada ($\cong 7,52 \mu\text{m}$) funcionalizada con un fluoróforo y una monocapa de oligonucleótidos monocatenarios. Mediante el uso de un sistema de pocillos en microplaca, puede realizarse completamente un ensayo en disolución. El sistema de WGM sin marcadores puede evaluar objetivos de ADN polimórfico amplificado con una sensibilidad sub-picomolar. Pueden usarse los desplazamientos de frecuencia detectados en el agua para monitorizar la desnaturalización del complejo bicatenario post-hibridación a unas temperaturas elevadas. Controlada por un gradiente de temperatura en dos etapas, también se demuestra la capacidad de intercambio óptico del sensor basado en polímero, ya que los desplazamientos de los WGM pueden ser revertidos y reactivados de forma rutinaria.

Con esto en mente, las partículas biocompatibles de composite de melamina están disponibles en el mercado en una amplia variedad de tamaños de partícula (300 nm -12 μm). El elevado índice de refracción del material (nr 1,68) que es mayor que el del polimetilmetacrilato (nr 1,48), la sílice y la mayoría de los demás materiales vítreos (nr 1,47 - 1,50) ofrece una ventaja clara. Los cálculos mediante el uso de la teoría de Mie sugieren que el aumento en la discordancia entre los índices de refracción entre una partícula de MF y un medio acuoso externo (nr 1,33) debería mejorar el factor de calidad de los WGM. Importantemente, la discrepancia es lo suficientemente grande para permitir llevar a cabo ensayos simplificados en disolución.

Este Ejemplo examina el desarrollo de un "ensayo en húmedo" de partícula única sin marcador de WGM para la detección del objetivo oligomérico. Las partículas poseen unos factores Q similares a los de las microesferas de sílice del mismo tamaño en el aire. Mediante el uso de señales luminiscentes de WGM, el ensayo puede detectar rutinariamente niveles sub-picomolares de fragmentos de nucleótidos sin marcar en disolución en un formato de mesa de trabajo de una microplaca de pocillos. Los hallazgos presentados muestran que las señales fluorescentes de WGM en microesferas de melamina formaldehído (MF) muy reticuladas (< 10 μm) discriminan positivamente un único polimorfismo de nucleótido (SNP) entre fragmentos no marcados amplificados mediante una PCR del ADN genómico (gADN) de tres individuos portadores de un nucleótido diferente en un *loci* en particular.

Sección experimental

Materiales

Las microesferas de Resina de Melamina Formaldehído de 7,52 μm ($\text{C}_5\text{H}_8\text{N}_6\text{O}$)_n [MF] se adquirieron en Microparticles GmbH, Berlín, Alemania. Las placas de microtitulación de policarbonato de 384 pocillos, las placas de cultivo celular de 96 pocillos y las placas de microtitulación ópticas de 384 pocillos se adquirieron en NUNC, Bruselas, Bélgica. El colorante de marcaje de éster de succinimidilo Bodipy 630/650 se adquirió en Molecular Probes Eugene, EE.UU. Todos los demás reactivos, tampones y microesferas de composite se adquirieron en los proveedores mencionados previamente. Toda la instrumentación y los métodos de caracterización de los WGM utilizados son según se han descrito en los Ejemplos 5 y 6.

Instrumentación

Se utilizó un microscopio del sistema peltier de etapa invertida PE100-NI para los estudios de hibridación por termociclado. El esquema comprendía un abanico de microscopios invertidos diaphot con una mesa XY adaptada para una mesa de microscopio Nikon TE200/300. El intervalo de temperatura de la fase (desde -5 hasta 99 °C) se controlaba con una etapa peltier PE100-I de calentamiento / enfriamiento. La etapa estaba acoplada a una bomba de circulación de agua para regular la temperatura de la etapa. Con unas modificaciones menores, la configuración anterior también se montó en un microscopio IX71 Olympus.

Secuencias de ADN objetivo de SNP humano

rs10430 objetivo (conjugado con una partícula) 5' - /5Acrd//iAm/1'C GCC GGG ACA TCT GCC
(T)
AGT GG[T] CTC CTG -3' (SEC ID N°: 7)

(T)
α- rs10434 A (complemento) 5'- CAG GAG [A]CC AC/iAm/ GGC AGA TGT CCC GGC
GAA - 3' (SEC ID N°: 8)

(T)
α- rs10434 B (desapareamiento) 5'- CAG GAG [C]CC AC/iAm/ GGC AGA TGT CCC GGC
GAA -3' (SEC ID N°: 9)

* Los paréntesis denotan el desapareamiento de la base de nucleótido

Los Fragmentos de ADN recogidos anteriormente se marcaron según se indica en el Ejemplo 5 salvo que se indique de otro modo (Nuhiji y Mulvaney, Small 3 (8): 1408 - 1414, 2007).

Región del SNP rs10434.

5' - TGG AAG ATT CAG GAG CCT GGG CGG CCT TCG CTT ACT CTC ACC TGC
TTC TGA GTT GCC CAG GAG [A/G] CC ACT GGC AGA TGT CCC GGC GAA GAG
AAG AGA CA - 3' (SEC ID N°: 10)

Las regiones amplificadas mediante PCR del gADN que contenían el SNP rs10434 marcado del Individuo 1 [A/A]; del Individuo 2 [A/G]; del Individuo 3 [G/G] fueron proporcionadas por el International Diabetes Institute (Melbourne, Australia). El genotipado se realizó mediante el uso del sistema MassARRAY (Sequenom, San Diego, CA), según se describió previamente (Peyrefitte *et al*, Mechanisms of Development 104 (1 - 2): 99 - 104, 2001). En resumen, se diseñaron los cebadores de la PCR para el rs10434 mediante el uso de SpectroDESIGNER para amplificar un fragmento de 97 pb que rodea el sitio variante. Las reacciones se llevaron a cabo mediante el uso de 2,5 ng de ADN genómico, 2,5 mmol/l de MgCl₂, las concentraciones habituales de los demás reactivos de la PCR y 0,1 unidades de polimerasa de ADN Taq HotStar (Qiagen, Alemania) en un volumen de reacción total de 5 µl. Los fragmentos se aislaron por electroforesis mediante el uso del kit de extracción en gel Qiaquick (Qiagen, Alemania) según las instrucciones del fabricante.

Cebador

directo

****ACGTTGGATGATGTGTCTCTTCTCTTCGCC (SEC ID N°: 11)

Cebador

indirecto

****ACGTTGGATGCCTTCGCTTACTCTCACCTG (SEC ID N°: 12)

Métodos

Conjugación mediada por acríloilo de fragmentos de oligonucleótidos con microesferas

Las partículas de melamina en bruto se lavaron varias veces con Milli-Q (8.000 rpm durante 5 s) y se almacenaron en seco y desecadas a 4 °C en una atmósfera de nitrógeno. Las partículas lavadas de MF (2 mg) se pesaron en un tubo de eppendorf. La química superficial nativa de las partículas de melamina (Gao *et al*, Macromolecular Materials and Engineering 286 (6): 355 - 361, 2001) proporcionó una robusta superficie de conjugación para inmovilizar los

fragmentos de oligonucleótidos monocatenarios. Mediante la utilización de los fragmentos modificados con un grupo ácido acrílico en 5' (acrilóilo) se llevó a cabo la funcionalización de las partículas en una única reacción a la temperatura ambiente (Sharmin *et al*, progress in Organic Coatings 50 (1): 47 - 54, 2001). Las partículas se resuspendieron en PBS reciente, seguido de la adición de 15 µl de oligonucleótidos marcados con acrilóil-TMR 200 µM. La reacción se agitó vorticialmente y se mezcló suavemente con una rueda motorizada durante 1 h. Las microesferas acopladas se lavaron con tampón y se sedimentaron con una microcentrífuga (a 8.000 rpm durante 5 s) para eliminar el sobrenadante. Todas las preparaciones de microesferas oligo-conjugadas se resuspendieron en 1 ml de tampón (2 g de esferas / litro) y se almacenaron a 4 °C. En la Figura 10 A se presenta un esquema del proceso de conjugación.

Estudio de la etapa de calentamiento de la partícula única con el microscopio

i) Dilución de las microesferas

Las microesferas se diluyeron inicialmente en una serie de cuatro diluciones tomando 1 µl de la solución madre de microesferas (2 mg / 1 ml) y resuspendiéndolo en 1 ml de Milli-Q (dilución 1) y agitando vorticialmente. Después se resuspendieron 250 µl de la dilución en 1 ml de H₂O Milli-Q y se agitó vorticialmente. Este proceso se repitió con la nueva dilución tres veces. Una alícuota de 1 µl de la dilución 3 o 4 normalmente contendría 1 partícula / µl.

ii) Inmovilización de las microesferas individuales

Se aplicó una alícuota de 1 µl de la dilución 3 a la base de un único micropocillo y se monitorizó el número de microesferas de la gota. Cuando se ha establecido el recuento de una partícula, se registra el espectro de emisión de las partículas después de la adición de un volumen de 49 µl de tampón reciente a pH 7,0. Las partículas de melamina fueron inmovilizadas en la base de los micropocillos individuales bajo los efectos de la gravedad.

iii) Ensayo del control sólo con tampón y de la sonda objetivo rs10434

La temperatura de la etapa de calentamiento se incrementó hasta 37 °C y se dejó equilibrar durante 2 min, y después se capturó un único espectro. Después se aplicaron en el pocillo 5 µl de Milli-Q o de una solución de la sonda objetivo 2 µM. La temperatura de la etapa se aumentó hasta 72 °C y se mantuvo durante 2 min, seguido de la adquisición espectral. Finalmente, la temperatura de la etapa se disminuyó hasta 37 °C o hasta la temperatura ambiente.

Ensayo de hibridación del rs10434 mediante el uso de fragmentos de ADN procedente de muestras de ADN genómico de control amplificadas mediante una PCR

i) Tratamiento de hibridación de la sonda objetivo

Se aplicaron 2 µl de la solución de la sonda de ADN objetivo deseada (10 ng / µl) directamente a un pocillo que contenía una única partícula objetivo rs10434-MF. Se llevó a cabo un ciclo de hibridación de 5 min a 90 °C seguido de un ciclo de enfriamiento de 10 min a la temperatura ambiente. Los escáneres de la señal de emisión se adquirieron después de cada ciclo (x 3). El tratamiento de hibridación se repitió para las muestras de ADN de los individuos 1, 2 y 3. Todas las señales de emisión fueron capturadas en disolución y no se realizó ningún lavado ni modificación del tampón de reacción.

Salvo que se indique de otro modo, todos los ensayos posteriores al tratamiento de exposición de la sonda objetivo fueron escaneados mientras las microesferas permanecían sumergidas en tampón de hibridación. Las mediciones de la señal de fluorescencia de excitación y de emisión procedente de las esferas tratadas fueron capturadas en disolución, normalmente a un tiempo de integración de 500 ms - 2 s cuando se usaban placas de sílice enrejilladas y placas ópticas de 384 pocillos. Las placas pudieron almacenarse a 4 °C y las microesferas pudieron emplearse con éxito en ensayos de hibridación adicionales según se requiriera.

Estudio de desarrollo y caracterización de la partícula

Propagación de los WGMs en disolución

Los fragmentos de oligonucleótido usados para la funcionalización de las microesferas fueron diseñados y contruidos para mimetizar una hebra de 30 bases que abarca la región del SNP rs10434 genoma humano. La secuencia es homóloga con la región del cromosoma 6. El análisis de la secuencia indica que la región codifica para el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) [Awata *et al*, Biochemical and Biophysical Research Communications 333 (3): 679 - 685, 2005; Errera *et al*, Diabetes Care 30 (2): 275 - 279, 2007; Joussem *et al*, Ophthalmologie 100 (5): 363 - 370, 2003; Sowers y Epstein, Hypertension 26 (6): 869 - 879, 1995; Uhlmann *et al*, Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes 114 (6): 275 - 294, 2006]. Una intensiva búsqueda mediante BLAST de la región completa del SNP rs10434 reveló dos coincidencias; la secuencia tiene homología con los 866 pb del lado 5' (isoforma y precursor del factor de crecimiento endotelial vascular), ubicación: 6p12; y con los 215111

pb del lado 3': la proteína hipotética LOC221416, ubicación: 6p21.1. Los individuos con una predisposición en esta región tienen un aumento en la susceptibilidad a retinopatía diabética, diabetes sacarina, diabetes sacarina no dependiente de insulina, también conocida como diabetes de tipo 2 (NIDDM o T2D), diabetes de aparición en la madurez (MOD) y resistencia a la insulina. La hiperglucemia experimentada por los pacientes diabéticos provoca una función celular vascular anormal, en particular en el endotelio, en las etapas tardías de la enfermedad. Estos individuos experimentan habitualmente una degeneración progresiva de la micro y la macrocirculación, que frecuentemente da lugar a daños en los órganos (Laselva *et al*, Acta Diabetologica 30 (4): 190 - 200, 1993; Ciulla *et al*, Acta Ophthalmologica Scandinavica 80 (5): 468 - 477, 2002). Los estudios han demostrado que la región seleccionada del SNP podría usarse potencialmente como marcador de enfermedades de T2D y relacionadas. Los hallazgos aquí presentados demuestran la validez de la plataforma optimizada de WGM como una herramienta diagnóstica eficaz para evaluar rutinariamente enfermedades humanas conocidas relacionadas con SNP objetivos.

Las partículas de MF oligo-modificadas tienen un diámetro de 7,52 micrones y fueron bioconjugadas directamente con los oligonucleótidos objetivo marcados con TMR modificados en 5' con acrilóilo. Hay una excitación de fluorescencia de la partícula a través de un láser azul de Ar⁺ multi-línea a una potencia de excitación de 350 μW a través de un filtro de barrera λ de 550 nm. El perfilado de la intensidad de la fluorescencia demuestra que la conjugación entre los fragmentos de fragmentos de ADN acrilóilo y los grupos -NH nativos de la superficie de las partículas grupos es robusta (Krajnc y Toplak, Reactive & Functional Polymers 52 (1): 11 - 18, 2002).

20 *Sílice frente a Melamina*

En los estudios previos con microesferas de composite de sílice, todas las mediciones tenían que tomarse en el aire. Esto requería la evaporación del exceso de líquido de reacción para mejorar la emisión de la señal procedente de una partícula individual. La principal meta de esta sección era desarrollar un ensayo de hibridación optimizado de partícula única basado en una solución para el WGM. Se midió sistemáticamente la señal de emisión procedente de una única partícula inmovilizada de MF (nr 1,68) y de sílice en el aire y en el agua. Inicialmente, las respectivas señales de emisión se capturaron en el aire, después se administró una única gota de H₂O Milli-Q (R > 18 M Q cm) en cada placa de inmovilización para sumergir completamente las partículas. Las señales del modo de galería se adquirieron a partir de las esferas reubicadas en el agua y en el aire después de repetir el proceso varias veces. La Figura 11 muestra un resultado típico después de los tratamientos descritos. Para las microesferas de sílice, cada tratamiento con agua dio como resultado la disipación de los picos de la señal de emisión, y la señal capturada se parecía a la de la TMR libre en el medio acuoso [Nuhiji y Mulvaney, 2007 *supra*] (espectros azul y rojo). Sin embargo, después de la evaporación de la Milli-Q, se desarrolló de nuevo el perfil de emisión característico de los WGM Figura 11 A (espectros negro, verde y azul agua). Se produjo un ensanchamiento y una pérdida de los modos junto con una disminución en la intensidad del modo cuando las partículas de melamina se expusieron a la Milli-Q; sin embargo, todavía podían recogerse de forma reproducible varios picos bien definidos (espectros rojo y azul de la Figura 12 B). Como las partículas de MF eran el foco principal de esta investigación, a partir de este punto también se proporcionaron los espectros del momento inicial en los paneles C) y D) de la Figura 11.

40 *Ensayo en placa de micropocillos*

La capacidad de las partículas de MF para soportar un WGM en disolución dio lugar a la siguiente investigación, que era seleccionar un sustrato de hibridación que facilite la adquisición rutinaria de WGM con un Q relativamente alto en disolución. La presentación de las partículas en un formato de placa de microtitulación avanza una etapa más cerca en dirección a un ensayo automatizado de alto rendimiento. El análisis se basaba en la calidad de la señal de los WGM que podría recogerse a partir de las partículas de MF oligo-modificadas que estaban inmovilizadas en un sustrato de microplaca y de placa de ensayo. Las partículas de MF se inmovilizaron en una placa matriz de sílice enrejillada, en una única citoplaca de policarbonato de 384 pocillos, en una placa óptica de 384 y en una placa de cultivo celular de polímero de 96 pocillos. Se recogieron las señales de emisión procedentes de las partículas seleccionadas mientras estaban sumergidas en tampón de hibridación estándar. La Figura 12 ilustra un perfil de emisión representativo obtenido mediante el uso de cada sustrato seleccionado. Debido al pequeño ancho de trabajo del sustrato, se esperaba que la matriz de sílice enrejillada produjera unos altos resultados en la señal procedente de una partícula seleccionada de MF (Figura 12 A). Sin embargo, para un formato de alto rendimiento, un sistema basado en pocillos era la dirección deseada. El primer análisis con el sistema de microplaca se llevó a cabo en una placa de cultivo celular basada en plástico común de 96 pocillos (Figura 12 B). La señal de emisión recogida indica un perfil de WGM que consiste en varios picos amplios de baja intensidad. Esto era debido simplemente al largo ancho de la base de cada pocillo y al hecho de que el plástico tiene unas propiedades de dispersión elevadas. También, el uso de un objetivo con una potencia de amplificación menor (x 40) para permitir una mayor distancia de trabajo, redujo la señal global. Sin embargo, la transferencia del material permitió una fácil visualización y ubicación de las partículas. El uso de lentes con unas distancias de trabajo mayores está gobernado por una compensación, ya que un aumento en la distancia de trabajo está asociado directamente con un aumento en la pérdida de señal. A continuación se analizó una placa de base de poliestireno / polímero de 384 pocillos CC3-marca registrada que simula Poli-D-Lisina mediante el uso de un recubrimiento estéril no biológico. El recubrimiento está cargado positivamente y promueve la adhesión de células poco adhesivas, y en nuestro caso ayudaría en la inmovilización de las partículas de MF recubiertas con oligo/ADN cargadas negativamente de 7,52 micrones. Cada pocillo tenía un volumen de trabajo total menor (placa basada en polímero: ancho de la base 100 μm; área del

pocillo 0,05 cm² / pocillo, con un volumen total de trabajo de 120 µl / pocillo). También, la geometría y la transparencia visible del pocillo de fondo redondo permitió un fácil acceso y manipulación de la placa mediante el uso de la etapa de trabajo del microscopio en orientación X/Y. La Figura 12 C muestra un ejemplo de una señal de emisión típica de una partícula de MF. Se presenta una serie de picos fluorescentes de alta intensidad estrechos identificables. También se empleó una placa óptica de 384 con el mismo tamaño y volumen de trabajo que la placa de polímero. Sin embargo, el ancho de la base era menor (50 µm) y la base del pocillo no contenía una carga positiva. Se aprecian nueve picos de emisión distintos en el perfil de WGM, según se indica en las Figuras 13 A y C. El espectro de la partícula adquirido a través de la placa de calidad óptica de 384 pocillos indicaba que la intensidad de cada modo identificable había mejorado (Figura 12 D) en comparación con los espectros de los paneles A - C. El efecto de doblete en cada $\lambda_{m\acute{a}x}$ apreciado en los resultados del WGM presentado en la Figura 4 es simplemente un efecto de la adquisición de la señal de WGM en disolución.

Efectos del calentamiento

Ha quedado establecida por tanto la ventaja de presentar las partículas de MF en un formato de micropocillos en un ensayo de trabajo. Sin embargo, durante una reacción de hibridación de ADN, las microesferas pueden estar expuestas a unas condiciones de reacción extremas > 90 °C. La funcionalización de la partícula con los fragmentos de acrilóil oligonucleótido permanece intacta cuando se hace reaccionar en condiciones suaves (< 37 °C). Sin embargo, todavía no se sabía cómo afectaría el exceso de estrés térmico a la conjugación. Mediante el uso de una placa óptica de micropocillos de 384 pocillos se desarrolló un estudio de calentamiento para determinar la resiliencia del enlace químico a unas temperaturas elevadas. Se inmovilizaron partículas individuales de MF en micropocillos y después se sumergieron en tampón, MES (pH 5,4) o en H₂O Milli-Q (control). Se midió la señal de fotoluminiscencia de referencia (PL) de las partículas seleccionadas y la placa se calentó a la temperatura habitual del ensayo de hibridación (90 °C). La temperatura se mantuvo durante tres horas, tiempo durante el cual las partículas seleccionadas fueron reubicadas y se recogió regularmente la señal de emisión. La Figura 14 presenta los espectros normalizados de los WGM adquiridos a partir de las partículas seleccionadas después de 3 horas exposición al calor. Durante el periodo de 3 h, el mayor efecto se apreció en la partícula sumergida en MES (línea discontinua negra) que mostró una pérdida significativa de la señal de PL en comparación con las partículas sumergidas en tampón de hibridación (línea continua negra). La señal más potente después del tratamiento térmico se observó en la partícula de control, que se mantuvo únicamente en Milli-Q (línea continua gris). El nivel de la señal de emisión efectivamente varió entre las muestras. Sin embargo, todavía pudo obtenerse un claro perfil de WGM con varios picos identificables a partir de cada partícula después de 3 h de calentamiento.

Los experimentos de caracterización llevados a cabo demuestran que las partículas descritas en este Ejemplo pueden soportar los WGM en disolución. Después se empleó un microscopio de fase termocontrolado Linkam PE100-NI para investigar las perturbaciones de la señal de WGM "en tiempo real" en un ensayo de hibridación en micropocillos basado en disolución. Se desarrolló un ensayo mediante la utilización de la configuración de etapas para determinar si podrían detectarse cíclicamente los cambios térmicos en el medio local que rodea a una microesfera por encima o por debajo de la T_m de una sonda complementaria hibridada. Las sondas objetivo construidas de 30 b marcadas como α - rs10434 A (T_m 71,2 °C) eran complementarias de los fragmentos unidos a las partículas de MF. Se cicló una única partícula objetivo 7,52 µm de MF-rs10434 a través de un gradiente en dos etapas (37 °C - 72 °C). Se completó una reacción de hibridación inicial después de la adición de 5 µl de Milli-Q. Los espectros adquiridos a un tiempo de integración de 2 s en cada gradiente de temperatura a lo largo de diversos ciclos no indicaron un movimiento coherente de los picos de WGM Figura 15 A - B. Mediante el uso de la misma partícula se repitieron las condiciones experimentales con la adición del ADN de la sonda objetivo (5 µl de una solución madre 2 µM). Después de un ciclo de hibridación inicial, los datos de la señal de emisión adquiridos demostraron que la exposición a un fragmento α - rs10434 A en disolución a 72 °C dio como resultado un desplazamiento hacia el azul de los principales picos de los WGM, y una disminución en la temperatura de la etapa hasta 37 °C desplazó hacia el rojo los mismos picos (Figura 15 C). Un ciclo de hibridación repetido dio como resultado unos desplazamientos hacia el rojo coherentemente observados en los picos de los WGM cuando la temperatura de la placa local era menor que la T_m de la sonda objetivo y se desplazaron hacia el azul cuando la temperatura aumentó hasta más de la T_m de la sonda objetivo Figura 15 D - E.

Ensayo con un objetivo de genoma humano

Mediante el uso del gADN de control adquirido a partir de tres individuos de control (individuos sanos) se amplificaron fragmentos de ADN de aproximadamente 20 bases mediante el uso de cebadores que abarcaban la región del SNP rs10434. Los genotipos de los individuos anteriores se determinaron mediante el uso de la plataforma de genotipado Sequenom MassARRAY. Cada individuo tenía un genotipo diferente. El Individuo 1 era homocigótico para el alelo A (A/A), el individuo 2 era heterocigótico (A/G) y el individuo 3 era homocigótico para el alelo G (G/G) en este *locus*. El objetivo era determinar si podría ser detectada una diferencia en un único par de bases a partir de las muestras amplificadas mediante una PCR mediante el uso del sistema de WGM. Se inmovilizó una única partícula rs10434-MF específica para el alelo A de la variante de ADN rs10434 en el pocillo de una microplaca; después la partícula fue expuesta a los 3 diferentes analitos en unas reacciones de hibridación por separado. Cada hibridación se completó a 90 °C durante 5 min después de la adición de 2 µl de la muestra de ADN (Individuo 1 - 3). Se recogieron las señales de emisión después de cada reacción de hibridación respectivamente,

después de que el gradiente de temperatura de la reacción hubiera disminuido hasta la temperatura ambiente. Se determinaron las firmas de los WGM adquiridos después de cada tratamiento con respecto a la señal de referencia (espectro negro). Se analizaron las posiciones de los picos con respecto al perfil de WGM no tratado y se anotó el $\Delta\lambda$. Los espectros obtenidos mostraron las posiciones de los picos de las longitudes de onda en función del desplazamiento del pico alrededor de la longitud de onda dada. Se produjo un desplazamiento hacia el rojo positivo de todos los modos de galería fluorescentes principales después de la exposición a la muestra del Individuo 1 (cuadrados negros). Después, la misma partícula se trató con la muestra de ADN del Individuo 2. La señal de WGM adquirida después de la exposición indicaba un desplazamiento hacia el rojo de todos los picos fluorescentes (en comparación con la señal no tratada). Sin embargo, con respecto a las posiciones de los picos de las longitudes de onda después del tratamiento con la muestra del Individuo 1, el tratamiento con la muestra del individuo heterocigótico 2 provocó un desplazamiento hacia el azul de los modos fluorescentes. El tratamiento final con el ADN del Individuo 3 (triángulos verdes) dio como resultado después otro desplazamiento hacia el azul de los WGM con respecto a la firma del modo adquirida después del tratamiento con el ADN purificado del Individuo 1. Estos desplazamientos hacia el azul tan pequeños son el resultado de la introducción de sondas de ADN mal apareadas de los Individuos 2 y 3. Estas sondas no se unen específicamente, y como resultado disminuyó el número de sitios de unión disponibles para el ADN apareado del Individuo 1.

Discriminación del objetivo

Para confirmar que las microesferas modificadas podían discriminar de forma rutinaria un mal apareamiento de bases en un ensayo de trabajo, se construyeron dos sondas de ADN objetivo sintetizadas en el laboratorio con un grupo amino interno libre para la unión de la molécula de colorante. El primer objetivo (α -rs10434 A) se diseñó para mimetizar la variante alélica [A] rs10434, los fragmentos se marcaron fluorescentemente con TMR. El analito alternativo contenía un único mal apareamiento de base y fue identificado con Bodipy 630/650. Las partículas individuales de MF con el rs10434 objetivo sin marcar se inmovilizaron en tres micropocillos de una placa óptica de 384. Antes de la exposición de la sonda objetivo, se recogió una línea de base de la señal de emisión en disolución (tampón) a partir de las partículas seleccionadas. Se completaron dos ensayos individuales con las sondas objetivo α -rs10434 A y α -rs10434 B en ciclos de hibridación individuales. Los resultados muestran una hibridación de la sonda objetivo α -rs10434 A. La adquisición de una aguda señal de emisión fluorescente de WGM se verificó con un escaneo de la intensidad de fluorescencia de la imagen tomada de la misma partícula, que muestra una partícula fluorescente esférica. Se adquirió una débil señal de fluorescencia de WGM a partir de la partícula expuesta a α -rs10434 B que contenía el mal apareamiento individual, sin embargo, un escaneo de la intensidad de fluorescencia de la imagen no mostró ninguna fluorescencia detectable. La exposición de una única partícula a ambas sondas objetivo dio como resultado un desplazamiento hacia el azul de la mayoría de los picos fluorescentes del modo de galería posteriores al tratamiento con el α -rs10434 B, si la partícula se había expuesto inicialmente a fragmentos objetivo del α -rs10434 A.

Los estudios con una partícula individual en un volumen de dilución sucesivo también demostraron que estas partículas poliméricas oligo-funcionalizadas pueden detectar niveles de attomoles de un ADN analito. Dichos volúmenes de detección destacan el uso eficaz de pequeños volúmenes de reacción para completar un ensayo de hibridación completo de partícula única. Adicionalmente, esto demuestra que las partículas pueden detectar de forma rutinaria concentraciones sub-picomolares de ADN de una sonda objetivo.

Análisis

Los estudios aquí presentados demuestran claramente que puede ser detectada en disolución la unión no covalente de hebras complementarias de ADN a las microesferas de MF modificadas con un oligonucleótido. Los desplazamientos en la longitud de onda de los modos de galería fluorescentes pueden ser empleados para la detección de forma rutinaria de la adsorción y la desorción de fragmentos de ADN complementarios no marcados en diversas condiciones de reacción.

La superficie nativa de las partículas de MF facilita la conjugación de una densa monocapa de fragmentos de oligonucleótido modificado con acrilóilo. La conjugación es esencialmente la unión covalente de una molécula de melamina con un ácido acrílico. Las partículas modificadas con un oligonucleótido son muy resilientes cuando son expuestas a soluciones con un elevado pH a unas temperaturas elevadas (90 °C), ya que pueden recogerse señales de WGM de alta calidad a partir de las partículas tras una exposición prolongada. Los datos demuestran que los anticuerpos α -IgM humanos marcados con FITC también pueden unirse efectivamente a las partículas de MF no modificadas. Estas partículas pueden utilizarse por lo tanto en ensayos de unión de anticuerpo-antígeno.

El ADN tiene un índice de refracción mayor en la conformación monocatenaria (desnaturalizado) (Parthasarathy *et al*, Applied Physics Letters 87 (11): 113901 - 3, 2005). En su forma nativa, el índice de refracción del ADN es similar al de los polímeros orgánicos típicos (Samoc *et al*, Chemical Physics Letters 431 (1 - 3): 132 - 134, 2006). El ADN bicatenario existe de forma natural como un material dieléctrico, y como alternativa en la forma desnaturalizada, puede transformarse en un semiconductor con un hueco de banda de unos pocos cientos de milielectronvoltios (Rakitin *et al*, Physical Review Letters 86 (16): 3670, 2001). Por lo tanto, los desplazamientos en los WGM descritos en este Ejemplo (post-hibridación) están gobernados por una disminución o un aumento en el índice de refracción

relativo en la superficie de la microesfera, en asociación directa con un aumento en el diámetro de las microesferas (Niu y Saraf, *Smart Materials and Structures* 11 (5): 778 - 782, 2002). Todavía debe elucidarse cómo estos parámetros influyen específicamente en los WGM, sin embargo, por el contrario, los desplazamientos característicos son reproducibles de forma rutinaria mediante el uso de ambas partículas de composite.

5 Estos estudios de partícula única demuestran que durante un ensayo de hibridación pueden usarse los desplazamientos de $\Delta\lambda$ en una señal de WGM adquirida a partir de partículas rs10434 modificadas para discriminar un único cambio de base en una sonda de ADN sintetizada en el laboratorio. Cuando las partículas se presentan en un formato de microplaca, se confirman los coherentes desplazamientos de los picos en un sistema automatizado
10 mediante el uso de un gADN amplificado mediante una PCR que contiene la región en la que se espera el único cambio de nucleótido de interés. Las partículas de MF del rs10434-objetivo descritas en este Ejemplo pueden discriminar entre varios alelos del SNP relacionado con la diabetes rs10434 ($\cong 100$ b). La posición del fluoróforo en la primera base del nucleótido de los oligonucleótidos unidos por acrilóilo (aproximadamente a 5 - 10 nm de la superficie del coloide), facilita la reflexión interna total rutinaria de la luz excitada en medios aéreos y acuosos.

15 La capacidad de excitar los WGM en disolución en un formato de ensayo de micropocillos evita completamente los problemas encontrados con el sistema descrito en los Ejemplos 5 y 6. Un sistema que utiliza un formato de micropocillos disminuye el tiempo de análisis para completar un ensayo, ya que las partículas son localizadas rápidamente y no se requieren etapas de lavado. Finalmente, este formato permite la realización de un ensayo
20 completo con la misma partícula de forma rutinaria en disolución, y también proporciona un sistema organizado para la reutilización de los sensores en ensayos adicionales.

Adicionalmente, el sistema descrito en el actual Ejemplo no utiliza métodos de acoplamiento de fibra óptica para excitar un WGM, que simplifica drásticamente el ensayo. Pueden detectarse de forma rutinaria volúmenes de
25 attomoles de la solución de la sonda del ADN objetivo. Los desplazamientos en los WGM reversibles cíclicamente observados en las microesferas de MF indican de forma importante que las partículas pueden ser recicladas. Se demostró que los desplazamientos de los picos de WGM eran reversibles cuando la temperatura local oscilaba por encima y por debajo de la T_m de la sonda objetivo; por lo tanto, los desplazamientos espectrales hacia el rojo son debidos específicamente a la hibridación del ADN complementario. La capacidad de unión de una sonda objetivo
30 disminuye significativamente cuando un fragmento de ADN tiene un único mal apareamiento de base. La unión no específica, aunque pueda ser despreciable, puede provocar pequeños desplazamientos hacia el azul en el espectro de WGM de una partícula si se expone inicialmente la misma partícula a un objetivo complementario. En una reacción de hibridación de partícula única en un pocillo individual, el espectro de emisión de WGM comparado indica de la sonda objetivo específica tiene una afinidad de unión bastante mayor, por oposición a un fragmento que
35 contiene un único mal apareamiento de base.

Estos hallazgos demuestran que las partículas de melamina de elevado índice de refracción modificadas con fragmentos de oligonucleótidos marcados (30 bases) emiten de forma rutinaria WGM en disolución. Cuando la
40 partícula se excita en disolución, la señal de excitación disminuye en intensidad de fotoluminiscencia, y los modos fluorescentes se amplían. Sin embargo, aún pueden identificarse de forma rutinaria una serie de picos de resonancia de WGM bien definidos.

EJEMPLO 8

45 *Condiciones óptimas para la excitación del modo de galería de murmullos en microesferas individuales de sílice fluorescentes y de melamina modificadas con un oligonucleótido*

Este Ejemplo informa sobre el desarrollo de una serie de parámetros optimizados para excitar de forma rutinaria los modos de galería de murmullos (WGM) de alta calidad en los coloides fluorescentes. A lo largo del mismo se utilizan
50 las microesferas objetivo específicas de sílice y de melamina modificadas con un oligonucleótido (TSOM) (7,50 – 7,52 μm) [Microparticles Germany GmbH] presentadas en los Ejemplos 5 a 7.

Sección experimental

55 *Materiales*

Los materiales y los métodos empleados para la síntesis de las partículas, las estrategias de inmovilización y la caracterización de los WGM son según se han descrito en los Ejemplos 5 a 7.

60 Investigación del parámetro de excitación del modo de galería de murmullos

Efectos de la posición de acoplamiento

Mediante el uso de la configuración confocal se diseñó una técnica espectroscópica resuelta en ángulo para
65 caracterizar la emisión de los WGM como resultado de una alteración en la posición de excitación del láser. Se prepararon matrices de cubreobjetos de vidrio con partículas de sílice TSOM y de MF como se describió

previamente (Ejemplos 5 a 7). El sistema confocal empleado se utilizó para alterar la posición de excitación alrededor de la circunferencia de la partícula mediante el uso de la imagen de transmisión de las partículas adquirida como referencia. A una potencia de radiación de 350 μ W, las partículas seleccionadas se excitaron mediante un láser de Ar+ multi-línea. Los espectros de emisión se recogieron a un tiempo de integración de 2 s. Para todo el trabajo confocal del presente documento se usó un láser de Ar+ para la excitación de la partícula. La posición de excitación se alteró en incrementos de 45° a lo largo de una rotación de 360° alrededor de los bordes periféricos de las microesferas con respecto a la coordenada 0° (referencia). Cuando se excita el WGM de una partícula en la configuración confocal normalmente se utiliza la posición de excitación de 0°, esto da como resultado la adquisición rutinaria de WGM de alta calidad. Sin embargo, la excitación en las posiciones seleccionadas a lo largo de 360° también da como resultado la recolección de unos fuertes espectros de WGM. El análisis del conjunto de espectros en el ejemplo seleccionado demuestra que no se observan desplazamientos de pico detectables para las posiciones de excitación seleccionadas (dentro de la resolución espectral del espectrómetro Triax 550 de \pm 0,05 nm). En algunos casos puede producirse la distorsión de un pico. La distorsión se observó coherentemente en cada espectro de WGM adquirido a una longitud de onda dada.

Después se escaneó una partícula seleccionada de MF en el aire en las mismas condiciones. El análisis del conjunto de espectros de WGM demuestra que con respecto al espectro a 0°, se observan unos desplazamientos en los picos detectables (la resolución espectral del CCD es de \pm 0,05 nm. Se observan desplazamientos hacia el azul en el ejemplo seleccionado, sin embargo es improbable que el índice de refracción de las partículas haya cambiado para provocar los desplazamientos observados. Estos efectos podían ser debidos al movimiento de la posición de excitación, pero más probablemente son el resultado de alcanzar el límite umbral del CCD. La reflexión total interna de la luz a través de una partícula de TSOM-MF inmovilizada en disolución se mostró en el Ejemplo 7. Después se excitó una única partícula de MF sumergida en la solución, a las posiciones radiales seleccionadas. Todos los picos fluorescentes del intervalo de escaneo (con respecto a los 0° de escaneo) se desplazaron coherentemente hacia el rojo. Los resultados indican que el desplazamiento del pico con respecto a los 0° de escaneo era significativamente mayor en comparación con los resultados en el aire. El aumento en la variación del pico se atribuye probablemente a las elevadas propiedades de dispersión de la luz del agua. Se apreció que la variación en la posición del pico era la mayor en las posiciones de 180°, de 270° y de 315° (hasta 0,89 nm). Estos resultados sugieren que debería utilizarse una posición de excitación fija para la excitación de los WGM en las partículas de TSOM.

Estudio de excitación repetido

La investigación de seguimiento implicaba un análisis de los efectos provocados por la excitación repetida de una partícula de TSOM a lo largo de una única posición, y como resultado se observa el deterioro relativo de la señal de WGM. Durante un ensayo de hibridación de partícula única se utiliza un único punto de excitación (0°) para todos los espectros de WGM. La importancia del uso de una posición de excitación fija ya se ha demostrado. Importantly, esto mejoraría las variaciones de pico.

De forma rutinaria, se excita (escanea) una única microesfera de TSOM aproximadamente 2 – 5 veces durante un ensayo de trabajo. Es importante que la señal de WGM de las microesferas permanezca estable durante este tiempo para que puedan adquirirse un conjunto de espectros de WGM después de varios tratamientos. Por lo tanto, el propósito de este experimento era la determinación de los niveles de deterioro en la señal de fluorescencia asociados con las partículas de TSOM descritas en esta tesis.

Estudio del deterioro de los WGM en el aire

Las partículas se inmovilizaron en matrices de cubreobjetos de vidrio, después se montaron los sustratos en un microscopio confocal. Las microesferas de sílice y de MF seleccionadas se excitaron en el aire a lo largo de la posición de excitación de 0° (tiempo de integración de 2 s). El conjunto de espectros se adquirió a un tiempo de integración de 2 s a partir de la microesfera de sílice seleccionada. La fotointensidad (PI) de los WGM disminuyó significativamente en la intensidad de fluorescencia después de la serie de escáneres. Se identificaron diez picos distintos en el Escaneo 1, y 9 - 10 picos en el Escaneo 20.

Después se expuso una única partícula de TSOM MF a los mismos parámetros experimentales. El número de picos identificados a lo largo de los escáneres desde 1 hasta 20 permaneció coherente (aproximadamente 16). El factor Q disminuyó en un factor de siete, y la variación en la posición el pico es despreciable.

Estudio del deterioro de los WGM en el agua

La siguiente etapa fue excitar de forma repetida una única partícula de TSOM MF en disolución (H₂O Milli-Q). Se aplicó el láser a una única partícula en la posición 0° y se capturó un conjunto de espectros a un tiempo de integración de 2 s. El número de picos identificados disminuyó en el intervalo de escaneo seleccionado (ocho) en comparación con las mediciones en el aire. Sin embargo, el número de picos permaneció invariable después de haber completado los escaneos (escaneos 1 - 20). Se observa una disminución de seis veces en el factor Q entre los escaneos 1 y 20, respectivamente.

Los espectros a escala recogidos a partir de los escaneos finales de los WGM consistían en entre 8 – 16 picos identificables. Estos resultados demuestran que puede recogerse forma rutinaria un perfil de WGM (> 20) a partir de la misma partícula después de la aplicación repetida del láser (potencia de radiación de 350 μ W) a lo largo de un punto de excitación fijo (0°). Adicionalmente, el ensanchamiento de los picos debido a la fotodegradación del marcador de colorante de TMR y a la inmovilización de la partícula en agua, no dan como resultado ninguna variación significativa del pico. Como resultado se destacan las resilientes propiedades de las partículas en un ensayo de trabajo.

Resolución del CCD

Como se ha demostrado en el anterior Ejemplo, la sensibilidad de un espectrómetro tiene un papel importante en las mediciones de WGM durante un ensayo de trabajo. El espectrómetro determina la cantidad de información espectral que se puede adquirir a partir de una partícula excitada y el límite de sensibilidad de la plataforma de detección de WGM. En este Ejemplo se comparan las configuraciones del microscopio y la sensibilidad de los detectores de CCD.

En primer lugar se excitó una partícula de sílice (posición 0°) en el aire, los espectros se recogieron con un espectrómetro Triax 550 (resolución espectral de $\pm 0,05$ nm) a un tiempo de integración de 2 s. Después se adquirió un espectro de la misma partícula mediante una lámpara de mercurio (potencia de excitación de salida de 35,52 mW). Se utiliza un sistema QE6500 Ocean Optics (resolución espectral de $\pm 0,9$ nm) a un tiempo de integración de 2 s para adquirir un espectro. Se observa un claro ensanchamiento de los diversos picos principales en el espectro adquirido con el espectrómetro QE6500. Adicionalmente, los espectros adquiridos mediante el Triax 550 indican que no están presentes diversos picos ($\lambda_{m\acute{a}x}$: 577,54 nm, 588,47 nm, 594,35 nm y 599,95 nm) en el espectro del QE6500. Se calcula que la que la variación en la FWHM ($\lambda_{m\acute{a}x}$ PI = 1,00) es de 0,38 nm (Triax) y de 0,98 nm (QE6500), respectivamente. Se tomaron las mismas mediciones en el aire con una única partícula de TSOM MF. El espectro adquirido mediante el Triax 550 indica que se produce la pérdida de varios picos cuando se utiliza el QE6500 para la adquisición de los WGM ($\lambda_{m\acute{a}x}$: 578,81 nm, 584,65 nm, 588,07 nm, 597,73 nm y 608,08 nm). Los valores de la FWHM del Triax (0,72 nm) y del QE6500 (1,27 nm) indican adicionalmente la diferencia en la calidad espectral.

A continuación se excitó fluorescentemente una única partícula de MF inmovilizada en disolución y se capturó su espectro. Los resultados indican que el espectro tomado en agua no mostraba ninguna pérdida de picos de emisión después de cada respectivo escaneo. El Triax que capturó el espectro de emisión indica una FWHM de 0,81 nm ($\lambda_{m\acute{a}x}$ en la que la PI = 1,00) y de 1,15 nm a partir del espectro del QE6500. El grado de ensanchamiento del pico era comparativamente menor que cuando se midió para las partículas de MF y de sílice en el aire.

Estos conjuntos de datos muestran unos WGM de alta calidad, pudiéndose adquirir un mayor número de picos espectrales cuando se utiliza un CCD de alta potencia. Los perfiles adquiridos de WGM también contienen más información espectral. Sin embargo, la variabilidad entre estos espectrómetros está significativamente mejorada (aproximadamente 0,24 nm) cuando las mediciones se realizan en disolución.

El desplazamiento del pico de WGM entre los espectrómetros es debido simplemente a la diferente sensibilidad de los espectrómetros. Por ejemplo, la resolución espectral del instrumento define la precisión con la que puede medirse la posición del pico como una $\lambda_{m\acute{a}x}$ "verdadera". Por lo tanto, el sistema Ocean Optics ($\pm 0,9$ nm) es menos preciso con respecto a la $\lambda_{m\acute{a}x}$ "verdadera" para cada pico observado de WGM en comparación con el sistema TRIAX ($\pm 0,05$ nm). Por lo tanto, basándonos en estas condiciones se espera que se produzca una variabilidad entre las curvas de respuesta de los WGM.

Tiempos de decoloración

Se determinó el umbral de decoloración de las microesferas mientras estaban en excitación constante a lo largo de una posición de acoplamiento fija. Los perfiles de decoloración se midieron mediante el uso de la configuración de caracterización confocal. Se les aplicó el láser a partículas individuales en el aire a una onda continua de 488 nm (Ar+) mediante el uso de una energía de salida de 350 μ W a lo largo del punto de excitación de 0° . Todos los perfiles de decoloración se midieron en la parte trasera de un objetivo 100X (NA = 1,4) y se visualizaron. Se observó el índice de decoloración en función del tiempo (s) [200 s]. Se recogieron los perfiles de blanqueamiento de la fluorescencia de las partículas seleccionadas para 100 partículas a partir de las partículas de sílice (n = 100) y de MF (n = 100) TSOM. Los perfiles de decoloración se promediaron a partir de cada conjunto de escáneres. Se aplicó un ajuste triexponencial a los datos promediados. La curva del tiempo de decoloración promedio para las partículas de sílice indica que el 60 % de la fluorescencia se disipa en 0,23 s durante una agitación constante. Un 31 % adicional de la señal de fluorescencia de las partículas se decolora a continuación después de 2,51 s. Finalmente, el restante 9 % de la fluorescencia de las partículas se decolora después de 26,40 s. Para la muestra de sílice dada, la mayoría de la fluorescencia de las partículas se disipa después de aproximadamente 3,30 s. Comparativamente, se demuestra que las partículas de TSOM-MF son más robustas. Los datos indican que el 50 % de la señal de fluorescencia de las partículas se degrada después de 31,10 s. Mediante el uso del mismo modelo de ajuste triexponencial, el mayor porcentaje de la señal de fluorescencia se fotodegrada después de 6,28 s, lo que es una mejora significativa en comparación con las partículas TSOM de sílice.

Se utilizó una potencia de láser considerablemente más alta para la excitación de la partícula (350 μ W). Sin embargo, el resultado indica que todavía podía observarse una señal de fluorescencia después de 26,40 s (sílice) y de 31,10 s (MF) durante la excitación constante. Por lo tanto, estos tiempos de decoloración pueden mejorarse simplemente disminuyendo la energía de excitación.

Análisis

Se demostró que la variación espectral asociada con la precisión de la resolución espectrofotométrica mejoraba significativamente mediante la utilización de las partículas de MF TSOM que soportan los WGM en disolución. Este resultado demuestra adicionalmente que puede emplearse un CCD de menor fuerza en un ensayo en disolución basado en WGM sin que se produzca la pérdida de una importante información espectral. El menor tiempo de decoloración de la fluorescencia de las partículas de MF fortaleció adicionalmente el papel de las partículas poliméricas en una plataforma de WGM.

El desarrollo anterógrado de una unidad de diagnóstico de alto rendimiento de WGM basada en microfluidos debería utilizar microesferas homogéneas con un elevado índice de refracción. Una unidad de escaneo automatizada debería presentar las partículas en disolución en un formato de micropocillos. La unidad también debería incorporar un sistema de excitación por láser similar a los encontrados en los citómetros de flujo y en los microscopios de barrido de láser confocal. Las partículas deben ser excitadas a lo largo de una posición fija para minimizar la variabilidad de la señal. La fijación de la posición de excitación para presentar alternativamente las partículas en una posición fija aliviará la necesidad de emplear caras lentes de objetivo y programas informáticos de visualización de alta precisión.

EJEMPLO 9

Comparación de los WGM mediante el uso de partículas de sílice y de melamina formaldehído

Las Figuras 17 (A) y (B) muestran una comparación del perfil de WGM obtenido mediante el uso de partículas de sílice (B) y de partículas de melamina formaldehído (A). Las líneas continuas de (A) y (B) eran los perfiles obtenidos en el aire, y las líneas discontinuas representan los perfiles cuando las partículas estaban en un medio acuoso.

La adquisición en agua mediante el uso de las microesferas de sílice produjo una fluorescencia muy débil pero ningún WGM (Figura 16 (B)). Cuando se usó melamina formaldehído, se obtuvo un fuerte perfil de WGM.

EJEMPLO 10

Inmuno-WGM

Un ensayo basado en inmuno-WGM proporciona un entorno para una plataforma diagnóstica. Los datos demuestran que puede utilizarse una señal fluorescente de WGM titulada a partir de una partícula de MF modificada con un anticuerpo (α -IgM humana) para discriminar entre un reactivo de control y un antígeno objetivo (Figura 17) en una reacción a la temperatura ambiente. El ensayo de inmuno-WGM proporciona un formato de reconocimiento alternativo con una especificidad ajustable a una plétora de objetivos biomoleculares tales como proteínas, anticuerpos, patógenos animales y vegetales, bacterias, interleucinas, péptidos, ARN, ARNm y priones. El ensayo de inmuno-WGM tiene un potencial en aplicaciones en la industria de la higiene alimentaria, en ensayos de aguas medioambientales, en la industria agrícola, militares (guerra bacteriológica), virológicos, en diagnósticos de microbiología y en el cribado farmacológico.

Los expertos en la materia apreciarán que la invención descrita en el presente documento es susceptible de variaciones y modificaciones distintas a las descritas específicamente. El ámbito de la presente invención está definido por las reivindicaciones anexas a esta descripción.

BIBLIOGRAFÍA

Awata *et al*, Biochemical and Biophysical Research Communications 333 (3): 679 - 685, 2005

Battersby *et al*, Chemical Communications 14: 1435 - 1441, 2002

Ciulla *et al*, Acta Ophthalmologica Scandinavica 80 (5): 468 - 477, 2002

Corrie *et al* Langmuir 22 (6): 2731 - 2737, 2006

Erickson *et al*, Science 249: 527 - 533, 1990

Errera *et al*, Diabetes Care 30 (2): 275 - 279, 2007

- Gao *et al*, *Macromolecular Materials and Engineering* 286 (6): 355 - 361,2001
- 5 Gomez *et al*, *Small* 1 (2): 238 - 241, 2005
- Hermanson, *Bioconjugative Techniques*, Sand Diego: Academic Press Incorporated, 785, 1996
- Hodgson, *Bio/Technology* 9: 19 - 21, 1991
- 10 Johnston *et al*, *Chemical Communications* 7: 848 - 850, 2005
- Joussen *et al*, *Ophthalmologie* 100 (5): 363 - 370, 2003
- Krajnc y Toplak, *Reactive & Functional Polymers* 52 (1): 11 - 18, 2002
- 15 Laselva *et al*, *Acta Diabetologica* 30 (4): 190 - 200, 1993
- Miller *et al*, *Chemical Communications* 38: 4783 - 4785, 2005
- 20 Moller *et al*, *Applied Physics Letters* 83 (13): 2686 - 2688, 2003
- Niu y Saraf, *Smart Materials and Structures* 11 (5): 778 - 782, 2002
- Nuhiji and Mulvaney, *Small* 3 (8): 1408 - 1414, 2007
- 25 Parthasarathy *et al*, *Applied Physics Letters* 87 (11): 113901 - 3, 2005
- Peyrefitte *et al*, *Mechanisms of Development* 104 (1 - 2): 99 - 104, 2001
- 30 Rakitin *et al*, *Physical Review Letters* 86 (16): 3670, 2001
- Rychlik *et al*, *Nucl. Acids Res.* 18 (21): 6409 - 6412, 1990
- Samoc *et al*, *Chemical Physics Letters* 431 (1 - 3): 132 - 134, 2006
- 35 Sharmin *et al*, *progress en Organic Coatings* 50 (1): 47 - 54, 2001
- Sowers y Epstein, *Hypertension* 26 (6): 869 - 879, 1995
- 40 Uhlmann *et al*, *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 114 (6): 275 - 294, 2006
- Verhaegh y Vanblaaderen *Langmuir* 10 (5): 1427 - 1438, 1994
- 45 Wells, *Methods Enzymol.* 202: 2699 - 2705, 1991

LISTADO DE SECUENCIAS

- 50 <110> GENERA BIOSYSTEMS LIMITED THE UNIVERSITY OF MELBOURNE POETTER, Karl (solo EE.UU.) NUHIJI, Edin (solo EE.UU.) MULVANEY, Paul (solo EE.UU.)
- <120> ENSAYO DE DETECCIÓN DE ANALITO
- 55 <130> 30881210/EJH
- <150> AU 2008906057
- <151> 21-11-2008
- 60 <160> 12
- <170> PatentIn versión 3.5
- 65 <210> 1
- <211> 69
- <212> ADN
- <213> artificial

ES 2 545 232 T3

<220>
 <223> *enl*
 5 <400> 1
 . **tatggaatta accctcaçta aaggaggac agctatggac tgcttctaca cagtctctg** 60
tacctgggc 69
 <210> 2
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> artificial
 15 <220>
 <223> *alfa-enl*
 <400> 2
 caggagactg tgtagaagca gtccatagct 30
 20 <210> 3
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> artificial
 25 <220>
 <223> *alfa-enl* de 40 bases
 <400> 3
 gtcctcccct tcaggagact gtgtagaagc agtccatagc t 41
 30 <210> 4
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> artificial
 35 <220>
 <223> *alfa-enl* de 20 bases
 <400> 4
 40 caggagactg tgtagaagca g 21
 <210> 5
 <211> 10
 <212> ADN
 45 <213> artificial
 <220>
 <223> *alfa-enl* de 10 bases
 50 <400> 5
 caggagactg 10
 <210> 6
 <211> 62
 55 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> *Control* (secuencia objetivo aleatoria no específica)
 60 <400> 6

ES 2 545 232 T3

tttaggccta tggacacgtg cggatgattt gcctattccg aatccgcagg atgggcctta 60
ca 62

5 <210> 7
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> artificial

10 <220>
 <223> diana de rs10434 (conjugado partícula) 5'

<400> 7
 ttcgccgga catctgccag tggctctctg 30

15 <210> 8
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> artificial

20 <220>
 <223> alfa-rs10434 A (complementario) 5'

<400> 8
 caggagacca ctggcagatg tcccggcgaa 30

25 <210> 9
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> artificial

30 <220>
 <223> alfa-rs10434 B (desemparejado) 5'

35 <400> 9
 caggagccca ctggcagatg tcccggcgaa 30

40 <210> 10
 <211> 99
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> Región del SNP rs 10434

45 <400> 10
tggaggattc aggagcctgg gcggccttcg cttactotca cctgcttctg agttgccag 60
gagagccact ggcagatgtc cggcgaaga gaagagaca 99

50 <210> 11
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> artificial

55 <220>
 <223> Cebador directo

<400> 11
 acgtggatg atgtgtctct tctcttcgcc 30

60 <210> 12
 <211> 30

<212> ADN
<213> artificial

5 <220>
<223> Cebador inverso

<400> 12
acgttgatg ccttcgctta ctctcacctg 30

REIVINDICACIONES

1. Un método para la detección de un analito de ácido nucleico en una solución acuosa, que comprende las etapas de:
 - (i) anclar una multiplicidad de ligandos de ácidos nucleicos al analito de ácido nucleico a una población de partículas microesferoidales de melamina formaldehído que están marcadas con un fluoróforo o que comprenden un punto cuántico;
 - (ii) poner en contacto las partículas microesferoidales con una muestra de control negativo y determinar un espectro del momento inicial;
 - (iii) poner en contacto las partículas microesferoidales con una muestra que supuestamente comprende el analito de ácido nucleico durante un tiempo y en unas condiciones suficientes para facilitar un acontecimiento de unión entre el analito de ácido nucleico y su respectivo ligando;
 - y
 - (iv) someter las partículas microesferoidales a un medio de detección mediante modos de galería de murmullos (WGM) para la detección de un acontecimiento de unión.
2. El método de la Reivindicación 1 en el que la partícula microesferoidal tiene un índice de refracción mayor de 1,40.
3. El método de la Reivindicación 1 o 2 en el que la solución acuosa es un tampón o un fluido biológico.
4. El método de una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3 en el que el analito de ácido nucleico y/o el ligando de ácido nucleico comprende ADN monocatenario.
5. El método de la Reivindicación 4 en el que el ADN monocatenario se prepara mediante la digestión de un ADN bicatenario con endonucleasas de restricción y/o una exonucleasa.
6. El método de la Reivindicación 5 en el que las endonucleasas de restricción son endonucleasas de restricción de Tipo 1.
7. El método de la Reivindicación 5 en el que la exonucleasa es la exonucleasa Lambda.
8. El método de la Reivindicación 4 en el que el ADN monocatenario se prepara a partir de una molécula híbrida de ARN:ADN.
9. El método de la Reivindicación 8 en el que la molécula híbrida de ARN:ADN comprende un ADN hibridado con un ARN mensajero preparado mediante transcripción inversa.
10. El método de la Reivindicación 9 en el que el ARN es ARN vírico.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en el que el analito o el ligando deriva de una muestra aislada obtenida a partir de una fuente biológica, industrial, de laboratorio o medioambiental.
12. El método de la Reivindicación 11 en el que la muestra comprende material de origen mineral, sintético, eucariota, procariota o vírico.
13. El método de una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 12 en el que las partículas microesferoidales están marcadas con un punto cuántico.
14. Uso de un método que comprende las etapas de: (i) anclar una multiplicidad de ligandos de ácidos nucleicos a analitos de ácidos nucleicos a una población de partículas microesferoidales de melamina formaldehído marcadas con un fluoróforo o marcadas con un punto cuántico en una solución acuosa (ii) poner en contacto las partículas microesferoidales con una muestra de control negativo y determinar un espectro del momento inicial; (iii) poner en contacto las partículas microesferoidales con una muestra que supuestamente comprende el analito durante un tiempo y en unas condiciones suficientes para facilitar un acontecimiento de unión entre el analito y su respectivo ligando; y (iv) someter las partículas microesferoidales a un medio de detección de WGM en la elaboración de un ensayo para la detección de un acontecimiento de unión entre un analito de ácido nucleico y un ligando de ácido nucleico.
15. Un método para la detección de un acontecimiento de unión entre un analito de ácido nucleico y un ligando de ácido nucleico en una solución acuosa, que comprende las etapas de: (i) anclar una multiplicidad de ligandos a una población de partículas microesferoidales de melamina formaldehído marcadas con un fluoróforo o marcadas con un punto cuántico; (ii) poner en contacto las partículas microesferoidales de melamina formaldehído con una muestra de control negativo y determinar un espectro del momento inicial; (iii) poner en contacto las partículas microesferoidales de melamina formaldehído con una muestra que supuestamente comprende el analito durante un

tiempo y en unas condiciones suficientes para facilitar un acontecimiento de unión entre el analito y su respectivo ligando; y (iv) someter las partículas microesferoidales de melamina formaldehído a un medio de detección de WGM para la detección de un acontecimiento de unión.

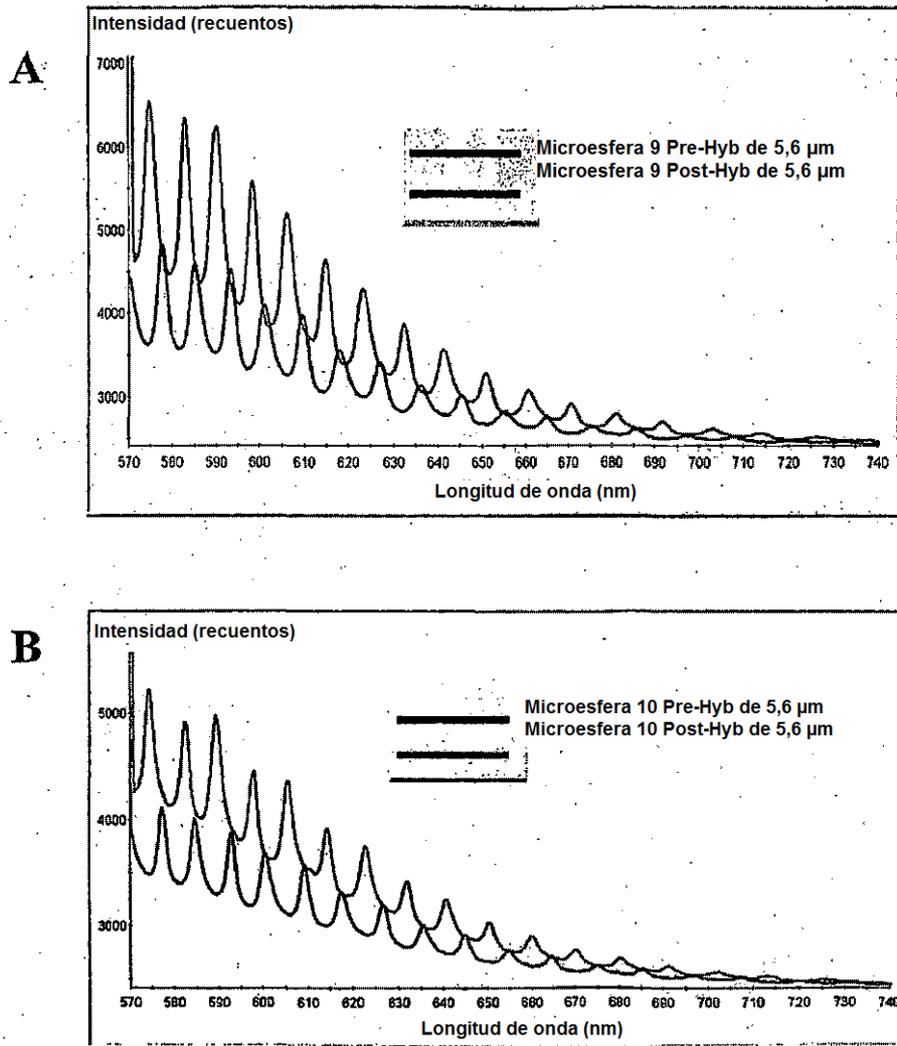


Figura 1

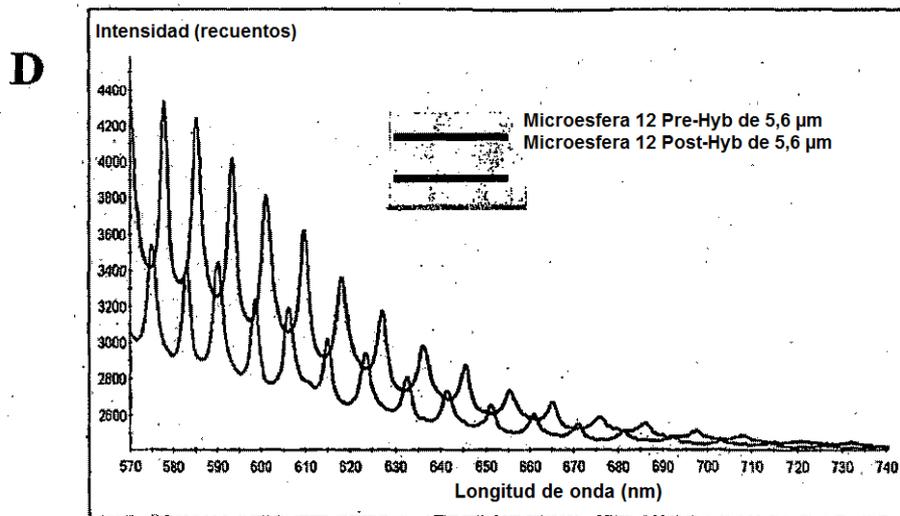
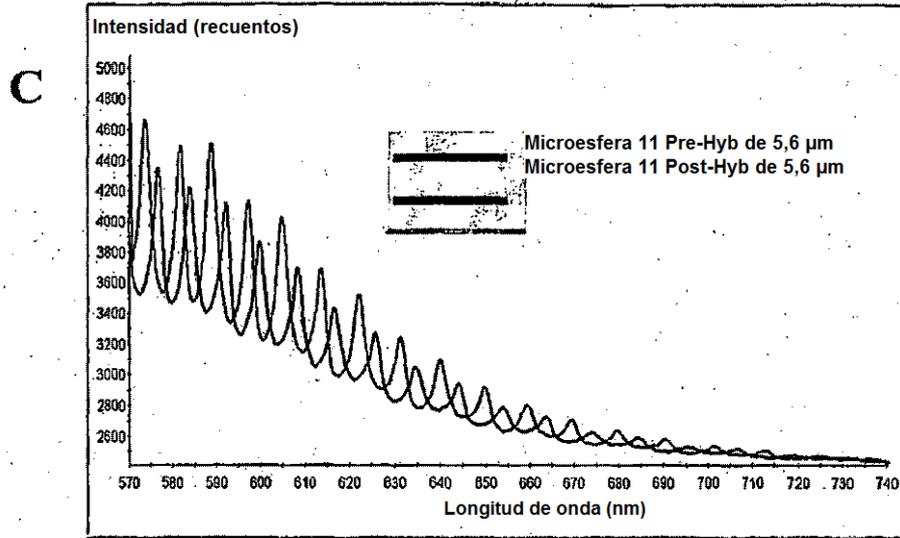


Figura 1 continuación

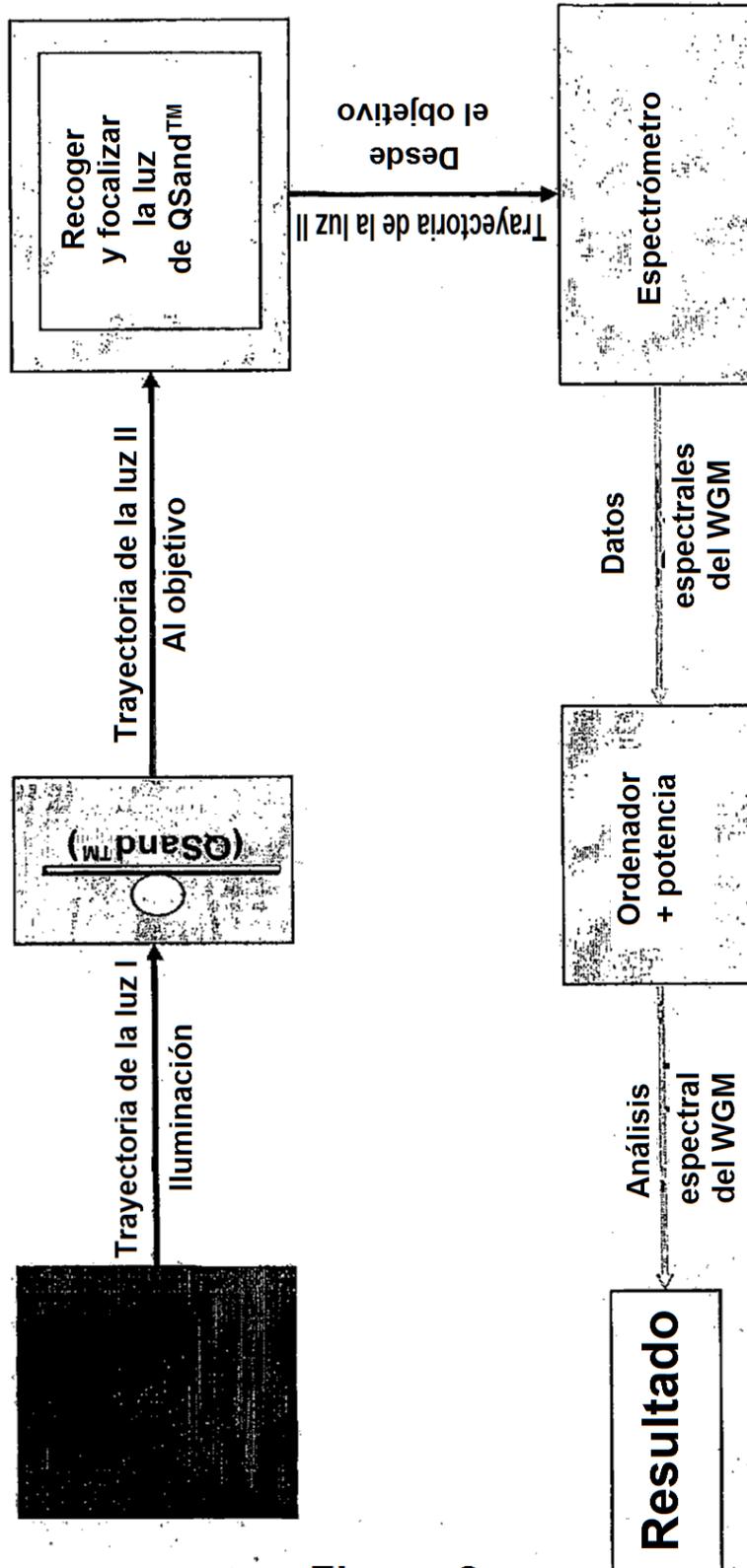


Figura 2

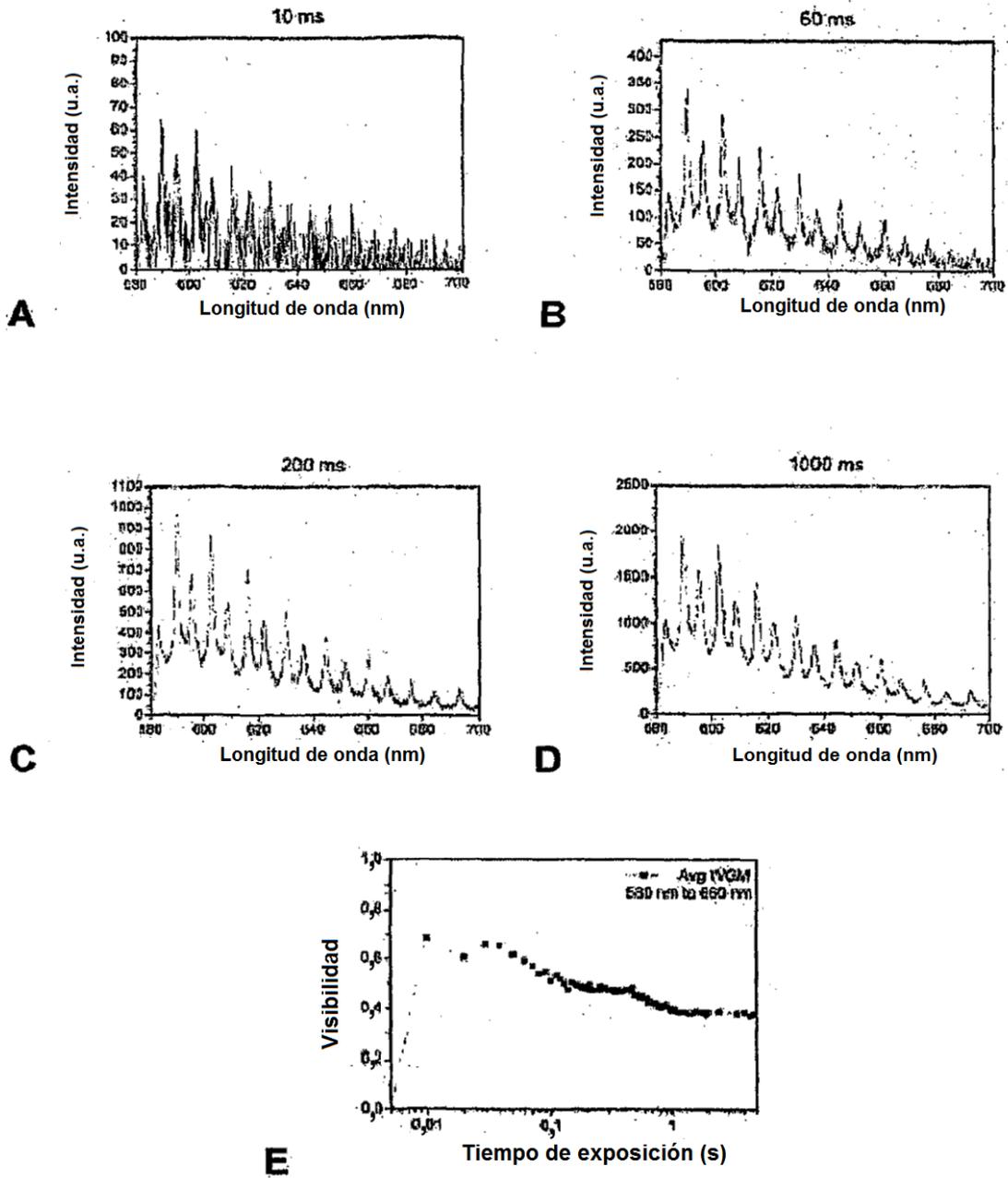


Figura 4

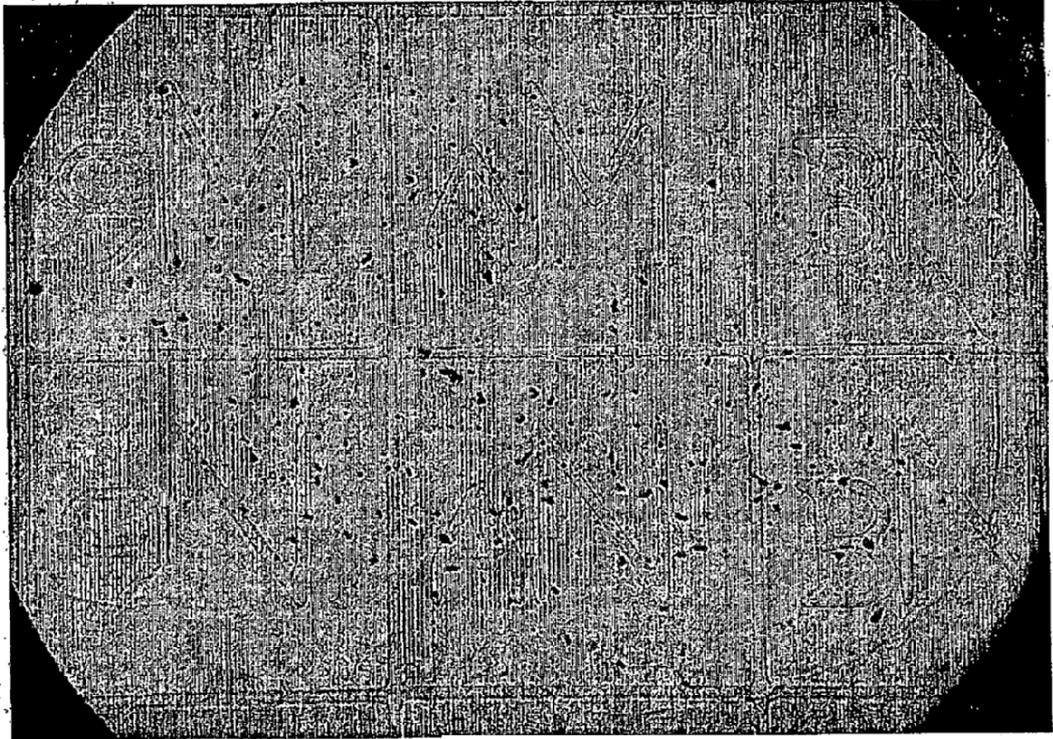
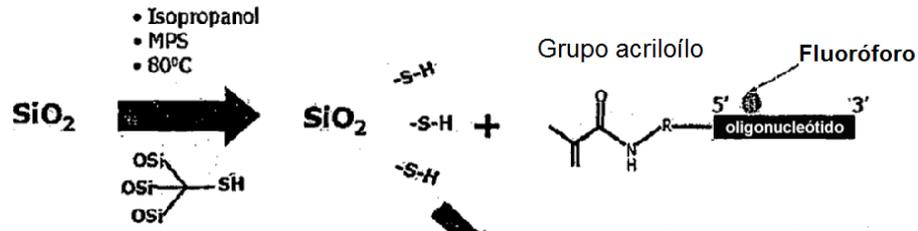


Figura 5

Funcionalización de la partícula



Conjugación

- MES a pH 5,4
- Persulfato de amonio al 10 %
- 37°C

Etapa 1

Funcionalizar las microesferas en bruto de SiO_2 con grupos mercaptano en isopropanol a 80 °C

Etapa 2

Marcar fluorescentemente los oligonucleótidos monocatenarios objetivo en los sitios -NH libres

Etapa 3

Unir los oligonucleótidos objetivo marcados a las microesferas a través de un conector de "acrilóilo" a grupos *mercaptano*

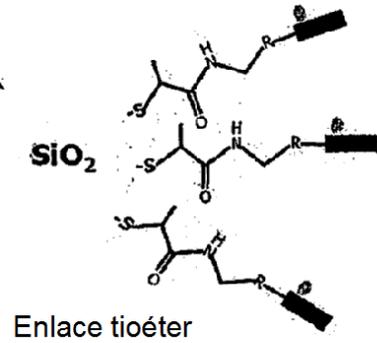


Figura 6

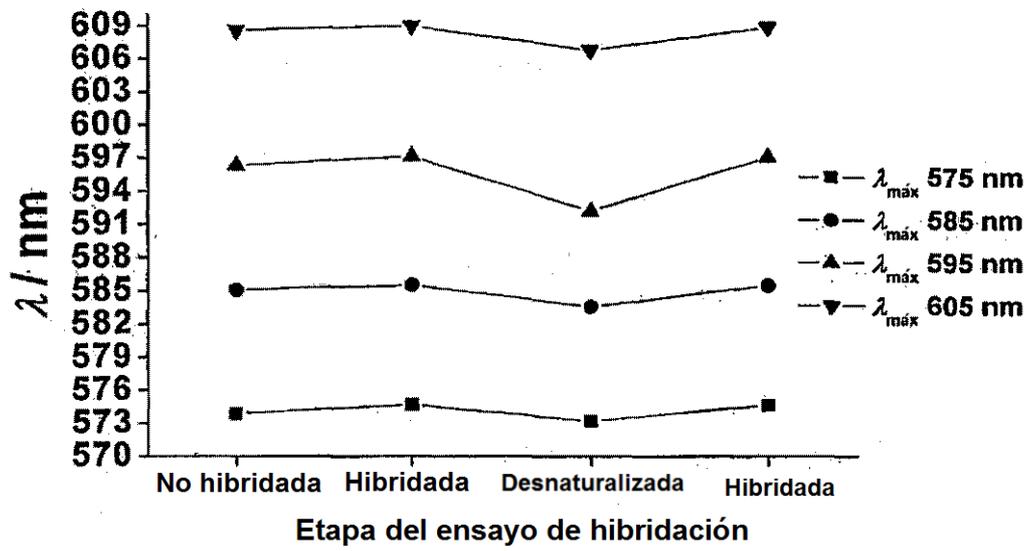
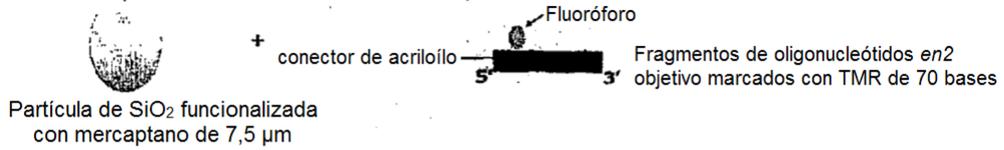
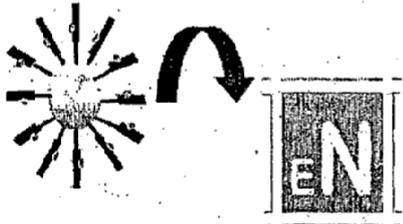


Figura 7

(A) Síntesis de las partículas

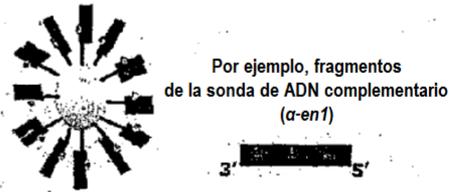


(B) No tratadas (pre-hibridación)



- (i) inmovilizar las partículas en un sustrato de sílice enrejillado
- (ii) adquirir una señal de emisión pre-hibridación de referencia

(C) Tratadas (post-hibridación)



- (i) tratar las partículas inmovilizadas con la sonda de ADN deseada o una solución de control (por ejemplo, milli-Q únicamente)
- (ii) reubicar las partículas y adquirir una señal de emisión post-hibridación

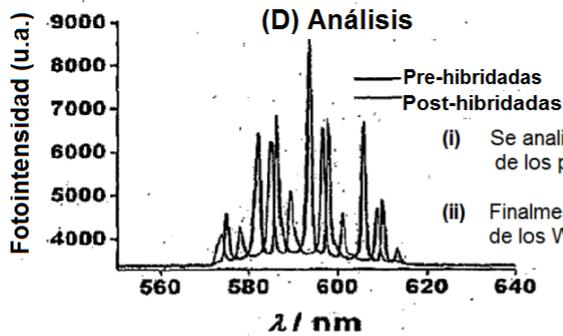


Figura 8

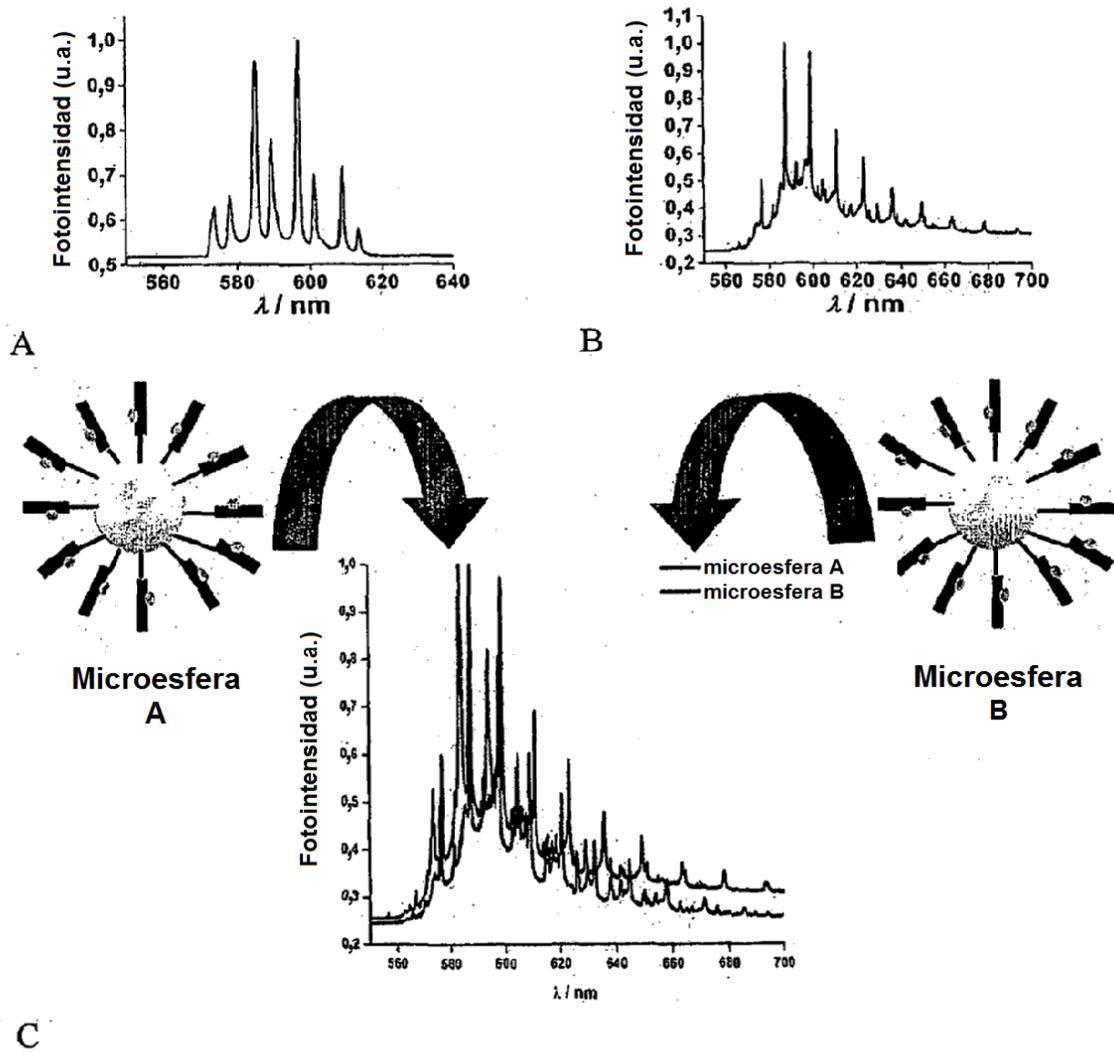


Figura 9

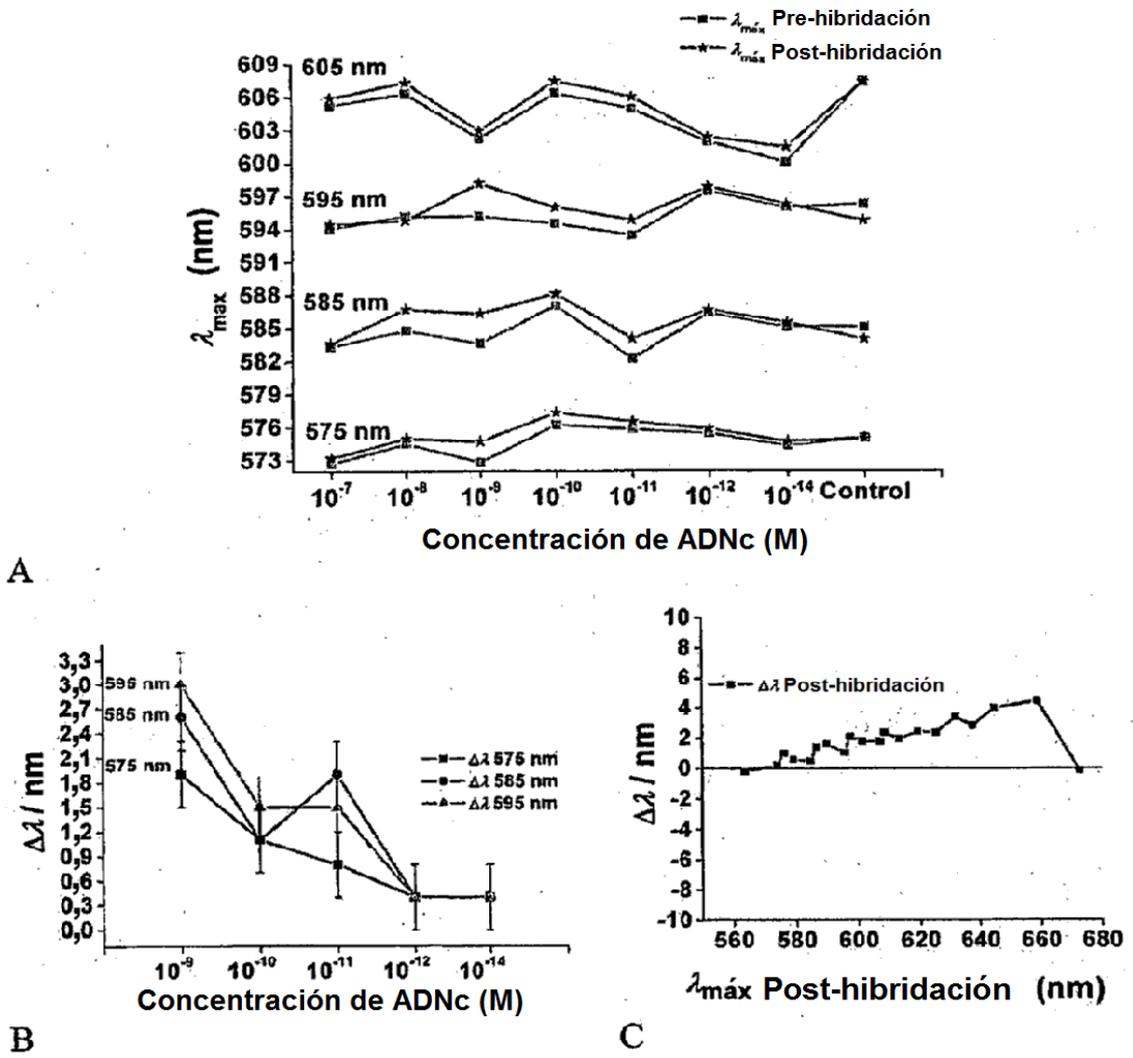
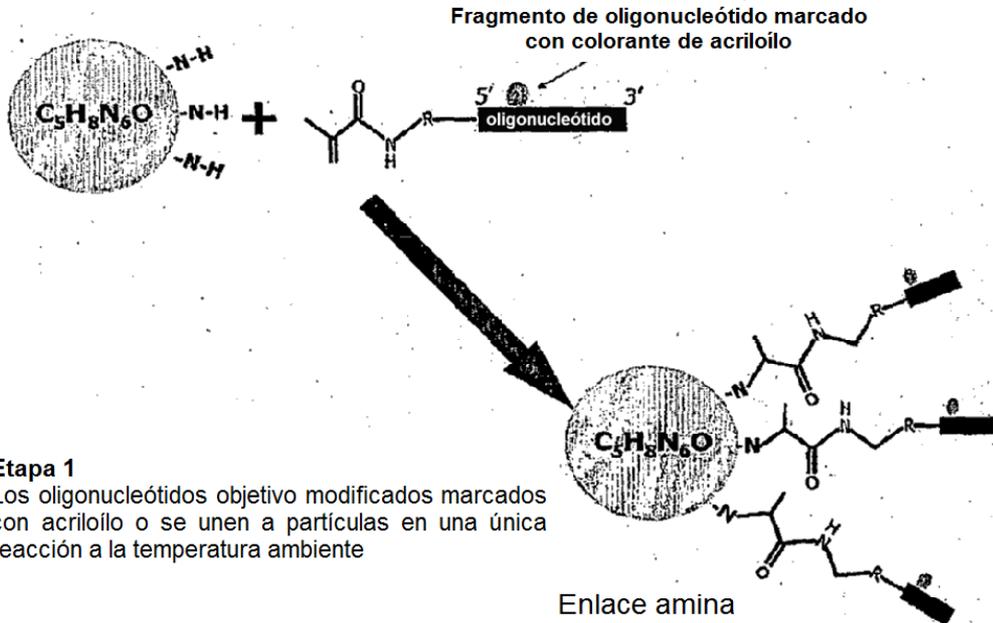


Figura 10

Conjugación

- PBS a pH 7,0
- Temperatura ambiente



Etapa 1

Los oligonucleótidos objetivo modificados marcados con acrililo o se unen a partículas en una única reacción a la temperatura ambiente

Figura 11

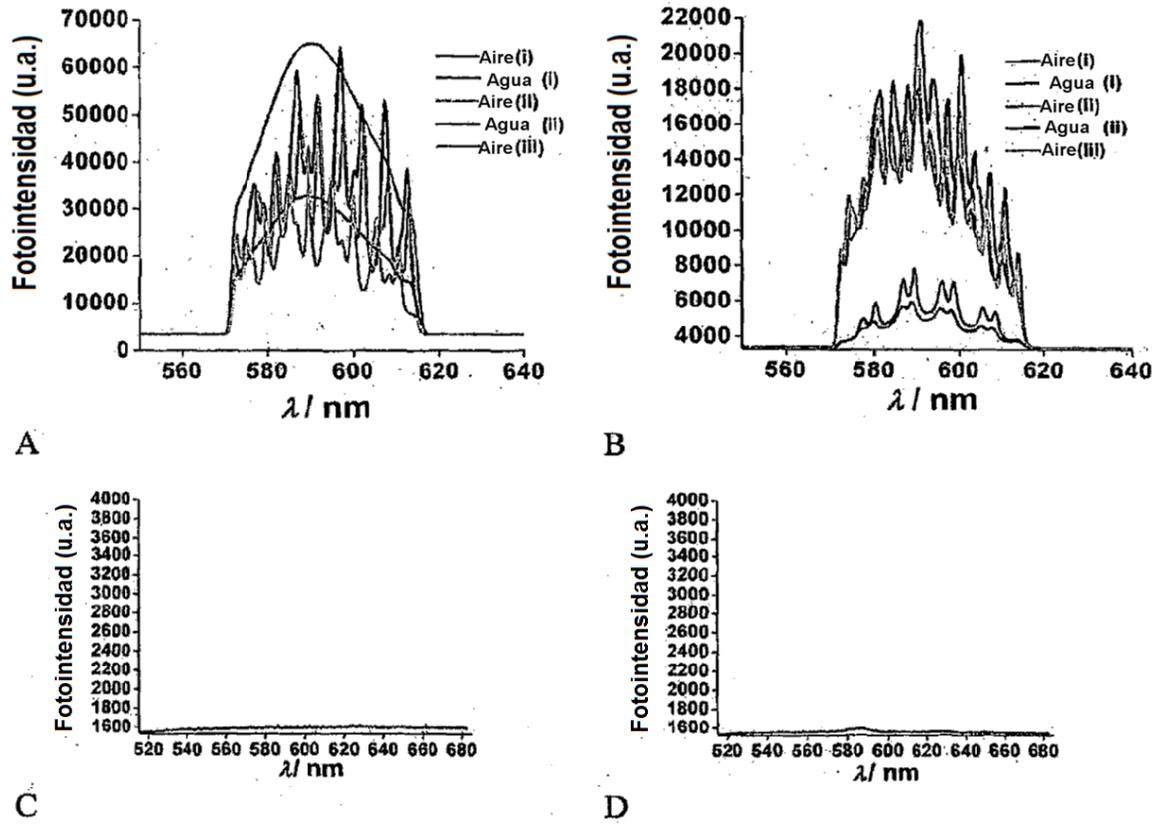


Figura 12

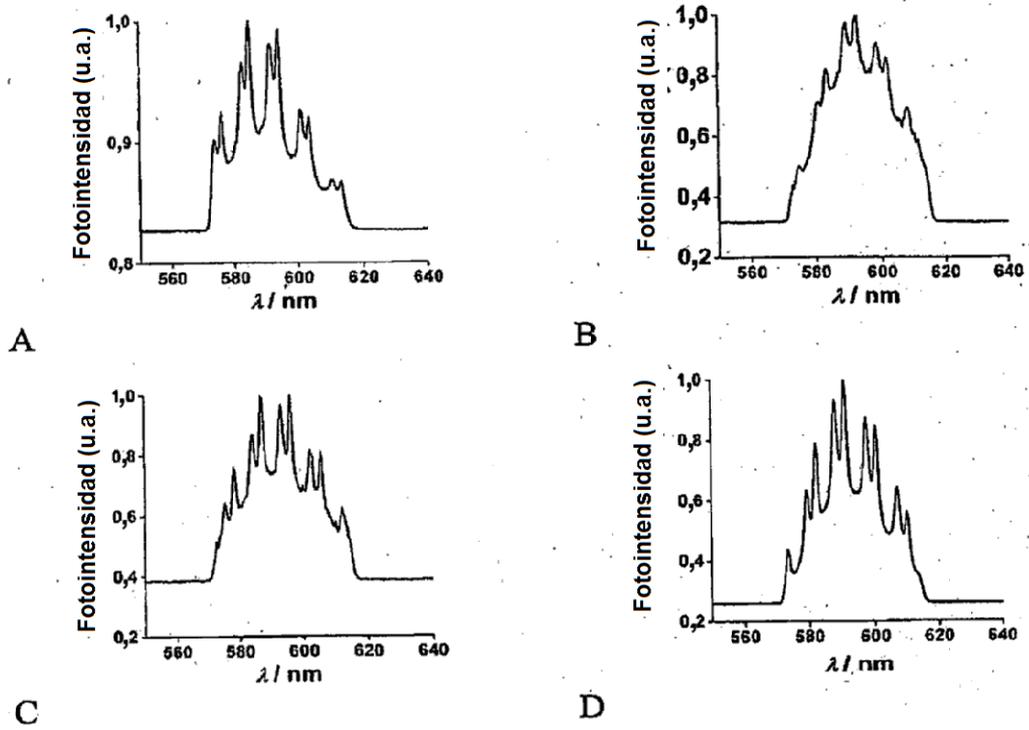


Figura 13

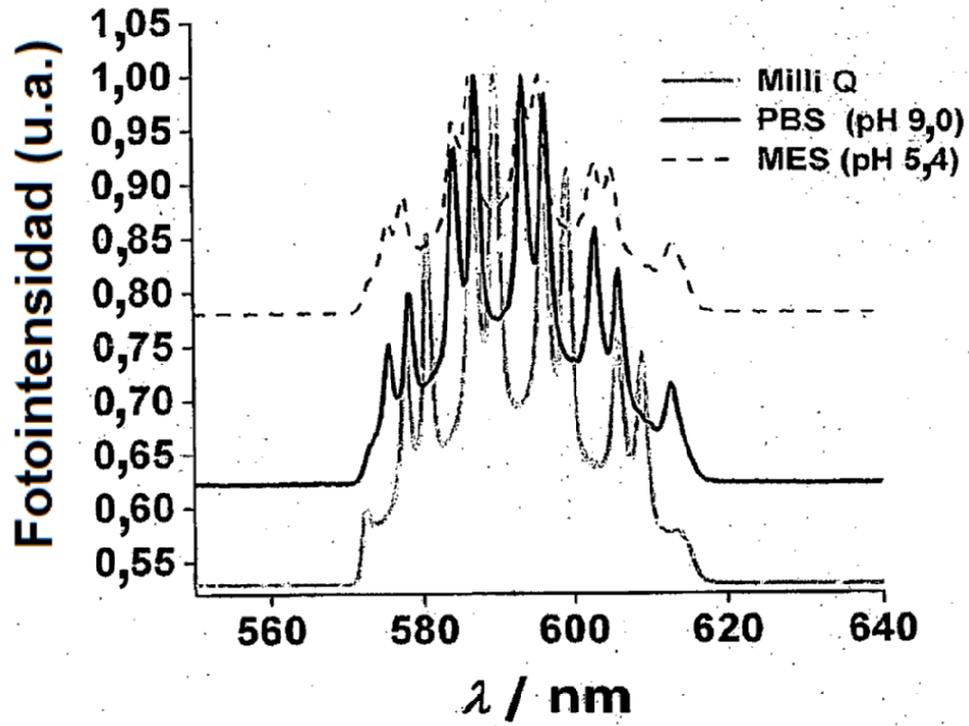


Figura 14

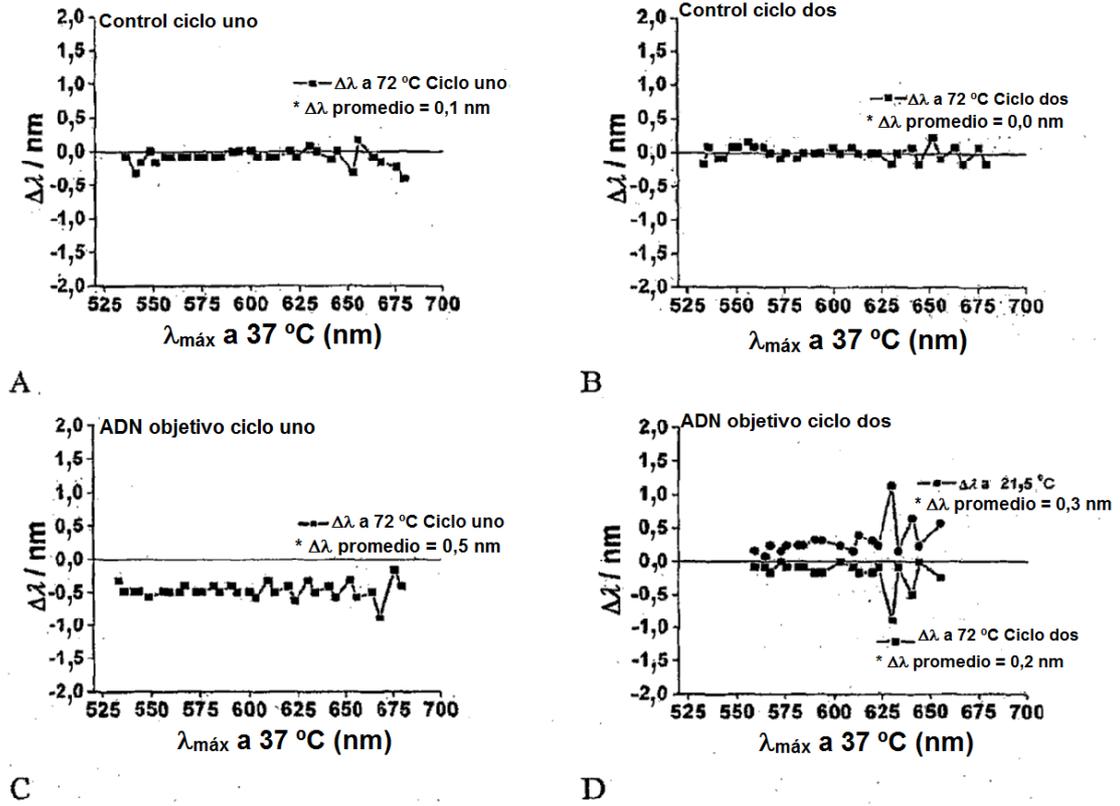


Figura 15

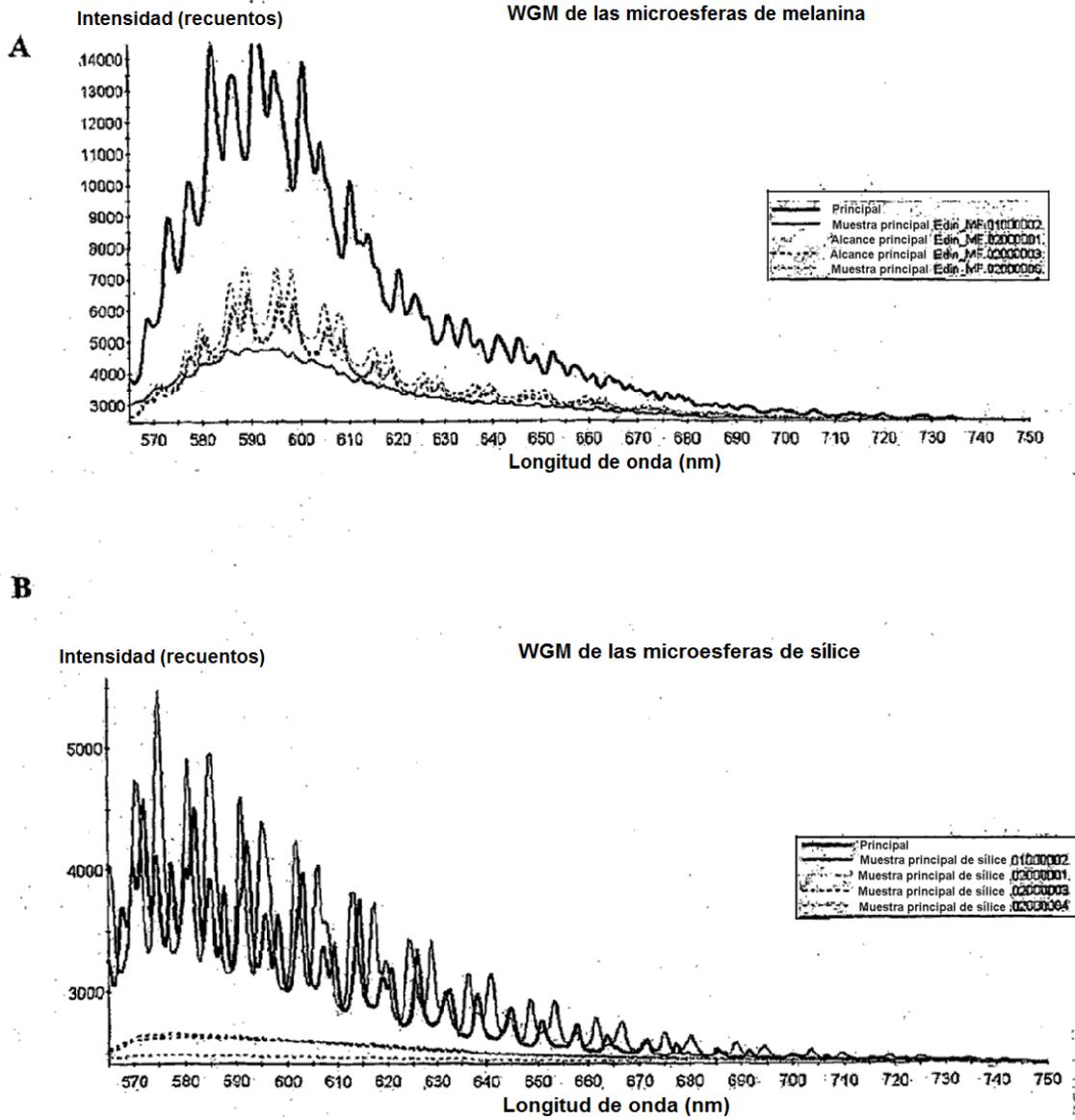


Figura 16

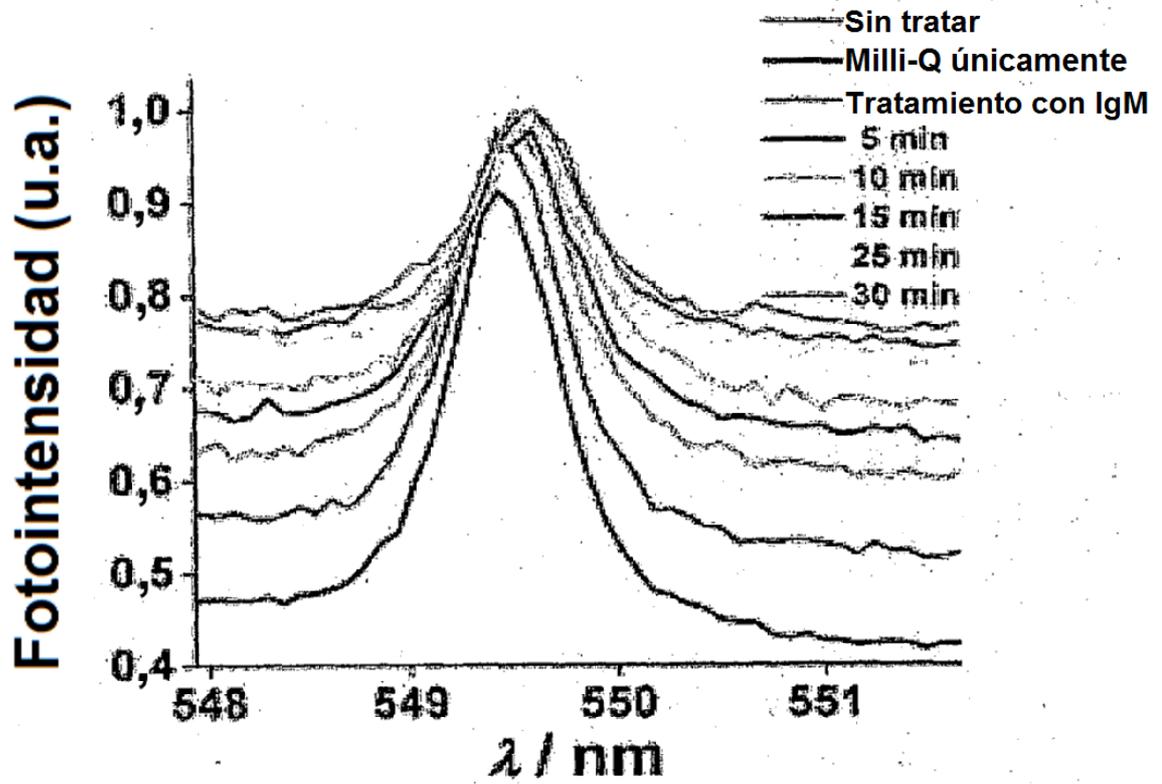


Figura 17