

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 565 844**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/543** (2006.01)

**B01J 19/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2005 E 05858334 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.12.2015 EP 1825249**

54 Título: **Ensayos acelerados con microondas**

30 Prioridad:

**19.11.2004 US 629822 P**

**30.12.2004 US 640290 P**

**10.08.2005 US 707083 P**

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

**07.04.2016**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF MARYLAND BIOTECHNOLOGY  
INSTITUTE (100.0%)  
SUITE 200, 701 EAST PRATT STREET  
BALTIMORE, MD 21202, US**

72 Inventor/es:

**GEDDES, CHRIS D.**

74 Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

**ES 2 565 844 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

Ensayos acelerados con microondas

Antecedentes de la invención

Campo técnico

- 5 La presente invención está dirigida a un método y sistema de detección para aumentar la sensibilidad y rapidez del sistema de detección, y más en particular, aumentar la detección de fluorescencia en sistemas de ensayo de la superficie mientras que aumenta la cinética de una biorreacción en el sistema de detección.

Antecedentes de la técnica relacionada

- 10 Los inmunoensayos se utilizan ampliamente para la detección y determinación de una variedad de proteínas, péptidos y pequeñas moléculas.<sup>1-8</sup> Si bien existe una gran familia diversa de inmunoensayos hoy, los principios básicos son en su mayoría los mismos.<sup>1-8</sup> Estos por lo general utilizan unión antígeno-anticuerpo para el reconocimiento del analito y la mayoría de la lectura basada en la fluorescencia para la transducción de señales. Los inmunoensayos basados en fluorescencia están disponibles en muchas formas, tales como inmunoensayos resueltos en el tiempo,<sup>9-13</sup> inmunoensayos de transferencia de energía<sup>14-16</sup> e inmunoensayos de polarización de fluorescencia.<sup>17, 18</sup> La etapa de reconocimiento de antígeno-anticuerpo es más a menudo muy lento cinéticamente, necesitando largos tiempos de incubación, muy pocos ensayos posteriormente siendo completos menos de 10 minutos.<sup>1-8</sup> Adicionalmente, la sensibilidad de los inmunoensayos basados en fluorescencia se rige principalmente por el rendimiento cuántico del fluoróforo marcado y la eficiencia y sensibilidad del sistema de detección.<sup>1-8</sup> Estas dos limitaciones físicas sustentan tanto la rapidez como la sensibilidad de inmunoensayos actuales.<sup>1-8</sup>

- 15 20 El presente inventor, junto con sus colegas, descubrió que la estrecha proximidad a las islas o coloides de plata metálicos, puede alterar la velocidad de desintegración de radiactividad y/o velocidad de excitación de fluoróforos. Además, se ha demostrado que el rendimiento cuántico de fluoróforos de bajo rendimiento cuántico se puede aumentar por la proximidad a superficies metálicas. La excitación mejorada de fluoróforos en estrecha proximidad a las superficies metálicas incluyendo las nanoestructuras, islas, coloides, superficies porosas y continuas pueden tener numerosas aplicaciones en las aplicaciones bioquímicas y biológicas de la fluorescencia debido a la mayor intensidad de fluorescencia.

- 25 30 La detección de fluorescencia es la base de la mayoría de los ensayos utilizados en el descubrimiento de fármacos y selección de alto rendimiento (HTS) hoy. En todos estos ensayos, la rapidez y la sensibilidad del ensayo es una preocupación primaria. La sensibilidad se determina por ambos el rendimiento cuántico de los fluoróforos y la eficiencia del sistema de detección, mientras que se determina la rapidez por los parámetros físicos y biofísicos de temperatura, concentración, bioafinidad del ensayo etc.

- 35 Sin embargo, los ensayos y el sistema discutidos anteriormente, están limitados por el tiempo de reacción de las reacciones químicas dentro de los ensayos, tales como los que se producen en la unión o la hibridación. Por lo tanto, existe una necesidad de métodos y sistemas de ensayo que aumenten la cinética biológica/bioquímica de la reacción, aumenten la sensibilidad y que puedan ser utilizados para las evaluaciones de las salas tanto de emergencia como clínicas.

Resumen de la invención

En un aspecto, la presente invención se relaciona con un método de detección del ensayo que comprende:

- 40 1) proporcionar un material metálico conductor; en donde el material metálico se forma como una película, partículas, nanoestructuras, isla o coloides;
- 2) introducir al menos una biomolécula para disponer cerca del material metálico conductor, en donde la biomolécula es capaz de emitir luz y ser mejorada por una proximidad predeterminada al material metálico;
- 3) aplicar energía electromagnética en el rango de microondas para hacer un aumento de calor en el material metálico aumentando así, la cinética de reacciones químicas que implican la biomolécula; y
- 45 4) medir la luz emitida desde el sistema.

El método descrito anteriormente se puede utilizar en múltiples sistemas de detección de fluorescencia, incluyendo, pero no limitando a, fluorescencia mejorada por metal acelerada por microondas, (MAMEF) y espectrometría raman de

superficie mejorada acelerada por microondas (MASERS). Adicionalmente, el uso de microondas de baja potencia se puede utilizar en muchos ensayos diferentes, incluyendo, pero no limitando a, inmunoensayos, ensayos de hibridación, ensayos de transferencia de energía de resonancia, ensayos basados en polarización/anisotropía, ensayos basados en quimioluminiscencia, ensayos basados en luminiscencia, ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas.

5 En otro aspecto, la presente invención proporciona un sistema de detección que comprende:

a) un material metálico conductor colocado dentro de un recipiente, en donde el material metálico se forma como una película, partículas, nanoestructuras, isla o coloides;

b) al menos una biomolécula para disponer cerca el material metálico conductor, en donde la biomolécula es capaz de emitir luz y ser mejorada por una proximidad predeterminada al material metálico;

10 c) una fuente de energía electromagnética que emite energía en al menos el rango de microondas para hacer un aumento de calor en el material metálico aumentando así, la cinética de reacciones químicas que implican a la biomolécula; y

d) un dispositivo de medición para medir la luz emitida desde el sistema.

15 En la presente realización, la biomolécula comprende un componente fluorescente que tiene la capacidad de emitir fluorescencia cuando entra en contacto con la radiación en el rango de UV o IR. Preferiblemente, el componente capaz de emitir fluorescencia es una molécula que no interfiere con la reacción química de la biomolécula.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un método de detección de fluorescencia mejorada por el metal, que comprende:

20 a) aplicar un material metálico conductor a una superficie utilizada en un sistema de detección, en donde la superficie incluye vidrio, cuarzo o un material polimérico;

b) introducir una solución que contiene al menos una biomolécula para disponer cerca la superficie metálica conductora, en donde la biomolécula es capaz de emitir fluorescencia;

c) aplicar energía electromagnética en el rango de microondas para hacer un aumento de calor en la solución aumentando así, la cinética de cualquiera de las reacciones químicas que ocurren dentro del sistema de detección;

25 d) excitar la biomolécula con una fuente electromagnética para hacerla capaz de emitir fluorescencia; y

e) medir la emisión de fluorescencia en el sistema.

En incluso otro aspecto, la presente invención proporciona un método para detectar un patógeno diana en una muestra, comprendiendo el método:

a) proporcionar un sistema que comprende:

30 1) un material metálico inmovilizado colocado sobre un sustrato de superficie, en donde el material metálico inmovilizado tiene unido a este una sonda de secuencia de ADN de captura inmovilizada complementaria a una secuencia de ADN conocida del patógeno diana; y

2) una sonda de secuencia de ADN de captura libre complementaria a una secuencia de ADN conocida del patógeno diana, en donde la sonda de secuencia de ADN de captura libre tiene unido a esta un fluoróforo;

35 b) poner en contacto la muestra con la sonda de secuencia de ADN de captura inmovilizada, en donde la secuencia de ADN del patógeno diana se une a la sonda de secuencia de ADN de captura inmovilizada;

40 c) poner en contacto la secuencia de ADN unida del patógeno diana con la sonda de secuencia de ADN de captura libre, en donde la unión de la sonda de secuencia de ADN de captura libre con la secuencia de ADN del patógeno diana hace que el fluoróforo sea colocado a una distancia suficiente del material metálico inmovilizado para mejorar la emisión de fluorescencia;

d) irradiar el sistema con energía de microondas en una cantidad suficiente para mejorar la unión de la sonda de secuencia de ADN de captura libre con la secuencia de ADN del patógeno diana causando un aumento en la velocidad de las reacciones; y

e) irradiar el sistema con energía electromagnética en un rango de UV a IR para aumentar la emisión de fluorescencia por el fluoróforo colocado a una distancia predeterminada del material metálico.

Preferiblemente, la energía de microondas es suficiente para transferir energía al material metálico causando con ello un aumento de calor en el mismo.

5 Preferiblemente, el material metálico conductor toma la forma de partículas metálicas, nanoestructuras, islas, coloides, matriz porosa o una superficie metálica continua. El elemento metálico puede incluir cualquier forma de metales nobles, tales como plata, oro, platino y cobre, y más preferiblemente, el material metálico es plata, tal como plata de baja densidad.

10 La biomolécula que es capaz de emitir fluorescencia y/o tras la excitación por energía electromagnética emite luz incluye, pero no se limita a fluoróforos, cromóforos, o luminóforos. El compuesto capaz de emitir fluorescencia puede ser un fluoróforo intrínseco o un compuesto unido a un fluoróforo extrínseco.

En un aspecto adicional, la presente invención se relaciona con un ensayo utilizando selección de alto rendimiento (HTS), comprendiendo el método:

a) proporcionar una placa de pozos utilizada en los sistemas HTS que comprende una multiplicidad de pozos;

15 b) introducir nanoestructuras metálicas en los pozos,

c) introducir al menos una biomolécula para disponer cerca las nanoestructuras metálicas, en donde la biomolécula es capaz de emitir luz y ser mejorada por una proximidad predeterminada a las nanoestructuras metálicas;

d) aplicar energía electromagnética en el rango de microondas para hacer un aumento de calor en el material metálico aumentando así, la cinética de reacciones químicas que implican la biomolécula; y

20 e) medir la luz emitida desde el sistema.

Un aspecto adicional de la presente invención, se relaciona con un kit para detectar una molécula diana en una muestra, comprendiendo el kit

25 a) un recipiente que comprende una capa de partículas de metal inmovilizados depositados sobre un sustrato fabricado de un material polimérico o de cuarzo, en donde una sonda inmovilizada está conectado a las partículas de metal y en donde la sonda inmovilizada tiene una afinidad por la molécula diana;

b) un fluoróforo que tiene una afinidad por la molécula diana, en donde la unión de la molécula diana con ambos la sonda inmovilizada y el fluoróforo hace que el fluoróforo sea colocado a una distancia suficiente de las partículas de metal inmovilizadas para mejorar la emisión de fluorescencia; y

c) una fuente de energía de microondas.

30 Otros aspectos y ventajas de la invención serán más evidentes a partir de la descripción subsiguiente y las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra el espectro de absorción plasmón de la película isla de plata (SiF) antes y después de la exposición a microondas de baja potencia.

35 La figura 2 muestra las imágenes de AFM de películas isla de plata (SiF) antes y después de 30 segundos de exposición a microondas de baja potencia.

40 La figura 3 muestra los componentes del sistema de modelo de proteína-fluoróforo utilizado para demostrar la fluorescencia mejorada por el metal acelerada de microondas (MAMEF). Tanto las superficies de vidrio como con baño de plata están igualmente recubiertas con BSA biotilada que crea una capa de separación para la fluorescencia mejorada por el metal. La avidina marcada con fluoresceína (FITC-avidina) se une rápidamente a la superficie con un tiempo de reacción a temperatura ambiente de aproximadamente 30 minutos.

45 La figura 4 muestra la emisión de fluoresceína mejorada de la superficie con baño de plata en comparación con la superficie de vidrio (muestra de control) después de 30 minutos de incubación (Parte superior). Las muestras se lavaron después de la incubación. (Parte inferior) - espectros de emisión normalizados que muestran que las propiedades de emisión espectral se conservan en ambos sustratos de vidrio y con baño de plata.

- 5 La figura 5 muestra la emisión de fluoresceína mejorada sobre la superficie con baño de plata en comparación con el vidrio después de 20 segundos del calentamiento con microondas de baja potencia (parte superior). La muestra se lavó después de 20 segundos de microondas para eliminar el material no unido. Una intensidad de fluorescencia de emisión de la fluoresceína final similar se puede observar tanto para una incubación de 30 minutos (Figura 4 - parte superior) en comparación con 20 segundos del calentamiento con microondas. (Parte inferior) espectros de emisión normalizados que muestran que las propiedades espectrales se mantienen.
- 10 La figura 6 muestra los espectros de emisión de fluoresceína-avidina en ambas superficies con baño de plata y de vidrio después de 30 segundos de incubación, sin calentamiento con microondas. Los beneficios de fluorescencia mejorada por el metal acelerada con microondas se pueden ver comparando las figuras 4, 5 y 6.
- 15 La figura 7 muestra fotografías que ilustran los beneficios de fluorescencia mejorada por el metal acelerada de microondas (MAMEF). De manera significativa, mayor intensidad de emisión de fluorescencia de fluoresceína se puede ver en la superficie con baño de plata que se ha calentado con microondas.
- La figura 8 muestra que la intensidad decae para FITC-avidina tanto en vidrio como en SiF, tanto antes como después de la exposición a calentamiento con microondas de baja potencia. La intensidad decae en las SiF son casi idénticas (SiF – películas isla de plata).
- La figura 9 muestra la intensidad de emisión de fluoresceína de ambos sustratos con baño de plata y vidrio como una función del calentamiento de microondas de baja potencia acumulado. El fluoróforo es imperturbable por las microondas.
- 20 La figura 10 muestra la velocidad de los experimentos de control de absorción no específica de fluoresceína-avidina a las superficies desnudas después de 30 minutos de incubación (Parte superior) y después de 30 segundos del calentamiento con microondas de baja potencia (Parte inferior). Ambas superficies de vidrio y con baño de plata no se recubrieron con BSA biotinilada. Ambos gráficos muestran que los grados de absorción no específicos son de hecho muy bajos, y que el calentamiento con microondas de baja potencia no aumenta el grado de absorción no específica.
- 25 La figura 11 muestra los resultados de experimentos de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia para confirmar que las microondas de baja potencia no desnaturalizan las proteínas. (Parte superior) - avidina marcada (donante) con fluoresceína antes y después del calentamiento con microondas de baja potencia, (Parte media) - avidina marcada (aceptor) con Alexa 532 antes y después del calentamiento con microondas de baja potencia, (Parte inferior) - avidina marcada donante-aceptor (relación D/A = 10) antes y después del calentamiento con microondas de baja potencia. El grado de transferencia de energía no cambia después del calentamiento, lo que sugiere que las proteínas no se desnaturalizan.
- 30 La figura 12 muestra los resultados de otros experimentos de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia para confirmar que las proteínas no se desnaturalizan por microondas de baja potencia. (Parte superior) - Avidina marcada (donante) con fluoresceína antes y después del calentamiento con microondas de baja potencia, (Parte media) - avidina marcada (aceptor) con Alexa 532 antes y después del calentamiento con microondas de baja potencia, (Parte inferior) - avidina marcada donante-aceptor (relación D/A = 1) antes y después del calentamiento con microondas de baja potencia.
- 35 La figura 13 muestra los espectros de absorción de azul de timol como una función de la temperatura (Parte superior), y el gráfico radiométrico posterior de las bandas de absorción 600 y 425 nm como una función de la temperatura (Parte inferior).
- 40 La figura 14 muestra los espectros de absorción como una función de la temperatura para 30  $\mu$ L de azul de timol en el soporte de muestra de cuerpo negro (Parte superior) y la respectiva absorbancia, gráfico temperatura Vs tiempo radiométrico (Parte inferior).
- La figura 15 muestra los portaobjetos de cristal de TOC.
- 45 La figura 16 muestra un inmunoensayo modelo de fluorescencia mejorada por metal. Una superficie con baño de plata caracteriza anticuerpos inmovilizados para un analito particular. Tras la formación del inmunoensayo de tipo sándwich, el fluoróforo de bajo rendimiento cuántico se pone en estrecha proximidad a la superficie (dentro de la región de mejora de 10 nm), el sistema se convierte en altamente luminiscente y facilita la detectabilidad analito.
- La figura 17 muestra imágenes de AFM tanto antes como después del calentamiento con microondas (Parte superior izquierda y Parte inferior respectivamente) y el espectro de absorción de plasmones correspondientes (derecha).
- 50 La figura 18 muestra un inmunoensayo de Mioglobina de fluorescencia mejorada por el metal de la presente invención.

Las figuras 19A y B muestran las intensidades de fluorescencia del inmunoensayo de mioglobina en presencia y ausencia de plata sin calentamiento con microondas A (parte superior) y después del calentamiento con microondas de baja potencia B (parte superior). Se encontró que los espectros tanto en vidrio como plata son idénticos después de la normalización A y B (parte inferior).

5 La figura 20 muestra la geometría de la muestra en pozos de selección de alto rendimiento (HTS).

La figura 21 muestra una configuración de fluorescencia de reflexión interna total TIRF experimental montada sobre una plataforma XY, para el análisis en pozos de HTS con baño de plata y sin baño de plata.

La figura 22 muestra los espectros de absorción de pozos de HTS de fondo de plástico recubiertos con coloide de plata, antes y después del calentamiento con microondas de baja potencia.

10 La figura 23 muestra la intensidad de emisión de fluorescencia de fluoresceína de los pozos de HTS tanto con baño de plata y sin baño de plata (Parte superior) después de una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente. Los espectros son el promedio de 5 pozos. (Parte inferior) - espectros normalizados de ambos pozos con baño de plata y sin baño de plata.

15 La figura 24 muestra la intensidad de emisión de fluorescencia de fluoresceína de los pozos HTS tanto con baño de plata como sin baño de plata (Parte superior) después de 30 segundos del calentamiento con microondas. Los espectros son el promedio de 5 pozos. (Parte inferior) - Espectros normalizados de pozos tanto con baño de plata como sin baño de plata después del calentamiento con microondas.

20 La figura 25 muestra fotografías de pozos de HTS actuales, con y sin plata, antes y después del calentamiento con microondas. Las fotografías fueron tomadas a través de un filtro de paso largo con excitación de onda evanescente TIR de 473 nm.

La figura 26 muestra las velocidades de experimentos de control de absorción no específica de fluoresceína-avidina a superficies desnuda y con baño de plata después de 30 minutos de incubación (Parte superior), 30 segundos de incubación (Parte media), y después de 30 segundos del calentamiento con microondas de baja potencia (Parte inferior). Los fondos de los pozos no se recubrieron con BSA Biotinilada.

25 Descripción detallada de la invención

La presente invención se relaciona con sistemas y métodos para aumentar y detectar la fluorescencia de compuestos fluorescentes y no fluorescentes, incluyendo biomoléculas, mientras que aumenta la cinética de biorreacciones utilizadas en métodos de detección.

30 "Fluoróforo", como se usa en este documento, significa cualquier sustancia que emite energía electromagnética, tal como luz a una cierta longitud de onda (longitud de onda de emisión) cuando la sustancia es iluminada por la radiación de una longitud de onda (longitud de onda de excitación) diferente y se pretende abarcar una molécula química o bioquímica o fragmentos de la misma que es capaz de interactuar o reaccionar específicamente con un analito de interés en una muestra para proporcionar una o más señales ópticas. Adicionalmente, fluoróforo incluye fluoróforos tanto extrínsecos como intrínsecos. El fluoróforo extrínseco se relaciona con fluoróforos unidos a otra sustancia. Los  
35 fluoróforos intrínsecos se refieren a sustancias que son fluoróforos por sí mismos. Los fluoróforos de ejemplo incluyen, pero no se limitan a los enumerados en el Catálogo de Sondas Moleculares.

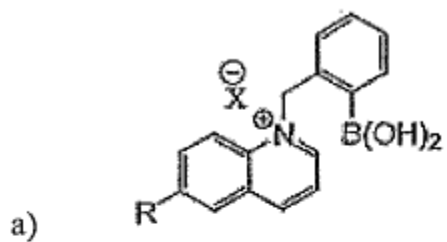
Los fluoróforos representativos incluyen pero no se limitan a Alexa Fluor® 350, cloruro de dansilo (DNS-Cl), 5-(yodoacetamida) fluoresceína (5-IAF); fluoresceína 5-isotiocianato (FITC), tetrametilrodamina 5-(y 6-)isotiocianato (TRITC), 6-acrilóil-2-dimetilaminonaftaleno (acrilodan), 7-nitrobenzo-2-oxa-1,3, -diazol-4-il cloruro (NBD-Cl), bromuro de etidio, Lucifer Yellow, 5-carboxirodamina 6G clorhidrato, lisamina rodamina B sulfonil cloruro, Texas Red™, cloruro de sulfonilo, BODIPY™., ácidos sulfónicos naftamina incluyendo pero no limitando a ácido 1-anilnonatfaleno- 8-sulfónico (ANS) y ácido 6- (p-toluidinil) naftalen -e-2-sulfónico (TNS), ácido graso Antróil, DPH, ácido parinárico, TMA-DPH, ácido graso fluorenilo, fluoresceína-fosfatidiletanolamina, Texas rojo-fosfatidiletanolamina, pirenilo-fosfatidilcolina, fluorenilo-fosfatidilcolina, merocianina 540, 1- (3-sulfonatopropil) -4 - [-beta- [ 2 [(di-nbutilamino) - 6 naftil] vinil] piridinio betaína (naftil estiril), 3,3'dipropiltiadicarbocianina (diS-C3-(5)), 4-(pdipentil aminostiril)-1-metilpiridinio (di-5-ASP), Cy-3 yodo Acetamida, Cy-5-N-Hidroxisuccinimida, Cy-7-Isotiocianato, rodamina 800, IR-125, Tiazol Naranja, Azure B, Nile Blue, Al Ftalocianina, Oxaxina 1, 4', 6-diamidino- 2-fenilindol (DAPI), Hoechst 33342, TOTO, Naranja de acridina, Homodímero Etidio, N(etoxicarbonilmetil)-6- metoxiquinolinio (MQAE), Fura-2, Calcio Verde, Carboxi SNARF-6, BAPTA, Cumarina, phytofluors, Coronene, y complejos de metal-ligando.

50 Los fluoróforos intrínsecos representativos incluyen, pero no se limitan a compuestos orgánicos que tienen estructuras de anillos aromáticos incluyendo, pero no limitando a NADH, FAD, tirosina, triptófano, purinas, pirimidinas, lípidos,

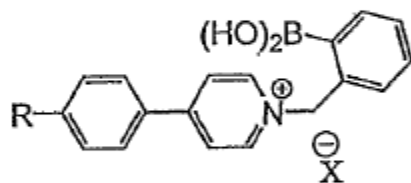
ácidos grasos, ácidos nucleicos, nucleótidos, nucleósidos, aminoácidos, proteínas, péptidos, ADN, ARN, azúcares y vitaminas. Los fluoróforos apropiados adicionales incluyen cofactores de enzimas; lantánido, proteína verde fluorescente, proteína amarilla fluorescente, proteína roja fluorescente, o mutantes y derivados de los mismos.

5 También se incluyen los novedosos compuestos que contienen ácido bórico heterocíclico de nitrógeno cuaternario incluyendo:

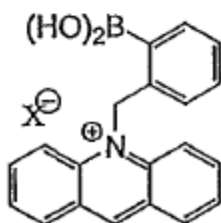
(A)



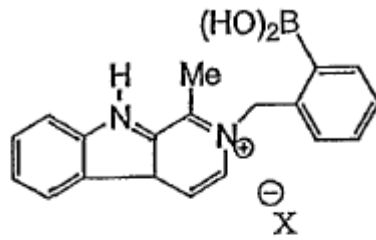
(B)



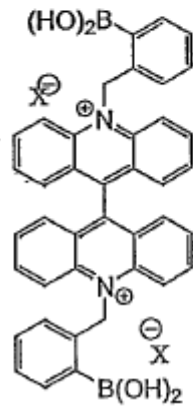
(C)



(D)

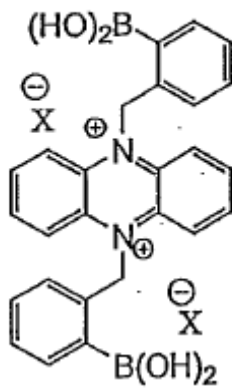


(E)



y

(F)



5 en donde X es cloruro, bromuro o yoduro y R se selecciona del grupo que consiste en H, grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> de cadena lineal o ramificada, grupo alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, grupo arilo, hidroxilo, ciano, sulfonilo, y NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>, en donde R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> pueden ser iguales o diferentes uno de otro y se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H y grupos alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub>.



El término "biomolécula" significa cualquier molécula de origen natural o un derivado de dicha molécula. La biomolécula puede ser en forma activa o inactiva. La "forma activa" significa que la biomolécula está en una forma que puede realizar una función biológica. La "forma inactiva" significa la biomolécula debe ser procesada ya sea de forma natural o sintética antes de que la biomolécula pueda realizar una función biológica. Las biomoléculas de ejemplo incluyen los ácidos nucleicos, estructuras de anillo de carbono aromático, NADH, FAD, aminoácidos, carbohidratos, esteroides, flavinas, proteínas, ADN, ARN, oligonucleótidos, péptidos, ácidos nucleicos, ácidos grasos, mioglobina, grupos de azúcares tales como glucosa etc., vitaminas, cofactores, purinas, pirimidinas, formicina, lípidos, fitocromo, phytofluor, péptidos, lípidos, anticuerpos y ficobiliproteína.

La invención combina el uso de la fluorescencia mejorada por el metal con la capacidad de acelerar enormemente la cinética biológica/bioquímica mediante el uso del calentamiento con microondas de bajo nivel de las muestras. Las microondas de bajo nivel no destruyen o desnaturalizan las proteínas, ADN, o ARN, pero en su lugar calientan la muestra suficientemente para proporcionar las cinéticas aceleradas tal como unión o hibridación. Además, las microondas no se encuentran dispersas por el metal de plata de baja densidad, que es contrario a la mayoría de los objetos metálicos, tales como aquella reconocida por la colocación de una cuchara en un horno de microondas. Por lo tanto, la presente invención combina las intensidades de señal mejorada y localizada que se han reportado para los metales en estrecha proximidad con los fluoróforos con la capacidad de calentar rápidamente las muestras utilizando microondas de bajo nivel.

Las microondas (aproximadamente 0.3 a aproximadamente 300 GHz) se encuentran entre las radiaciones electromagnéticas de infrarrojos y de radiofrecuencia. En general se piensa que las microondas aceleran las reacciones químicas y bioquímicas por el efecto de calentamiento,<sup>55</sup> donde el calentamiento sigue esencialmente el principio de pérdida dieléctrica de moléculas.<sup>42</sup> Las moléculas polares absorben la radiación de microondas a través de rotaciones dipolo y, por lo tanto, se calientan, en tanto que las moléculas no polares no absorben debido a las constantes dieléctricas bajas, por lo tanto, no se calientan.<sup>42</sup> Las moléculas polares se adhieren a las del campo externo aplicado. En la cavidad del horno de microondas convencional empleado en este trabajo, la frecuencia de la radiación (2.450 MHz) cambia de señal  $2.45 \times 10^9$  veces por segundo. El calentamiento se produce debido al efecto torsional ya que las moléculas polares rotan de atrás a delante, se realinean continuamente con el campo cambiante, siendo las rotaciones moleculares más lentas que el campo eléctrico cambiante. La constante dieléctrica, la capacidad de una molécula para ser polarizada por un campo eléctrico, indica la capacidad del medio a ser calentada por el microondas. Por lo tanto, los solventes tales como agua, metanol y dimetilformamida se calientan fácilmente, en tanto que las microondas son eficazmente transparentes al hexano, tolueno y dietiléter.<sup>42</sup> Para los metales, la atenuación de la radiación de microondas surge de la creación de corrientes resultantes de los portadores de carga que se desplazan por el campo eléctrico.<sup>58</sup> Estos electrones de conductancia son extremadamente móvil y a diferencia de las moléculas de agua se pueden polarizar completamente en 10-18 s. En la cavidad de microondas utilizada en la presente invención, el tiempo necesario para que el campo eléctrico aplicado que va a invertirse es mucho más largo que este, de hecho, muchos órdenes de magnitud. Si las partículas de metal son grandes, o forman bandas continuas, a continuación, las grandes diferencias de potencial se pueden provocar, lo que puede producir descargas dramáticas si son lo suficientemente grandes como para romper la resistencia eléctrica del medio que separa las partículas metálicas de gran tamaño. Curiosamente, y más apropiado para la nueva plataforma de ensayo descrita en este documento, las partículas metálicas pequeñas no generan diferencias de potencial suficientemente grandes para que ocurra este fenómeno de "arqueado".<sup>58</sup> Sin embargo, como se discute a continuación, los portadores de carga que se desplazan por el campo eléctrico son sujetos a la resistencia en el medio en el que se desplazan debido a las colisiones con los fonones de celosía.<sup>58</sup> Esto conduce a calentamiento óhmico de las nanopartículas de metal, además del calentamiento de cualquiera de las moléculas polares de superficie. Intuitivamente, esto conduce a un calentamiento localizado alrededor de las nanoestructuras de plata además del solvente, acelerando rápidamente la cinética de ensayo. Además, la estrecha proximidad de los fluoróforos de ensayo, adicionalmente, conduce a modificaciones de la velocidad de desintegración de radiactividad del fluoróforo<sup>22, 37</sup> y el posterior aumento en la emisión de fluorescencia<sup>22, 37</sup>. Por lo tanto, las nanopartículas metálicas, fluoróforos y las microondas se pueden combinar para producir inmunoensayos cinéticamente acelerados y ópticamente amplificados.

Existen muchos ensayos importantes que pueden beneficiar directamente de las intensidades de señal mejoradas y una cinética más rápida. Por ejemplo, las concentraciones de mioglobina para pacientes de ataque cardíaco, los pacientes de choque tóxico y pancreatitis. Todos estos ensayos son ampliamente utilizados en las salas de emergencia de los hospitales con tiempos de ensayo de más de 30 minutos. Por lo tanto, la presente invención se puede utilizar para puntos de cuidado y evaluación clínica en salas de emergencia.

En la presente invención, la radiación de microondas se proporciona por una fuente electromagnética que tiene una frecuencia en un rango entre 0.3 y 10 GHz y un nivel de potencia en un rango entre aproximadamente 10 milivatios y 400 vatios, más preferiblemente de 30 milivatios a aproximadamente 200 vatios. Cualquier fuente, conocida para un experto en la técnica se puede utilizar, tal como un láser que emite luz, en donde se utiliza la luz en su sentido más amplio, es decir, la radiación electromagnética que se propaga a través del espacio e incluye no sólo la luz visible, sino también radiación de infrarrojos, ultravioleta y microondas. Por lo tanto, un solo instrumento colocado por encima de la

superficie del ensayo se puede usar para generar la energía de microondas y la energía para excitar moléculas capaces de emitir fluorescencia. La luz se puede emitir a partir de una fibra continua o intermitente, según se desee, para mantener las partículas metálicas a una temperatura predeterminada tal que es capaz de aumentar la velocidad de las reacciones químicas en el sistema de ensayo. En la alternativa, la energía de microondas se puede suministrar a través de una guía de onda hueca para el transporte de energía de microondas desde un magnetrón apropiado. La energía de microondas se ajusta preferiblemente para causar un aumento del calor dentro del material metálico sin causar daño a cualquier material biológico en el sistema de ensayo.

La presente invención proporciona emisiones mejoradas utilizando islas metalizadas de formas elípticas, esféricas, triangulares o de tipo varilla. En casos de ejemplo, las islas elípticas tienen relación de aspecto de 3/2, y los coloides esféricos tienen un diámetro de 20-60 nm. Sin embargo, la invención no se limita a cualquier geometría particular. El uso de técnicas de recubrimiento conocidas, la colocación de islas metálicas podría ser controlada con precisión, tan cerca como 50 nm de distancia. En el caso de película metálica continua, las emisiones de fluoróforo se pueden detectar en la solución de analito a 500 nm de la superficie del metal. En el caso en donde el recubrimiento metálico está formado por islas, las emisiones de fluoróforo mejoradas podrían ser detectadas en la solución hasta 200 nm distante de la superficie del metal.

En una realización, la presente invención proporciona un material metálico y una biomolécula capaz de emitir fluorescencia, en donde el material metálico y la biomolécula están separados por al menos una capa de película espaciadora. El espesor de dicha película puede ser seleccionado con el fin de mejorar la fluorescencia de la biomolécula debido a la distancia de la biomolécula a partir del material metálico. La capa de película espaciadora puede ser una o varias capas de una película de polímero, una capa formada a partir de un ácido graso o una capa formada a partir de un óxido. En una realización preferible, las capas de película espaciadora y el material metálico son químicamente inertes y no se unen a las biomoléculas a ser detectadas o a intermedios que se unen a los compuestos para ser detectados, por ejemplo, unido covalentemente. La capa formada a partir de un ácido graso puede estar formada por una técnica de Langmuir-Blodgett. La capa de película espaciadora puede ser una película de polímero recubierto por centrifugación. La capa de óxido se puede formar a partir de una técnica de deposición, tal como deposición de vapor.

Adicionalmente, el material metálico puede ser en la forma de una matriz tridimensional porosa. La matriz tridimensional puede ser una matriz tridimensional nano-porosa. El material metálico puede incluir partículas coloides de metal y/o partículas de material compuesto de metal-sílice. El material metálico puede comprender aglomerados de partículas metálicas y/o partículas enlazadas binarias o partículas de metal en una matriz de polímero. La matriz tridimensional puede estar formada de vidrios de poro controlado o utilizando matrices ensambladas a partir de la agregación de los propios compuestos de plata-sílice. Las matrices pueden ser de matriz de nanoporos metálicos, a través del cual las especies fluirán y ambas serán detectadas y contadas de manera más eficiente.

#### Aumento de la velocidad de desintegración de radiactividad

Se sabe que un metal cercano puede aumentar la velocidad de desintegración intrínseca de un fluoróforo, es decir, para modificar la velocidad a la que el fluoróforo emite fotones. En fluorescencia, los espectros observables se rigen por la magnitud de  $\lambda$ , la velocidad de radiactividad, en relación con la suma de las velocidades de desintegración no radiactiva,  $k_{nr}$  tales como la conversión interna y temple.

Los fluoróforos con alta velocidad de radiactividad tienen altos rendimientos cuánticos y una corta vida media. Aumentar el rendimiento cuántico requiere la disminución de las velocidades no radiactivas  $K_{nr}$ , que a menudo sólo se lleva a cabo cuando se utiliza una temperatura de la solución baja o un fluoróforo unido en un entorno más rígido. La vida media natural de un fluoróforo,  $\tau_n$ , es la inversa de la velocidad de desintegración de radiactividad o de la vida media que se observaría si sus rendimientos cuánticos fueron unidad. Este valor está determinado por la fuerza de oscilador (coeficiente de extinción) de la transición electrónica. Por lo tanto, para casi todos los ejemplos empleados actualmente en la espectroscopia de fluorescencia, la velocidad de desintegración de radiactividad es esencialmente constante. La modificación y el control de la velocidad de radiactividad también se mencionan como Ingeniería de desintegración de radiactividad (RDE), o efecto de mejora de fluorescencia "pararrayos". Por ejemplo, recientemente se ha observado una fluorescencia de ADN intrínseco mejorada por encima de partículas metálicas, que normalmente no es fácilmente observable debido al muy bajo rendimiento cuántico del ADN de menos de  $10^{-4}$ . El segundo efecto favorable "pararrayos" también aumenta la intensidad de fluorescencia por excitación mejorada localmente. En este caso, la emisión de fluoróforos se puede mejorar sustancialmente con independencia de sus rendimientos cuánticos.

La reducción de la vida media de un fluoróforo cerca de un metal es debido a una interacción entre el fluoróforo y la partícula metálica, lo que mejora la velocidad de desintegración de radiactividad (aumento del rendimiento cuántico) o dependiendo de la distancia,  $d^{-3}$ , hace que se inactive. Cabe señalar que la vida media de fluoróforos con altos rendimientos cuánticos (0.5) disminuirían sustancialmente más que la vida media de aquellos con bajos rendimientos cuánticos (0.1 y 0.01). Una vida media del estado excitado más corta también permite menos reacciones fotoquímicas,

que posteriormente se traducen en un aumento de la fotoestabilidad del fluoróforo. En particular, el uso de fluoróforos de bajo rendimiento cuánticos daría lugar a mejoras de fluorescencia mucho más grandes (i.e.,  $1/Q_0$ ) y podría reducir significativamente emisión de fondo no deseada de los fluoróforos distales a partir del ensayo con baño de plata.

5 La fotoestabilidad del fluoróforo es una preocupación principal en muchas aplicaciones de fluorescencia. Esto es particularmente cierto en la espectroscopia de moléculas individuales. Una vida media más corta también permite un flujo de fotones más grande. El número máximo de fotones que son emitidos cada segundo por un fluoróforo está más o menos limitado por la vida media de su estado excitado. Por ejemplo, una vida media de 10 ns puede producir aproximadamente  $10^8$  fotones por segundo por molécula, pero en la práctica, sólo  $10^3$  fotones se pueden observar fácilmente. El pequeño número de fotones observados por lo general se debe tanto a la foto-destrucción y la emisión isotrópica. Si una superficie de metal disminuye la vida media, se pueden obtener más fotones por segundo por molécula aumentando de forma apropiada la intensidad incidente.

Por otra parte, la fluorescencia mejorada por el metal proporciona una intensidad mejorada, mientras que acorta simultáneamente la vida media. Es decir, puede ser posible disminuir la intensidad de excitación, y aun así ver un aumento significativo en la intensidad de emisión y fotoestabilidad.

15 La capacidad de aumentar la velocidad de desintegración de radiactividad sugiere que cualquier cromóforo, incluso especies no fluorescentes tales como bilirrubina, fullerenos, complejos de metal-ligando o porfirinas podría mostrar rendimientos cuánticos altos útiles cuando se coloca apropiadamente cerca de una superficie de metal. Los efectos de las interacciones de la superficie del fluoróforo de metal son altamente dependientes de la distancia entre la superficie del metal y la especie, y la naturaleza de la superficie metálica.

20 La emisión mejorada se puede observar en las distancias de acuerdo con el tipo de fluoróforo para ser detectado y el tipo de metal. Por ejemplo, la emisión mejorada se puede observar cuando un fluoróforo se distancia aproximadamente 4 nm a aproximadamente 200 nm a las superficies metálicas. Las distancias preferibles son aproximadamente 4 nm a aproximadamente 30 nm, y más preferiblemente, 4 nm a aproximadamente 20 nm a superficies metálicas. A esta escala, hay pocos fenómenos que proporcionan oportunidades para nuevos niveles de detección, manipulación y control. Adicionalmente, los dispositivos en esta escala pueden conducir a un rendimiento, sensibilidad y fiabilidad mejorado drásticamente con tamaño, peso reducido drásticamente, y por lo tanto el coste.

25 Se espera que los diferentes efectos de fluorescencia mejorada de superficie para superficies metálicas semitransparentes, sub-longitud de onda o espejos, películas isla de plata o coloides metálicos. Los efectos más dramáticos por lo general se observan para las islas y coloides en comparación con las superficies metálicas continuas. Las islas de plata tenían el notable efecto de aumentar la intensidad 5 veces mientras que disminuye la vida media 100 veces. Dicho efecto sólo se puede explicar por un aumento en la velocidad de desintegración de radiactividad,

30 La fluorescencia se puede detectar utilizando dispositivos incluyendo, pero no limitando a, un espectrofluorímetro con fuente de luz y el detector. Las fuentes de luz pueden incluir lámparas de arco y láser. Los detectores pueden incluir tubos fotomultiplicadores. Adicionalmente, es ventajoso que el dispositivo tenga un monocromador de modo que las longitudes de onda específicas de la luz se pueden usar para excitar una molécula o para detectar las emisiones a una longitud de onda específica. Cuando una muestra que contiene un fluoróforo se coloca en el espectrofluorímetro y se expone a una cantidad de radiación de excitación, el fluoróforo emite radiación que es detectada por un tubo fotomultiplicador. La intensidad de fluorescencia de una biomolécula se puede aumentar en respuesta a una cantidad de radiación de excitación cuando la distancia entre la partícula de metal y la biomolécula es desde aproximadamente 40 Å a aproximadamente 2000 Å, preferiblemente desde aproximadamente 40 Å a aproximadamente 200 Å. Alternativamente, la intensidad de fluorescencia de la biomolécula se puede reducir cuando la distancia entre la biomolécula y la partícula metálica es menos de aproximadamente 40 Å.

35 La presente invención proporciona un método para aumentar la intensidad de fluorescencia de una biomolécula marcada con fluorescencia incluyendo las etapas de marcación de una biomolécula con un fluoróforo, posicionamiento de la biomolécula marcada a una distancia aparte de una partícula metálica de tal manera que, en respuesta a una cantidad de radiación de excitación en el rango de microondas, el fluoróforo emite radiación.

40 En las aplicaciones de MEF, se encontró que las señales de fluorescencia mejorada (rendimientos cuánticos -  $Q_m$ ) de fluoróforos en estrecha proximidad (<10 nm) a nanoestructuras metálicas podrían ser bien descritos por las siguientes ecuaciones:

$$Q_m = (\Gamma + \Gamma_m) / (\Gamma + \Gamma_m + k_{nr}) \quad (1)$$

50

donde  $\Gamma$  es la velocidad de desintegración de radiactividad no modificada,  $\Gamma_m$  es la velocidad de desintegración de radiactividad modificada por metal y  $k_{nr}$  son las velocidades no radiactivas. Del mismo modo, la vida media modificada con metal,  $\tau_m$ , de un fluoróforo se reduce por un aumento de la velocidad de desintegración de radiactividad:

$$\tau_m = 1 / (\Gamma + \Gamma_m + k_{nr}) \quad (2)$$

5

Estas ecuaciones han dado lugar a predicciones más inusuales de combinaciones de fluoróforo-metal, y son estas predicciones y observaciones las que están encontrando actualmente profundas implicaciones y aplicaciones en nanotecnología basadas en la fluorescencia<sup>19-22, 37</sup>. Teniendo en cuenta que la fluorescencia se ha convertido en la herramienta dominante en biotecnología hoy, entonces la fluorescencia mejorada por metal<sup>19- 22, 37</sup> y acoplada a plasmones<sup>38, 39</sup> promete cambiar la forma como se ve la fluorescencia.<sup>40</sup> A partir de las ecuaciones 1 y 2, se puede observar que a medida que aumenta el valor de la  $\Gamma_m$ , el rendimiento cuántico  $Q_m$  aumenta, mientras que la vida media,  $\tau_m$ , disminuye. Esto es contrario a la mayoría de las observaciones en fluorescencia<sup>40</sup> donde el rendimiento cuántico de espacio libre,  $Q_0$ , y la vida media,  $\tau_0$ , suelen cambiar al unísono como se ha descrito por las ecuaciones bien conocidas:<sup>40</sup>

10

$$Q_0 = \Gamma / (\Gamma + k_{nr}) \quad (3)$$

$$\tau_0 = 1 / (\Gamma + k_{nr}) \quad (4)$$

15

Adicionalmente, uno de los principales criterios para la elección de los fluoróforos en inmunoensayos actuales ha sido un alto rendimiento cuántico. Esto puede conducir a un alto fondo de cualquiera de fluoróforos sin etiquetar o un alto fondo de fluorescencia de la absorción de ensayo no específico. Sin embargo, la fluorescencia mejorada por el metal es ideal en este sentido, ya que los fluoróforos de bajo rendimiento cuántico son más favorables,<sup>2,23,37</sup> el factor de mejora de la fluorescencia en presencia de nanoestructuras de plata dadas por  $1/Q_0$  donde  $Q_0$  es el rendimiento cuántico de espacio libre<sup>22</sup> en ausencia de metal. Posteriormente MEF cuando se aplica a los inmunoensayos, ensayos de rendimientos ultra luminosos, con una señal:ruido mucho más alta: en comparación con los ensayos idénticos que no emplean el fenómeno MEF.

20

#### Preparación de islas metálicas

25

Las partículas isla se preparan en vasos de precipitados limpios por reducción de iones metálicos utilizando diversos agentes reductores.<sup>83</sup> Por ejemplo, se adiciona hidróxido de sodio a una solución de nitrato de plata agitada rápidamente, formando un precipitado de color marrón. Se adicionó hidróxido de amonio para volver a disolver el precipitado. La solución se enfría y los portaobjetos de cuarzo secos se adicionan al vaso de precipitados, seguido de glucosa. Después de agitar, durante 2 minutos, la mezcla se calienta a 30 °C. Después de 10-15 minutos, la mezcla se vuelve de color amarillo-verde y se vuelve turbia. Una película delgada de partículas de plata se ha formado sobre los portaobjetos, como se puede ver a partir de su color verde marrón. Los portaobjetos se enjuagan con agua pura antes de su uso.

30

Los procedimientos alternativos para la preparación de partículas metálicas también están disponibles.<sup>84, 85, 86, 87, 88</sup> La plata se utiliza principalmente debido al color familiar de la absorción de plasmón superficial más larga de plata.

35

#### Preparación de coloides de plata

Los coloides se pueden preparar como suspensiones de metales de reducción de citrato. Los metales preferidos son plata y oro. Una vez más, el oro puede ser debido a la absorción de oro en longitudes de onda más cortas. Sin embargo, los coloides de oro se pueden usar con longitud de onda roja y fluoróforos NIR más largos.

40

El tamaño de los coloides y su homogeneidad se pueden determinar por las extensas publicaciones sobre las propiedades ópticas de las partículas metálicas disponibles y los efectos de la química de interfaz en la propiedad óptica de coloides.<sup>89</sup>

45

Las películas isla de plata se pueden formar por una reducción química de una sal de plata en la superficie de cuarzo, que son relativamente simples de fabricar. Sin embargo, este enfoque no proporciona un control de tamaño de partícula, o la distancia de los fluoróforos de la superficie. Mejoras de 1000 veces se han logrado con la comprensión de las geometrías de la muestra han sido heterogéneas y los factores de mejora promediada espacialmente.

Las partículas metálicas se pueden unir a una superficie colocando los grupos químicos funcionales, tales como cianuro (CN), amina (NH<sub>2</sub>) o tiol (SH), en un sustrato de vidrio o polímero. Se sabe que los coloides metálicos se unen espontáneamente a tales superficies con alta afinidad.<sup>90, 91, 92</sup>

5 El posicionamiento de la biomolécula o la partícula metálica a una distancia deseada se puede lograr utilizando una película. La película puede ser una película de polímero, una película de Langmuir-Blodgett o una película de óxido.

#### Películas de Langmuir-Blodgett

10 Las distancias metal-fluoróforo se pueden lograr utilizando películas de Langmuir-Blodgett con espaciadores de ácidos grasos. Los ácidos grasos pueden ser de fuentes naturales, incluyendo cortes o fraccionamientos concentrados, o ácidos carboxílicos alquilo sintéticos. Ejemplos de ácidos grasos incluyen, pero no se limitan a, caprílico (C<sub>8</sub>), cáprico (C<sub>10</sub>), láurico (C<sub>12</sub>), mirístico (C<sub>14</sub>), palmítico (C<sub>16</sub>), esteárico (C<sub>18</sub>), oleico (C<sub>18</sub>), linoleico (C<sub>18</sub>), linolénico (C<sub>18</sub>), ricinoleico (C<sub>18</sub>) araquídico (C<sub>20</sub>), gadolico (C<sub>20</sub>), behénico (C<sub>22</sub>) y erúxico (C<sub>22</sub>). Los ácidos grasos con longitudes de cadena de carbono de número par se ofrecen como ilustrativos de que los ácidos grasos de número impar también se pueden utilizar.

15 Las distancias metal-fluoróforo se pueden lograr utilizando películas de polímero. Ejemplos del polímero incluyen, pero no se limitan a, alcohol de polivinilo (PVA). Las medidas de absorbancia y elipsometría se pueden utilizar para determinar el espesor de película de polímero. Un tipo de películas de polímero es una película de polímero recubierto por centrifugación. La tecnología de películas espaciadoras de polímero recubierto por centrifugación permite que las películas se recubran fácilmente sobre una variedad de superficies, con un espesor variado a partir de > 0.1 um. El recubrimiento se puede realizar en un equipo de recubrimiento por centrifugación, lo que permite un espesor uniforme de la superficie mediante la variación de la concentración de polímero (viscosidad) y la velocidad de centrifugado. Por ejemplo, el equipo de recubrimiento por centrifugación modelo P6700 (Specialty Coating Systems Inc.), permite un espesor uniforme de la superficie mediante la variación de la concentración de polímero (viscosidad) y la velocidad de centrifugado.

20 En una realización, la detección se produce sin la unión de las moléculas al sensor o soporte. La molécula que va a ser detectada, no está unida químicamente. La molécula que va a ser detectada puede permanecer en solución y no interactuar directa o indirectamente con las partículas metálicas, revestimientos o capas espaciadoras de película.

25 Coloides metálicos (o varias otras formas no esféricas/partículas) también se pueden incorporar en los polímeros orgánicos, de forma covalente o no covalente, para formar matrices poliméricas, en donde la distancia de especie de difusión proporciona un aumento de la velocidad de desintegración de radiactividad y, por lo tanto, un aumento en rendimiento cuántico. Tales matrices poliméricas son ideales para la detección/aplicaciones de detección de flujo de especies de baja concentración.

30 Los polímeros que contienen partículas metálicas pueden tener otras aplicaciones, incluyendo pero no limitando a, detección de inclusión/exclusión de tamaño de las especies no fluorescentes, aumento de la fotoestabilidad de los fluoróforos incorporados, detección de moléculas individuales de poro único, y polímeros porosos que permiten la difusión de analitos o anticuerpos, resultando en un cambio de señal detectable y cuantificable en el analito o anticuerpo o elemento de transducción respectivo.

35 Esta realización de la presente invención también puede tener grandes aplicaciones en la medicina clínica, aplicaciones de monitoreo ambiental, seguridad nacional, tales como detección rápida de especies de baja concentración, procesos industriales, industrias farmacéuticas, tales como seguimiento de especies, y sensores para su uso en atmósferas reducidas tales como salas limpias de riesgo biológico y luz del espacio.

40 Los beneficios de la presente invención incluyen un aumento en intensidad de fluorescencia debido al aumento de las velocidades de desintegración de radiactividad y excitación, y la presente invención tiene muchas implicaciones profundas y aplicaciones en, pruebas clínicas, bioquímicas, biofísicas y de detección. Por ejemplo, que la emisión de cromóforos de bajo rendimiento cuántico puede ser aumentada tiene importantes implicaciones para los estudios de ácidos nucleicos y fluorescencia de la proteína. Probabilidad de que la fluorescencia mejorada de la superficie puede resultar en un millón de veces más fotones por fluoróforo puede proporcionar un equivalente, si no superando PCR y ELISA en términos de sensibilidad, para la detección de organismos infecciosos sin la necesidad de las etapas de amplificación utilizadas en la actualidad.

#### EJEMPLOS

50 La figura 1 muestra los espectros de absorción de plasmones de las películas isla de plata (SiF), tanto antes como después del calentamiento con microondas de baja potencia, durante 30 segundos. La potencia de la cavidad fue aproximadamente 140 vatios, que es el mismo que el utilizado en los ensayos discutidos más tarde, y es de una

potencia similar utilizada para inmunotinción.<sup>61,62</sup> Como puede verse en la Figura 1, las microondas y calentamiento no tuvo ningún efecto sobre la absorción de plasmón superficial de los SiF, indicando que no hay cambios en la forma estructural o de plata superficie, donde la absorción de plasmón superficial es bien conocida por ser característica de la forma de las nanopartículas,<sup>63,64</sup> que es debido a la oscilación de la trayectoria libre media de cargas superficiales.<sup>63, 64</sup>

Adicionalmente, ninguna "chispa" fue evidente a partir de las superficies con baño de plata, una consecuencia conocida de la acumulación de carga superficial y disipación de partículas de tamaño sin longitudes de onda grandes o superficies continuas.<sup>58</sup>

La morfología estructural de las superficies con baño de plata se midió adicionalmente utilizando microscopía de fuerza atómica como se muestra en la figura 2. Mientras que fue algo difícil probar que exactamente la misma área después del calentamiento con microondas, muy poco, si no se observó ningún cambio en la morfología de la superficie entre los lugares. Aunque no se muestra en la figura 2, las superficies con baño de plata, tanto húmedas y secas, fue adicionalmente expuesto a varios cientos de vatios de potencia de cavidad de microondas durante muchos minutos. En todas estas investigaciones no se encontró ninguna evidencia de cambios estructurales de la superficie por calentamiento con microondas, lo que demuestra claramente la compatibilidad de las superficies nanoestructuradas de exposición a microondas y por lo tanto el calentamiento. A este respecto, los estudios basados en diversas soluciones han informado recientemente que el microondas induce el crecimiento de nanoestructuras, aunque estos informes involucran solamente el crecimiento inicial de las partículas en presencia de surfactantes estabilizantes,<sup>65-69</sup> y no la exposición de estructuras finalizados como se describe en este documento.

Para demostrar la utilidad del enfoque nuevo de plataforma de ensayo descrito en este documento, se escogió un modelo de sistema de fluoróforo de proteína, la figura 3, que igualmente cubre la mitad de un portaobjetos de vidrio con baño de plata, el otro lado sin baño de plata, que actúan como una muestra de control por los que comparar los beneficios de utilizar el fenómeno de fluorescencia mejorada por metal (MEF). La relación de mejora ISiF /IGlass (La ventaja de utilizar el fenómeno MEF) es la intensidad de fluorescencia observada en las SiF dividida por la intensidad sobre el sustrato de vidrio sin baño de plata. La BSA biotilada forma fácilmente una monocapa sobre ambos sustratos de plata y vidrio.<sup>71-73</sup> Adicionalmente, este sistema de la proteína coloca fluoróforos > 4 nm de las superficies, que es ideal para MEF, que el presente inventor ha demostrado que es un fenómeno a través del espacio,<sup>22,23,37</sup> en comparación con una espectrometría raman de superficie mejorada SERS, se sabe que un efecto similar se debe a las interacciones de contacto.<sup>22</sup> Este sistema de proteína modelo también ofrece la cinética simples de superficie, i.e., no se espera ninguna reacción de nuevo debido a la bien conocida fuerte asociación de biotina y avidina.<sup>71-73</sup>

La figura 4 – parte superior muestra la intensidad de emisión de fluoresceína tanto del portaobjetos con baño de plata como del cristal (muestra de control). Los espectros de emisión, que se recoge a través de un filtro de paso largo de 500 nm, muestra una intensidad aproximado de 6 veces mayor del de plata en comparación con el control de vidrio. Este aumento se debe a una modificación de la velocidad radiactiva de la fluoresceína, ya que se pone en estrecha proximidad de las nanoestructuras de plata por la reacción de bioafinidad, y es consistente con numerosas publicaciones anteriores.<sup>19-37</sup> En la figura 4 - parte superior de la muestra se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, que se predetermina ser suficiente tiempo suficiente para permitir que el ensayo llegara a > 95% de finalización. La figura 4 - parte inferior muestra el espectro normalizado, lo que demuestra que las propiedades espectrales se conservan tanto en los sustratos de plata como de vidrio.

La figura 5 – parte superior muestra el efecto combinado de ambos, calentamiento con microondas de baja potencia y la amplificación óptica debido a la plata<sup>19-37</sup> para un ensayo idéntico como se mide en la figura 4, i.e., MAMEF. Curiosamente, el ensayo produce una intensidad de fluorescencia final de similar después de 20 segundos del calentamiento con microondas (aproximadamente 200 au) en comparación con una incubación a temperatura ambiente de 30 minutos, c.f Figuras 4 y 5 parte superior. En: Adición de plata vidrio de plata Avidina marcado con FITC; BSA biotilada, la plata sigue manteniendo sus propiedades para mejorar ópticamente la emisión de fluoresceína, debido a una modificación de la velocidad intrínseca radiactiva.<sup>22,23,37</sup> La figura 5 – parte inferior muestra que las propiedades de fluoresceína se mantienen cuando los espectros se normalizaron para la comparación.

Los ensayos se incubaron adicionalmente en ambos de vidrio y plata, durante 30 segundos a temperatura ambiente, pero sin calentamiento con microondas, como se muestra en la figura 6. Como se puede observar, muy poca avidina marcada con fluoresceína se une a la superficie BSA biotilada y cuando se compara con las intensidades de emisión que se muestran en la figura 5, a continuación, esto demuestra claramente el uso de microondas de baja potencia para aumentar la rapidez del ensayo. Esta comparación también es evidente visualmente en la figura 7, en donde las fotografías de la izquierda tomadas a través de un filtro de emisión después de 30 segundos de incubación y sin el calentamiento con microondas, en comparación con las fotografías a mano derecha que muestran la emisión de fluorescencia mucho más fuerte después de 30 segundos del calentamiento con microondas. Las fotografías de la parte posterior muestran los portaobjetos de microscopio, las regiones con baño de plata que aparecen de color marrón y en la parte derecha de cada portaobjetos.

Los beneficios de fluorescencia mejorada por el metal acelerada con microondas se pueden ver comparando las figuras 4, 5 y 6. Por lo tanto, las figuras 5, 6 y 7 demuestran el uso de microondas de baja potencia para calentar rápidamente las muestras de calor y cuando se combina con el uso de nanoestructuras de plata, ofrece facilidad de ensayos ultra brillante y ultra rápido. Curiosamente, las microondas no perturban la morfología de la nanoestructura plata o incluso causan la formación de arqueado, una característica familiar de objetos metálicos en cavidades de microondas.<sup>58</sup> Posteriormente, este enfoque dirige fundamentalmente dos limitaciones físicas subyacentes de ensayos e inmunoensayos modernos, a saber, la sensibilidad y rapidez del ensayo. En este sentido, el uso de las SiF prevé un aumento de aproximadamente 10 veces en la señal, que puede ser traducido a un aumento de 10 veces la sensibilidad del ensayo, mientras que el uso de microondas facilita el transporte de proteínas de masa a la superficie proporciona por aproximadamente una disminución de 90 -veces en el tiempo de realización del ensayo.

Una inspección más cercana y la comparación de las figuras 4 y 5 parte superior, revela que la rapidez del ensayo no es igual tanto en sustratos de vidrio como de plata. Después de 30 minutos de incubación (Figura 4 - parte superior) el ensayo tiene una intensidad máxima de emisión de aproximadamente 60 au a 530 nm. En comparación, después de 20 segundos del calentamiento de microondas (Figura 5 - parte superior), la intensidad de emisión en el control de vidrio tiene un valor de aproximadamente 25 au. Mientras que esta disminución se presta a una relación de la mejora más grande observada después del calentamiento con microondas, i.e., 6 vs. 9, se cree que este efecto es debido al calentamiento local preferencial alrededor de las nanoestructuras de plata,<sup>58</sup> acelerando rápidamente el transporte de masa a la superficie. Los estudios de temperatura de los ensayos descritos en este documento, han demostrado que, en las condiciones empleadas, se produjo sólo un salto de aproximadamente 8 °C de temperatura, que no tiene en cuenta para el aumento de 90 veces en la rapidez de ensayo, además soportando la noción del calentamiento localizado. Aunque es probable que puede haber contribuciones de efectos adicionales de plasma,<sup>74</sup> se cree que el calentamiento de las partículas metálicas y polvos por microondas da como resultado principalmente de mecanismos conductores.<sup>58</sup> La atenuación de la radiación de microondas en un medio conductor surge de la creación de corrientes como resultado de los portadores de carga que se desplaza en el campo eléctrico. Los portadores de carga están sujetos a la resistencia, las colisiones con fonones de celosía,<sup>58</sup> que conducen a un calentamiento óhmico.<sup>58</sup> En el presente ensayo, se cree que esto conducirá a la del calentamiento localizado alrededor de las partículas de plata y se cree que explican las diferencias en la rapidez de ensayo, tanto en sustratos de plata y de vidrio.

Como se ha descrito brevemente en lo que antecede, una modificación de la velocidad de desintegración de radiactividad del fluoróforo se puede caracterizar por un mayor rendimiento cuántico (aumento de la intensidad de fluorescencia), junto con una vida media disminuida, c.f. ecuaciones 1 y 2. Se midió la vida media de fluoresceína a partir del ensayo en ambas porciones de vidrio y con baño de plata después de 30 minutos de incubación, así como después de 30 segundos del calentamiento con microondas, figura 8. Sorprendentemente, las curvas de caída de intensidad de fluoresceína después de 30 minutos de incubación como en comparación con 30 segundos del calentamiento con microondas de baja potencia fueron casi idénticos, tanto revelando la vida media redujo significativamente en comparación con el control de vidrio. Curiosamente, el control de vidrio muestra aproximadamente 80 recuentos de fondo, que es debido a los tiempos de adquisición de datos más largos, en función del S:N inferior de fluoresceína sobre el vidrio en comparación con la plata. Dado el uso muy extendido de la espectroscopia de fluorescencia de la información ambiental y estructural de la proteína debido a la sensibilidad de los fluoróforos a su entorno,<sup>40</sup> entonces se puede concluir a partir de la figura 8 que los ensayos son idénticos (tanto en su conformación como ambientalmente), después de que ambos una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente y después de 30 segundos del calentamiento con microondas. Estas curvas de caída de intensidad no sólo sirven para confirmar una modificación en la velocidad de desintegración de radiactividad fluoróforo,  $\tau_m$ , pero de hecho la viabilidad de la plataforma de ensayo MAMEF. También se demostró que el ensayo no se somete a ningún cambio conformacional de proteínas debido al calentamiento con microondas de baja potencia, como lo demuestran los estudios de transferencia de energía de resonancia.

La fotoestabilidad del fluoróforo o analito es una preocupación primaria en muchas aplicaciones de fluorescencia, en particular los ensayos de tipo plataforma y en estudios de una sola molécula.<sup>40, 75</sup> El número máximo de fotones que son emitidos por un fluoróforo por segundo es más o menos limitado por su vida media en estado excitado.<sup>40</sup> Tanto, para vida media más corta, por lo general se puede observar muchos más fotones por fluoróforo por segundo. Este aumento de flujo de fotones, que se presta a coeficientes S/N muy mejorados para los ensayos y por lo tanto la mejora de la detectabilidad de analitos, se manifiesta como el área integrada bajo las curvas de intensidad de emisión de la figura 4 y 5. Es evidente que muchos más fotones son emitidos por molécula de fluoresceína en estrecha proximidad a la plata. Adicionalmente a un aumento de la detectabilidad, una vida media reducida en presencia de plata, proporciona una mayor fotoestabilidad del fluoróforo, como fluoróforos inherentemente pasan menos tiempo en un estado excitado (vida media reducida) y por lo tanto son menos propensos a la foto oxidación, la mayor vía de foto destrucción para sondas fluorescentes.<sup>40</sup>

Posteriormente, la fotoestabilidad del ensayo basado en fluoresceína se estudió después del calentamiento con microondas para evaluar cualquier grado de foto destrucción, donde el ensayo se incubó en primer lugar durante 30 minutos a temperatura ambiente. La figura 9 muestra el calentamiento con microondas acumulativo del ensayo, donde

el ensayo se calentó y luego la intensidad de fluorescencia a 530 nm medida después de 470 nm, aproximadamente 30 mW de excitación durante 1 minuto, y luego se repite el procedimiento. Después de 20 segundos del calentamiento con microondas ningún cambio en la emisión de la fluoresceína fue evidente en ambos los portaobjetos de vidrio y con baño de plata. Adicionalmente, ningún cambio en la intensidad de la señal de emisión fue evidente durante la exposición de 1 minuto para la luz láser. Curiosamente, aunque no se muestra en la figura 9, en las condiciones empleadas con este ensayo se llevó más de 3 minutos de calentamiento con microondas para secar el ensayo, hasta qué punto, tanto los espectros de emisión de fluoresceína y la intensidad pico permanecieron constantes.

Al igual que con la mayoría de los ensayos es la bioactividad de la especie y la naturaleza de las superficies que rigen el alcance de las reacciones no-específicas o absorción de ensayo de superficie no específica.<sup>1-8</sup> Posteriormente, se cuestionó si utilizando el calentamiento con microondas de baja potencia en realidad aumentaría la velocidad de absorción no específica en el ensayo modelo actualmente descrito. La figura 10 muestra los resultados de experimentos de control eran ambas superficies de vidrio y con baño de plata fueron incubadas con avidina marcada con fluoresceína. En estos experimentos las superficies no se pre-recubrieron con BSA-biotinilada. De la figura 10 - parte superior se puede observar que después de 30 minutos de incubación sin el calentamiento con microondas, esencialmente no fue evidente la fluoresceína a partir de las superficies desnudas. Esto indica que no hay una absorción no específica de avidina marcada con fluoresceína con la superficie. Sin embargo, después de la exposición de 30 segundos de baja potencia a microondas, una muy pequeña cantidad de emisión de la fluoresceína fue evidente en las SiF. Esta cantidad fue sustancialmente menor que  $> 200$  au de intensidad de fluorescencia que se muestra en la figura 5 parte superior, y por lo tanto no se cree que sea de alguna importancia. Posteriormente, en el sistema de modelo actualmente descrito, el grado de absorción no específica debido al calentamiento con microondas se consideró despreciable.

Se investigó si la próxima exposición a microondas causó efecto de desnaturalización de las proteínas en el sistema de ensayo presente. Los cambios conformacionales de la proteína en la superficie de un ensayo de fluorescencia mejorada por metal potencialmente podría complicar la cinética y la sensibilidad del ensayo, dado que MEF es un fenómeno dependiente de la distancia y a través del espacio.<sup>22,23, 37</sup> Posteriormente, se empleó la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) para investigar cualquier cambio conformacional de la proteína, una técnica que se utiliza ampliamente y por lo tanto no necesita introducción en este respecto.<sup>40</sup> Para investigar esto, la avidina marcada con fluoresceína (donante) y Alexa 532 (aceptor) se incubaron en ambas superficies por separado, juntos y tanto antes como después del calentamiento con microondas, figuras 11 y 12. En la figura 11 - parte superior se puede observar que las propiedades espectrales de emisión de avidina marcada con fluoresceína incubadas sobre una superficie de BSA biotinilada tanto antes como después del calentamiento con microondas permanecen sin cambios. Del mismo modo el acceptor (Alexa 532) incubado solo en la superficie biotinilada no muestra ningún cambio en sus propiedades espectrales de emisión, figura 11 - parte media. Cuando tanto el donante como el acceptor se incubaron juntos (30 minutos) en la superficie con una proporción D/A de 10: 1, entonces se puede ver claramente que tanto la emisión de fluoresceína como la emisión de Alexa, después de la excitación sola del donante, figura 11 - parte inferior. Curiosamente, los espectros de emisión son idénticos, tanto antes como después del calentamiento con microondas, lo que sugiere que el ensayo de proteínas de superficie no ha sufrido cambios conformacionales, cuando dichas modificaciones puedan alterar los espectros de emisión par de FRET.

En la figura 11 - parte inferior el espectro de emisión está dominado por la emisión de fluoresceína, principalmente porque este está en exceso, una proporción de superficie donante:aceptor 10:1. Posteriormente, las superficies donde la proporción D/A fue 1: 1 se prepararon como se muestra en la figura 12. De manera similar a la figura 11, los espectros de donante y acceptor solo no se perturban por calentamiento con microondas. Sin embargo, cuando el donante y el acceptor se incuban juntos (30 minutos), los espectros ya no están dominada por la emisión del donante, pero la transferencia de energía en lugar significativo se puede observar al acceptor, figura 12 - parte inferior. Una vez más, después del calentamiento con microondas, los espectros son casi idénticos a los que no se calienta, lo que sugiere que no se producen cambios conformacionales de la proteína, por el hecho de que el grado de transferencia de energía se mantiene constante, i.e., sin cambios espectrales D/A. Esto sugiere fuertemente que el enfoque actual utilizando el calentamiento con microondas de baja potencia no modifica la morfología de la superficie de ensayo.

El presente inventor ha demostrado un enfoque simplista y de bajo coste para superar algunas de las limitaciones físicas impuestas por las plataformas de ensayo actuales, es decir, la rapidez y sensibilidad del ensayo.<sup>1-8</sup> El presente enfoque MAMEF por lo tanto, tiene varias ventajas notables, entre ellas:

1) La amplificación de fluorescencia proporcionada por las nanoestructuras de plata se ha demostrado que es aplicable a muchos fluoróforos y, por lo tanto, longitudes de onda, desde el UV a cerca de IR.<sup>22,23,37</sup> Por lo tanto, fluoróforos empleado actualmente en ensayos todavía sería apropiado. Sin embargo, el uso de fluoróforos de bajo rendimiento cuántico daría lugar a mejoras de fluorescencia mucho más grandes (i.e.,  $1/Q_0$ ) y podría reducir significativamente la emisión de fondo no deseado de fluoróforos distales a partir del ensayo con baño de plata, recordando que el MEF es una interacción a través del espacio de rango cercano ( $<10$  nm).<sup>22,23,37</sup>



2) El fenómeno de fluorescencia mejorada por el metal se ha demostrado que proporciona para el aumento de intensidades de emisión,<sup>19-21</sup> de hasta varios miles-de veces.<sup>32</sup> Esto aumenta sustancialmente los límites de detección (i.e., menores concentraciones detectables), que es un criterio importante en el desarrollo del ensayo hoy.<sup>1-8</sup>

5 3) Una gran variedad de superficies con baño de plata se puede preparar de forma rutinaria, que no requieren los beneficios de un laboratorio de nanofabricación y la instrumentación sofisticada tal como litografía de haz de electrones.<sup>19-21</sup>

10 4) La vida media reducida de fluoróforos en estrecha proximidad de nanoestructuras de plata proporciona un aumento sustancial de fotoestabilidad del fluoróforo.<sup>19-21</sup> Adicionalmente, vidas medias más cortas permiten velocidades de ciclación de fluoróforo superiores,<sup>19-21</sup> que también proporciona un mayor fluoróforo y por lo tanto detectabilidad del ensayo.<sup>19-21, 41</sup>

15 5) Las microondas de baja potencia empleadas en este documento no perturban las superficies con baño de plata, no producen "arqueado" que se observa comúnmente para objetos metálicos en las cavidades de microondas,<sup>58</sup> o incluso desnaturalizar o cambian la conformación de la proteína. Las microondas de baja potencia proporcionan un rápido calentamiento eficaz de los ensayos, produciendo intensidades idénticas de fluorescencia finales, vida media de fluoróforos, así como extensiones de la transferencia de energía (conformación de la proteína) en comparación con incubación a temperatura ambiente.

#### Materiales

20 Albúmina bovina-biotinamidocaproil-marcada (BSA biotinilada), avidina marcada con FITC, nitrato de plata (99.9%), hidróxido de sodio (99.996%), hidróxido de amonio (30%), citrato trisódico, D-glucosa y portaobjetos de vidrio (75x25 mm) recubiertos con APS calidad premium se obtuvieron de Sigma-Aldrich. Avidina marcada con Alexa 532 se obtuvo de Molecular Probes (Eugene, OR). Todos los productos químicos se utilizaron tal como se recibieron.

La formación de las películas isla de plata (SiF) sobre sustratos de vidrio recubiertos con APS

25 En una preparación típica de SiF una solución de nitrato de plata (0.5 g en 60 mL de agua desionizada) en un vaso de precipitados de vidrio de 100 mL limpio, equipado con una barra de agitación recubierta de teflón, se prepara y se coloca en una placa de calentamiento/agitación Corning. Mientras se agitaba a la velocidad más rápida, 8 gotas (≈200 μL) de una solución de hidróxido de sodio recién preparada 5% (p/v) se adicionó. Esto da como resultado la formación de precipitados de color marrón oscuro de partículas de plata. A continuación, se adicionaron gota a gota, aproximadamente 2 mL de hidróxido de amonio para volver a disolver los precipitados. La solución clara se enfría a 5 °C colocando el vaso de precipitados en un baño de hielo, seguido de remojo de los portaobjetos de vidrio recubiertos con APS en la solución. Mientras se mantiene el portaobjeto a 5 °C, se adiciona una solución fresca de D-glucosa (0.72 g en 30 15 mL de agua). Posteriormente, la temperatura de la mezcla se calienta entonces a 30 °C. Como el color de la mezcla se vuelve de color amarillo-verde a amarillo-marrón, y el color de los portaobjetos se convierte en verde, los portaobjetos se retiran de la mezcla, se lavan con agua, y se sonicaron durante 1 minuto a temperatura ambiente. Los portaobjetos depositados-SiF se enjuagaron luego con agua desionizada varias veces y se secaron bajo una corriente de gas 35 nitrógeno.

Los portaobjetos de vidrio depositados-SiF se recubrieron con cinta aislante de color negro, que se une a un papel autoadhesivo, que contiene tres agujeros circulares de 5 mm de ancho

(denominado como un "cuerpo negro") en ambos portaobjetos con baño de plata y sin baño de plata, antes de la fabricación del ensayo y posteriores experimentos de fluorescencia.

40 Preparación del ensayo de proteína modelo (biotina-avidina) en películas isla de plata y en vidrio (ensayo de control)

45 Los métodos para preparar fluorescencia mejorada por el metal (MEF) han sido previamente descritos.<sup>19-21</sup> Este formato experimental ha sido adoptado por dos razones principales, la primera, siendo la albúmina de suero humano (HSA) se sabe que se unen a las superficies con baño de plata y de hecho forma una monocapa,<sup>71-73</sup> y en segundo lugar, las dimensiones de la proteína siendo de tal manera que la proteína permite una separación media ≈ 4 nm de la plata y el fluoróforo, siendo MEF un fenómeno a través del espacio, como se demuestra por la late T. Cotton.<sup>19-21,76</sup> Por el contrario, se sabe que espectrometría raman de superficie mejorada (SERS) es una consecuencia de poner en contacto con su mayor parte entre las especies de interés y la superficie con baño de plata.<sup>76</sup>

50 El ensayo modelo descrito en este documento se basa en las interacciones bien conocidas de biotina y avidina. Los grupos de biotina se introducen en la superficie a través de BSA biotinilada, que, similar a HSA, forma fácilmente una monocapa en las superficies de vidrio y SiF.<sup>71-73</sup> La unión de la BSA biotinilada con las SiF y el cristal se realizó mediante la incubación de solución 10 mM de BSA biotinilada en los microcubetas "cuerpo negro" durante 1 hora,

5 seguido de un enjuague con agua para eliminar el material no unido. Para el ensayo modelo, a continuación, se adicionaron posteriormente 30  $\mu\text{L}$  de avidina marcada con FITC 1  $\mu\text{M}$ , en el vidrio recubierto con BSA biotinilada y microcubetas recubiertas con SiF, 30 minutos para los experimentos de control a temperatura ambiente (20  $^{\circ}\text{C}$ ), y 20 segundos en la cavidad de microondas (0.7 pies cúbicos, GE Compact Microwave Modelo: JES735BF, 700W de potencia máxima). El ajuste de potencia se establece en 2, que corresponde a 140 W durante toda la cavidad. En todos los experimentos llevados a cabo con microondas de baja potencia, utilizando ambos portaobjetos de vidrio y cubetas de cuarzo modificadas con el "cuerpo negro", no hubo pruebas de secado de la superficie.

#### Experimentos de fotoestabilidad

10 El efecto de las microondas en la fotoestabilidad de FITC se estudió mediante la exposición del ensayo modelo, que previamente se dejó ejecutar a terminación a temperatura ambiente durante 30 minutos, a microondas para un total acumulado de 20 segundos. Aproximadamente, 30 mW, se usó línea de excitación láser de 470 nm durante 1 minuto antes de que se observara la intensidad de emisión.

#### Experimentos de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET)

15 Se llevaron a cabo experimentos FRET<sup>40</sup> para evaluar el efecto de las microondas en la conformación de la proteína y por lo tanto la desnaturalización. FITC y Alexa 532 fueron elegidos como el par donante-aceptor. Dos diferentes proporciones FITC a Alexa 532 se estudiaron en portaobjetos de vidrio recubiertos con BSA biotinilada que fueron cubiertos con el mismo "cuerpo negro" que se describió anteriormente. Diluciones 10: 1 y 1: 1 de FITC-avidina y Alexa 532-avidina se incubaron en portaobjetos de vidrio recubiertos con BSA biotinilada, que luego fueron expuestos a microondas (ajuste de potencia 2) durante 20 segundos. Se tomaron, los espectros de fluorescencia de las muestras, antes y después de la exposición a microondas.

#### Espectroscopia de fluorescencia resuelta en el tiempo y estado estacionario, absorción

25 Todas las mediciones de absorción se realizaron utilizando un espectrofotómetro Varian Cary 50 UV-Vis. Las mediciones de absorción dependientes de la temperatura se realizaron utilizando un accesorio Cary Single Cell Peltier. Las medidas de fluorescencia en las SiF se realizaron colocando las películas en una fase estacionaria equipadas con un soporte de fibra óptica en un brazo de 15 cm de largo (normal a muestra). La salida de la fibra estaba conectada a un espectrofluorímetro Ocean Optics HD2000 para medir los espectros de emisión de fluorescencia. La excitación fue desde el segundo armónico (470 nm) del láser de diodo bombeado Nd:YVO4 (diseño puntero láser compacto, potencia de salida  $\approx$  30 mW) en un ángulo de 45 grados. Se observó la emisión a través de un filtro de paso largo 500 nm (Edmund Scientific). Las desintegraciones de intensidad resueltas en el tiempo se midieron utilizando recuento de fotones individuales correlacionado con el tiempo de arranque-parada inverso (TCSPC) 40 con una tarjeta Becker y Hickl GmbH 630 SPC PC y un MCP-PMT- no amplificado. Excitación verticalmente polarizada a  $\approx$  440 nm se obtuvo utilizando un diodo láser de impulsos, velocidad de repetición de 1 MHz.

#### Microscopía de fuerza atómica (AFM) y fotografías a color real

35 Las imágenes de microscopía de fuerza atómica (AFM) de las SiF se recogieron utilizando un microscopio de fuerza atómica (TMX 2100 Explorador de SPM, Veeco) equipado con un escáner seco de AFM (el área de barrido fue 100x100 mm). Se obtuvieron imágenes de las superficies en el aire, en un modo de descarga de la operación, con bastidor de modo sin contacto SFM (Veeco). El escáner AFM fue calibrado utilizando una cuadrícula de calibración estándar, así como utilizando nanopartículas de oro, 100 nm de diámetro de Ted Pella. Las imágenes fueron analizadas utilizando el software SPMLab. Las fotografías a color real de BSA marcado con fluoróforo en SiF fueron tomadas con una cámara digital Olympus (C-740, 3.2 mega píxeles, zoom óptico de 10x) a través del mismo filtro de paso largo que se utilizó para los espectros de emisión.

#### Calibración de la temperatura en la cavidad de microondas

45 Con el fin de calibrar el cambio de temperatura durante el calentamiento con microondas de baja potencia, se utilizó un sistema de termo indicador de pH sencillo (azul de timol 0.5 mM, en Tris acetato 50 mM, pH 9.0). En este sentido, se colocaron 30  $\mu\text{L}$  de una solución de azul de timol en una cubeta de cuarzo que estaba cubierta con el "cuerpo negro", a excepción de dos lados paralelos para permitir el paso de luz para mediciones de absorción. Esta disposición es muy similar a la empleada en el ensayo de portaobjetos de vidrio y con baño de plata. Los espectros de absorción de la muestra se registraron, a medida que la temperatura se aumentó gradualmente desde 20 hasta 85  $^{\circ}\text{C}$ , como se muestra en la figura 13. El color de la solución cambió con la temperatura de magenta profundo a amarillo pálido, debido a la dependencia de la temperatura de la ionización constante de la solución reguladora Tris. A medida que se aumentó la temperatura, el pH de la solución se reduce y la distribución de los estados de ionización de los cambios del colorante de timol azul que resulta en un cambio de color como una función de la temperatura. El cambio de color reversible se

observa fácilmente en el espectro UV-Vis a través de los cambios en las bandas espectrales 425 y 600 nm, la figura 13- parte superior.

5 Se utilizó la curva de calibración (A600/A425 vs. temperatura), figura 13 parte inferior, obtenido de las mediciones de calibración antes mencionadas, para determinar la temperatura de la muestra durante el proceso de microondas: los espectros de absorción de 30  $\mu\text{L}$  de azul de timol en una cubeta de cuarzo cubierta con el mismo "cuerpo negro" se registró tanto antes como después del calentamiento con microondas durante un máximo de 60 segundos, figura 14 - parte superior, donde tanto el volumen utilizado como el cuerpo negro fueron los mismos como el que se utiliza actualmente en los ensayos. La respuesta radiométrica (A600/A425) obtenida a partir de estas muestras, figura 14 - parte inferior, se utilizó para determinar la temperatura de la muestra durante el calentamiento con microondas de la curva de calibración. A partir de gráficas de calibración, una exposición de microondas de 20 segundos 140 W, 2450 MHz, dio lugar a un salto de temperatura de aproximadamente 80 °C (a aproximadamente 28 °C) durante 30  $\mu\text{L}$  de muestra. Por lo tanto, con esta curva de calibración, la temperatura de la superficie de ensayo se puede cambiar fácilmente.

15 20 segundos del calentamiento con microondas más o menos correspondía a un salto de temperatura de 8-10 °C.<sup>32</sup> Cabe señalar que un instrumento disponible comercialmente (The Biowave), que también se basa en microondas de baja potencia, pero utiliza una sonda de temperatura de termopar, está disponible de Ted Pella, CA. Este instrumento, mientras que, inevitablemente, consume menos tiempo con respecto a las etapas de calibración necesarias realizadas en este documento, es sustancialmente más costoso que el enfoque simple llevado a cabo en este documento.

El uso de un cuerpo negro para el control de la temperatura de ensayo

20 Para lograr microondas capacidad de ajuste potencia y la temperatura y la finalización de tiempo, por lo tanto la flexibilidad de ensayo, se empleó la cinta eléctrica negro de construir pequeñas microcubetas, que mantienen  $\approx 30 \mu\text{L}$  de líquido en la superficie de tanto del vidrio desnudo y con baño de plata, un volumen por lo general utilizado en ensayos de alto rendimiento.<sup>1-8</sup> Se encontró que la presencia de la "cuerpo negro" tuvo el efecto deseable de reducir sustancialmente la potencia de cavidad local, donde sin microcubetas de cuerpo negro, 30  $\mu\text{L}$  de líquido de la superficie hervido rápidamente y se secó a 140 W. En esencia, utilizando las microcubetas de cuerpo negro, proporcionó capacidad de ajuste de potencia de la cavidad entre los ajustes número 1 y 2 en el dispositivo de microondas, aliviando la necesidad de gastar grandes sumas en un instrumento comercial ajustable.

Inmunoensayo de mioglobina

30 Para hacer frente a la rapidez del ensayo el uso de microondas de baja potencia (2450 MHz) fue empleado para calentar las muestras. Curiosamente, las partículas metálicas en la cavidad de microondas parecen ser calentado preferentemente con respecto a los solventes, que se localiza ventajosamente tanto el efecto de MEF y calentamiento alrededor de las nanoestructuras de plata. Para los metales, la atenuación de la radiación de microondas, se origina de la creación de corrientes resultantes de los portadores de carga que se desplazan por el campo eléctrico.<sup>93</sup> Estos electrones de conductancia son extremadamente móviles y a diferencia de las moléculas de agua se pueden polarizar completamente en  $10^{-18}$  s. En la cavidad de microondas, el tiempo necesario para el campo eléctrico aplicado que se va a invertir es mucho más largo que este, de hecho, muchos órdenes de magnitud. Si las partículas metálicas son grandes, o forman tiras continuas, a continuación, las grandes diferencias de potencial pueden dar como resultado, que puede producir descargas dramáticas si son lo suficientemente grandes como para romper la resistencia eléctrica del medio que separa las partículas metálicas de gran tamaño. Curiosamente, y lo más apropiado para nuestra nueva plataforma de ensayo descrita en este documento, las partículas metálicas pequeñas no generan suficientemente grandes diferencias de potencial para que se produzca este fenómeno "arqueado". Sin embargo, los portadores de carga, que se desplazan por el campo eléctrico, están sujetos a la resistencia en el medio en el que se desplazan debido a las colisiones con los fonones de celosía.<sup>93</sup> Esto conduce a calentamiento óhmico de las nanopartículas metálicas, además del calentamiento de cualquiera de las moléculas polares en fase de solución de la superficie.

45 Los inmunoensayos que utilizan los principios de la presente invención y el fenómeno MEF son muy apropiados para uso con fluoróforos de rendimiento bajo cuánticos como se muestra en la figura 16. Esto se produce debido a:

1) La mejora de la emisión de fluorescencia sistema de metal-fluoróforo máxima y, por lo tanto, la detectabilidad analito, es más o menos dados por  $1/Q_0$ , donde  $Q_0$  es el rendimiento cuántico del fluoróforo solo, en ausencia de metal y, por lo tanto, fluoróforos cuánticos de bajo rendimiento son más apropiados; y

50 2) fluoróforos cuánticos de bajo rendimiento invariablemente producirán mayores proporciones S/N. Esto es porque el fenómeno MEF es un fenómeno a través del espacio, que se producen hasta aproximadamente 10 nm de la superficie. Por lo tanto, material cuántico distal de bajo rendimiento desde la superficie de metal y fuera de la región de mejora, contribuye poco a la fluorescencia de fondo no deseada.

5 Nitrato de plata (99.9%), hidróxido de sodio (99.996%), hidróxido de amonio (30%), citrato trisódico, D-glucosa y de portaobjetos de vidrio recubiertos con APS calidad premium (75x25 mm) y albúmina de suero bovino (BSA) se obtuvieron de Sigma-Aldrich. La mioglobina (recombinante) y los anticuerpos monoclonales anti-mioglobina (clon anticuerpos anti-Myo de captura 2mb- 295, clon de anticuerpos anti-Myo indicador 9 mb-183r) se obtuvieron de Spectral Diagnostics, Canadá. Todos los productos químicos se utilizaron tal como se recibieron.

Los anticuerpos anti-Myo indicador fueron marcados con Alexa Fluor-647 utilizando un kit de marcación de sondas moleculares; Los colorantes proporcionados en el kit con unidades estructurales éster de succinimidilo reactivo, que reaccionan eficazmente con las aminas primarias de las proteínas.

10 Las películas isla de plata se formaron como se describe antes, arriba. En una preparación típica de SiF, una solución de hidróxido de sodio e hidróxido de amonio, se adicionaron a una solución agitada continuamente de nitrato de plata a temperatura ambiente. Posteriormente, la mezcla se enfría en un baño de hielo, portaobjetos de vidrio Silane-prep™ (Sigma) se insertan y se adiciona una solución de D-glucosa. A medida que aumenta la temperatura, el color de la mezcla se vuelve de color amarillo-marrón y los portaobjetos depositados con SiF se retiran de la mezcla, se lavan con agua, y se sonicaron durante 1 minuto a temperatura ambiente. Los efectos de las microondas sobre las SiF se investigaron mediante espectroscopia de absorción óptica y microscopía de fuerza atómica.

15 Los inmunoensayos de mioglobina (Myo) se realizaron en un formato de sándwich, pero con unas pocas modificaciones, y como se muestra en la figura 18. En este sentido, los portaobjetos se recubrieron de forma no covalente con anticuerpo anti-Myo de captura a temperatura ambiente. Las superficies de vidrio/SiF se bloquearon con BSA con el fin de reducir al mínimo la interacción no específica de los anticuerpos y la mioglobina con las superficies. A continuación, estas superficies se incubaron con antígeno de mioglobina (100 ng/mL) a temperatura ambiente, y luego se utilizan para mediciones de punto final. Las mediciones de punto final se llevaron a cabo mediante la incubación de las superficies recubiertas de antígeno en una solución de anticuerpos de anti-mioglobina marcada con Alexa 647 durante 30 minutos a temperatura ambiente, o en el microondas de las superficies recubiertas de antígeno con Anticuerpo anti-mioglobina marcada con Alexa 647 durante 20 segundos. Las mediciones de fluorescencia se llevaron a cabo mediante la recopilación de la intensidad de emisión a 45 grados para la excitación a través de un filtro de paso largo, utilizando un espectrómetro de fibra óptica (HD2000) de Ocean Optics, Inc.

20 La Figura 17 muestra los espectros de absorción de plasmones e imágenes de AFM de películas isla de plata (SiF), tanto antes como después del calentamiento con microondas de baja potencia durante 30 segundos. La potencia de la cavidad fue aproximadamente 140 vatios. Como puede verse en la figura 17, parte derecha, las microondas y el calentamiento no tuvieron efecto sobre la absorción de plasmón superficial de las SiF, lo que indica ningún cambio en la forma estructural o de plata superficial, donde la absorción de plasmón superficial es bien conocida por ser característica de la forma de las nanopartículas, lo cual es debido a la media de la oscilación de trayectoria libre de cargas superficiales.<sup>63,64</sup> Adicionalmente, ninguna "chispa" fue evidente a partir de las superficies con baño de plata, una consecuencia conocida de la acumulación de carga superficial y disipación de partículas de mayor tamaño o superficies continuas.

30 La morfología estructural de las superficies con baño de plata tanto antes como después del calentamiento con microondas de baja potencia utilizando microscopía de fuerza atómica, como se muestra en la figura 17- parte izquierda. Aunque era algo difícil de probar la misma área exacta después del calentamiento con microondas, muy poco, si ningún cambio en la morfología se observó de la superficie entre los lugares. Ninguna evidencia de cambios estructurales de la superficie fue encontrada por el calentamiento con microondas, lo que demuestra claramente la compatibilidad de las superficies nanoestructuradas a la exposición a microondas y por lo tanto al calentamiento. Adicionalmente, se realizaron experimentos de control para investigar tanto la intensidad de absorción como la emisión de Alexa-647 (estabilidad fluoróforo) después de la exposición a microondas. De manera similar a las superficies con baño de plata, el Alexa-647 fue imperturbable.

35 En un entorno clínico hay varios ensayos que podrían beneficiarse significativamente de ambas la rapidez y la sensibilidad. Un ensayo particular es para la determinación de la mioglobina y su papel en la evaluación clínica de un infarto de miocardio. Un ensayo de mioglobina se muestra en la figura 18. Adicionalmente, un ensayo de control fue preparado que fue idéntico al ensayo mioglobina con baño de plata excepto que el ensayo de control no tenía plata y se construyó sobre vidrio desnudo. Este fue construido para argumentar, los beneficios del uso de la técnica de MAMEF.

40 La figura 19A (parte superior) muestra la intensidad de la emisión de Alexa-647, en ambas plata y vidrio después de 30 minutos de incubación y sin calentamiento con microondas. Se utilizaron 100 ng/mL de mioglobina para intercalar el inmunoensayo, que es la concentración de corte clínico para la evaluación de un infarto de miocardio. El espectro de emisión, que se recogió a través de un filtro de paso largo, muestra una mayor intensidad aproximada de 7.5 veces de la plata en comparación con el control de vidrio. Este efecto se debe a una modificación de la velocidad de desintegración de radiactividad aparente del fluoróforo, ya que se pone en estrecha proximidad a las nanoestructuras de plata después de la formación del inmunoensayo de tipo sándwich.

Las Figuras 19A y B muestran las intensidades de fluorescencia del inmunoensayo de Mioglobina en presencia y ausencia de plata sin calentamiento con microondas A (parte superior) y después calentamiento con microondas de baja potencia B (parte superior). Se encontraron los espectros en ambos vidrio y plata para ser idénticos después de la normalización A y B (parte inferior). La muestra se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, que se predeterminó ser el tiempo bastante suficiente para permitir que el ensayo se realice a > 95% finalización.

La figura 19B muestra el efecto combinado de ambos el calentamiento con microondas de baja potencia y la amplificación óptica debido a la plata para un inmunoensayo idéntico. Sorprendentemente, el inmunoensayo de mioglobina produce una intensidad de fluorescencia similar final después 20 segundos del calentamiento con microondas (Mw),  $\approx$  3000 unidades arbitrarias, en comparación con una incubación de 30 minutos, pero sin calentamiento con microondas, figura 19A. Adicionalmente, la plata aún mantiene su capacidad de amplificar ópticamente la emisión de fluorescencia Alexa-647 después del calentamiento con microondas.

Una inspección cercana de ambas figuras 19A y B revela que las intensidades de fluorescencia finales sobre vidrio son diferentes, lo que se manifiesta en diferentes factores de mejora de la fluorescencia, para ambos ensayos. i.e., la mejora es de 7.5 veces sin calentamiento con microondas y 12 veces después del calentamiento con microondas de baja potencia. Los estudios de temperatura detallados de los ensayos han revelado que el salto de temperatura mayor en el sistema fue sólo 8 °C después de la exposición de microondas (50  $\mu$ L de muestra), que no tiene en cuenta el aumento  $\approx$  90 veces en la rapidez del ensayo. Se teoriza que este efecto es debido al calentamiento localizado preferencial alrededor de las nanoestructuras de plata, acelerando rápidamente el transporte de masa a la superficie y, por lo tanto, la cinética del ensayo

Para el ensayo de la mioglobina descrito en este documento, el uso de MAMEF proporcionó de forma inesperada un aumento en la detectabilidad de fluorescencia de 12 veces (intensidad de emisión) que puede ser fácilmente traducido a la sensibilidad del ensayo, y un aumento en la rapidez de 90 veces, siendo el ensayo cinéticamente completo (100%) dentro de los 30 segundos del calentamiento con microondas.

En el entorno clínico, un inmunoensayo de mioglobina puede tomar más de 1 hora para obtener una respuesta. Esto es debido a la necesidad de separar la sangre y el tiempo necesario para ejecutar el ensayo de suero hasta su terminación. El método descrito en este documento proporciona una tecnología de plataforma que amplifica y cinéticamente aumenta los ensayos para la terminación dentro de unos pocos segundos, potencialmente salvaguardar la vida.

#### Selección de alto rendimiento

Los materiales utilizados incluyen nitrato de plata (99.9%), citrato trisódico, albúmina marcada bovina biotinamidocaproil (BSA biotinilada), avidina marcada con FITC y placas de selección de alto rendimiento (HTS) recubiertas con SigmaScreen™ poli-D-lisina (96 pozos) se obtuvieron de Sigma-Aldrich.

La síntesis de coloides de plata se realizó utilizando el siguiente procedimiento: se adicionaron gota a gota 2 mL de solución 1.16 mM de citrato trisódico a 98 mL de una solución acuosa caliente (90 °C de nitrato de plata) 0.65 mM mientras se agitaba. La mezcla se mantuvo caliente durante 10 minutos y, a continuación, se enfrió a temperatura ambiente.

El recubrimiento de las placas de HTS se logró mediante la incubación de 0.5 mL de la solución coloidal de plata dentro de los pozos de HTS (48 pozos) durante la noche. Los pozos de HTS se recubrieron con coloides de plata debido a la unión de la plata con los grupos amino de la molécula de superficie,<sup>93, 25</sup> como se muestra en la figura 20. La otra mitad de los pozos (48 pozos) en las mismas placas de HTS se dejaron intencionalmente en blanco para los experimentos de control. Los pozos de HTS depositados con coloides de plata se enjuagaron con agua desionizada varias veces antes de los experimentos de fluorescencia. La densidad de número del coloidal de plata se puede determinar por las condiciones de incubación, el tamaño del coloide determinado por las condiciones experimentales de preparación, todas monitorizadas midiendo la absorción de plasmón de superficie, figura 22.

Los grupos de biotina se introducen a la superficie a través de BSA biotinilada, que forma fácilmente una monocapa sobre la superficie de películas coloides de plata u vidrio.<sup>71-73</sup> La unión de la BSA biotinilada con la parte modificada del coloide de plata y la no modificada de los pozos de HTS se llevó a cabo mediante la incubación de solución 10  $\mu$ M de BSA biotinilada en los pozos durante 1 hora, seguido de un enjuague con agua para eliminar el material no unido. Para el ensayo modelo, a continuación, se adicionaron 100  $\mu$ L de avidina marcada con FITC 1  $\mu$ M posteriormente a los pozos recubiertos con BSA biotinilada, 30 minutos para los experimentos de control a temperatura ambiente (20 °C), y 30 segundos en la cavidad de microondas (0.7 pies cúbicos, GE Compact Microwave Modelo: JES735BF, potencia máxima de 700 W), seguido de un enjuague con agua para eliminar el material no unido. El ajuste de potencia se establece en 2, que corresponde a 140 W sobre toda la cavidad. En todos los experimentos realizados con microondas de baja potencia utilizando placas de HTS, no hubo evidencia de secado del medio acuoso.

También se realizaron varios experimentos de control en los pozos de HTS modificados con coloides de plata y no modificados para investigar el grado de unión no específica de proteínas con los pozos HTS incluyendo:

- 1) La incubación de FITC-avidina sin BSA biotinilada y sin calentamiento con microondas durante 30 minutos,
- 2) La incubación de FITC-avidina sin BSA biotinilada y sin calentamiento con microondas durante 30 segundos,
- 5 3) La incubación de FITC-avidina con calentamiento con microondas y sin BSA biotinilada durante 30 segundos.

Todas las mediciones de absorción se realizaron con un espectrofotómetro UV-Vis HP 8453. Las medidas de fluorescencia en placas de HTS se realizaron colocando las placas de HTS en una etapa de reflexión interna total (TIR) equipado con un soporte de fibra óptica en un brazo de 15 cm de longitud (normal a la muestra), como se muestra en la figura 21. La salida de la fibra estaba conectada a un espectrofluorímetro Ocean Optics HD2000 para medir los espectros de emisión de fluorescencia. La excitación fue desde el segundo armónico (473 nm) del láser de diodo bombeado Nd: YVO4 (potencia de salida  $\approx$  30 mW) en un ángulo de 45 grados. Esta configuración permite cambios fáciles del ángulo de incidencia y la posición de la mancha de excitación evanescente. Se observó la emisión a través de un filtro de 500 nm razor-edge (Semrock).

La proporción mejorada de  $I_{\text{SIF}}/I_{\text{HTS}}$  (el beneficio de usar MEF) es la intensidad de fluorescencia observada en los coloides de plata dividida por la intensidad en el sustrato sin baño de plata. Adicionalmente, este sistema modelo de fluorescencia, como se muestra en la figura 20, coloca el fluoróforo (que es avidina marcada con fluoresceína), desde aproximadamente 4 nm a aproximadamente 10 nm a partir de las superficies.

Para la excitación del ensayo se muestra en la figura 20, se utilizó la fluorescencia reflexión interna total (TIRF) <sup>41</sup>. TIRF es un enfoque que permite fácilmente la excitación selectiva de fluoróforos dentro  $\approx$  200 nm proximidad a las superficies, un enfoque mal utilizado para los ensayos de superficie. Sin embargo, en la presencia de islas de plata como se muestra en la figura 22, el campo evanescente generado utilizando el formato TIRF, se ha demostrado que mucho más fuerte que en comparación con el vidrio no recubierto, <sup>66</sup> que penetra aún más en solución. Posteriormente, la excitación de onda evanescente limita el volumen de excitación en la superficie de ensayo, eliminando la necesidad para el lavado de la solución desde el ensayo anterior. Curiosamente, porque el fenómeno MEF sólo se produce a aproximadamente 10 nm de las nanopartículas de plata, a continuación, no se observa fluorescencia de fondo no deseada de material de ensayo distal de la superficie, el aumento de la S/N en los pozos de HTS para la detección.

La figura 22 muestra el espectro de absorción del plasmón de coloides de plata depositadas en la parte inferior de pozos de HTS, tanto antes como después del calentamiento con microondas de baja potencia durante 30 segundos, en donde la potencia de cavidad fue  $\approx$  140 vatios. Es evidente de la figura 22, que las microondas no tuvieron efecto sobre la absorción de plasmón superficial de los coloides de plata, lo que indica fuertemente ningún cambio de la forma o tamaño de la superficie con plata, donde la absorción de plasmón superficial es bien conocida por ser característica de la forma y tamaño nanopartículas de metal noble. <sup>20</sup> En particular, las partículas grandes o incluso superficies metálicas continuas producen "chispas" cuando se calienta en cavidades de microondas. Este efecto es debido a la carga acumulada, y posterior "arqueado", como carga acumulada entre las partículas. <sup>58</sup> Sin embargo, para las nanoestructuras depositadas en los pozos de HTS descritas en este documento, no fue evidente la formación de chispas en absoluto, lo que sugiere que la carga acumulada en los coloides de tamaño de nanómetro es demasiado pequeña para inducir la ruptura dieléctrica del medio que los separa.

La figura 23 muestra la intensidad de emisión de fluoresceína de ambos pozos de HTS con baño de plata y sin baño de plata después de la incubación a temperatura ambiente del ensayo. El ensayo se incubó durante 30 minutos. La emisión, que se recogió a través de un filtro de 500 nm razor edge (Semrock), muestra una mayor intensidad aproximada de 5 veces de la plata en comparación con los pozos sin baño de plata. Estos valores fueron la media de 4 pozos cada una, los datos recogidos rápidamente de cada pocillo moviendo el pozo de la placa en la etapa de XY como se muestra en la figura 21. Este aumento no se debe a los fotones reflejados desde la superficie con baño de plata, i.e., dispersión, pero es de hecho, una consecuencia de un nuevo fenómeno de fluorescencia de campo cercano, por lo cual los fluoróforos en estrecha proximidad ( $<10$  nm) a una nanoestructura de plata se pueden hacer altamente fluorescentes. La figura 23 (parte inferior) muestra espectros casi idénticos después de la normalización de tanto los pozos con baño de plata y sin baño de plata, indicando las únicas diferencias en la emisión que son las intensidades relativas.

La figura 24 muestra la intensidad de fluorescencia de la fluoresceína a partir de tanto el con baño de plata y pozos de HTS sin baño de plata después de 30 segundos del calentamiento con microondas. Similar a la figura 23, una mejora de la fluorescencia de  $\approx$  4-5 veces se puede ver en la plata en comparación con los pozos sin plata. Curiosamente, se observaron intensidades de emisión similares durante 30 minutos de incubación en comparación con 30 segundos del calentamiento de microondas, un aumento de cinética de  $\approx$  90 veces. Las ligeras diferencias en las intensidades de fluorescencia final (1700 vs. 2250 unidades arbitrarias) son debido al hecho de que 45 segundos del calentamiento era

necesario actualmente para tomar el ensayo a > 95% cinéticamente completo y no 30 segundos como se muestra en la figura 24-parte superior (datos no mostrados). Curiosamente, la intensidad de emisión en las placas sin baño de plata fue similar para ambos 30 minutos de incubación y 30 segundos del calentamiento con microondas de baja potencia. Claramente, teniendo en cuenta las figuras 23 y 24 - parte superior, los beneficios del uso del calentamiento con microondas de baja potencia para acelerar ensayos in pozos de HTS se pueden ver, así como el beneficio combinado de fluorescencia amplificado para facilitar la detección por la presencia de los coloides de plata. Sorprendentemente, el aumento de cinética de  $\approx 90$  veces no se puede explicar sólo por el salto de temperatura de  $\approx 8$  °C, pero en cambio se cree que se produce un calentamiento localizado y, de hecho, preferencial alrededor de las nanopartículas de plata.

La comparación de MAMEF en las placas de 96 pozos es también evidente visualmente, como se muestra en las fotografías de la figura 25. Las fotografías de la parte superior izquierda y derecha comparan visualmente la emisión con y sin plata, mientras que la parte inferior izquierda y derecha muestran los efectos del calentamiento con microondas de baja potencia, con y sin coloides de plata. Sorprendentemente, mediante la comparación de ambas parte inferior-izquierda con la parte superior derecha de la fotografía, los beneficios del uso de la técnica de MAMEF se pueden ver claramente. Todas las fotografías fueron tomadas a través de un filtro 500 nm razor-edge (Semrock) con 473 nm de excitación de onda evanescente.

Se cuestionó si el uso de microondas de baja potencia en formatos de pozos de HTS de hecho aumentó la velocidad de absorción no específica en el presente ensayo modelo. En estos experimentos, los fondos de los pozos no fueron pre-recubiertos con BSA biotinilada, como es el caso en los ensayos modelo mostrados en las Figuras 22, 23 y 24. En la figura 26, (parte superior) se puede observar que después de 30 minutos de incubación en los pozos con FITC-avidina, seguido de una etapa de lavado, la emisión de la fluoresceína fue evidente, más que en el pozo con baño de plata en comparación con la parte inferior del pozo si baño de plata, aunque el grado de absorción fue mucho más pequeño que el ensayo actual que se muestra en la figura 23. Curiosamente, una gran parte significativamente de la absorción no específica se produjo en los primeros 30 segundos de incubación a temperatura ambiente, figura 26 – parte media. Después del calentamiento con microondas de baja potencia durante 30 segundos, figura 26 parte inferior, la intensidad de fluorescencia similar se observó en comparación con sólo 30 segundos de incubación a temperatura ambiente, c.f. figura 26 parte media e inferior. Esto sugiere que las microondas de baja potencia no aceleran aún más la absorción no específica, más allá que la presente normalmente en este sistema de ensayo.

Adicionalmente de la fotoestabilidad de fluorescencia tradicional, se investigó los efectos del calentamiento con microondas de baja potencia en la intensidad de emisión del ensayo de fluoresceína, donde el ensayo se incubó inicialmente durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de este tiempo, el ensayo fue de calentada por el microondas en incrementos de 5 segundos acumulativas de hasta 1 minuto, la intensidad de fluorescencia medida a 530 nm después de la excitación 473 nm. Después de 1 minuto del calentamiento total y re-excitación, ningún cambio en la intensidad de la señal de emisión fue evidente, lo que indica que las microondas de baja potencia no perturban la fluorescencia de la fluoresceína. Curiosamente, en las condiciones empleadas con este ensayo, se tardó más de 5 minutos de calentamiento con microondas para secar completamente ensayos de pozos de múltiples placas, hasta qué punto, tanto los espectros de emisión de fluoresceína como la intensidad pico se mantuvo en general constante.

Es importante destacar que las microondas de baja potencia empleadas en este documento no perturbar las superficies con baño de plata y no producen "arqueado", que se observan comúnmente para objetos metálicos más grandes en cavidades de microondas.<sup>58</sup> Las microondas no perturbar las nanoestructuras de plata, sino simplemente aumentan el transporte de masa de la proteína al fondo del pozo de la placa. Adicionalmente, las microondas de baja potencia proporcionan un rápido calentamiento eficaz de los ensayos, produciendo las intensidades de fluorescencia finales idénticas en comparación con incubación a temperatura ambiente por más tiempo.

Adicionalmente, el modo de campo evanescente mejorado con plata de la excitación localiza el volumen de excitación en estrecha proximidad a las nanoestructuras de plata. Esto elimina la necesidad de etapas de lavado de ensayo. A este respecto el ensayo mostrado en la figura 23, ha demostrado que tiene características e intensidades espectrales casi idénticas, con o sin una etapa de lavado.

#### Referencias

Los contenidos de todas las referencias citadas se incorporan por referencia en la presente a todos los efectos.

(1) Bange A.; Halsall, H. B.; Heineman, W.R. *Biosensors and Bioelectronics* 2005, 20 (12), 2488-2503.

(2) Hemmilam L. A. *Applications of Fluorescence in Immunoassays*, John Wileys and Sons, New York, 1992.

(3) Van dyke, K.; Van Dyke, R. (Eds.), *Luminescence Immunoassay and Molecular Applications*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1990.

- (4) Ozinkas, A. J. Principles of Fluorescence Immunoassay, in Topics in Fluorescence Spectroscopy, Volume 4, Lakowicz, J. R. (Ed.), Plenum Press, New York, 1994.
- (5) Gosling, J. P. Clin. Chem. 1990, 36, 1408-1427.
- (6) Davidson, R. S.; Hilchenbach, M. M. Photocem. Photobiol. 1990, 52, 431-438.
- 5 (7) Vo-Dinh, T.; Sepaniak, M. J.; Griffin, G. D.; Alarie, J. P. Immunosensors 1993, 3, 85-92.
- (8) Schweitzer, B.; Kingsmore, S. F. Current Opinion in Biotechnology 2002, 13, 14-19.
- (9) Lovgren, T.; Hemmila, I.; Petterson, K.; Halonen, P. Time-Resolved Fluorometry in Immunoassay, in Alternative Immunoassay, Collins, W. P. (Ed.), John Wileys an Sons, New York, 1985.
- (10) Diamendis, E. P. Clin. Chem. 1988,21, 139-150.
- 10 (11) Lovgren, T.; Petterson, K. Time-Resolved Fluoroimmunoassay,: Advantages and Limitations, in Luminescence Immunoassay and Molecular Applications, CRC Press, Boca Raton, FL, 1990.
- (12) Khosravi, M.; Diamendis, E. P. Clin. Chem. 1987, 33,1993-1999.
- (13) Soini, E. Pulsed light, Time-Resolved Fluorometric Immunoassay, in Monoclobal Antibodies and New Trends in Immunoassays, Bizollon, C. A. (Ed), Elsevier Science Publishers, New York, 1984.
- 15 (14) Ullman, E. F.; Schwarzberg, M.; Rubenstein K. E. J. Biol. Chem. 1976, 251, 4172-4178.
- (15) Ozinkas, A. J.; Malak, H.; Jaoshi, J.; Szmecinski, H.; Britz, J.; Thompson, R. B. Koen, P. A. Lakowicz, J. R. Anal. Biochem. 1993, 213, 264-270.
- (16) Lakowicz, J. R; Ozinkas, A. J.; Thompson, R. B. Sensors and Actuators. 1993, 12, 65-70.
- (17) Dandliker, W. B.; Saussure, V. A. Immnochemistry 1970, 7, 799-828.
- 20 (18) Spencer, R. D.; Toledo, F. B.; Williams, B. T.; Yoss, N. L. Clin. Chem. 1973, 19, 838-844.
- (19) Asian, K.; Gryczynski I.; Malicka J.; Matveeva E.; Lakowicz, J.R.; Geddes, C.D. Current Opinion in Biotechnology, 2005, 16(1), 55-62.
- (20) Geddes, C.D.; Aslan, K.; Gryczynski, I.; Malicka, J.; Lakowicz, J.R., In Review Chapter for Annual Reviews in Fluorescence 2004, Geddes, C.D.; Lakowicz, J.R., Eds; Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA, 2004; pp. 365-401.
- 25 (21) Geddes, C.D.; Aslan, K., Gryczynski, I.; Malicka, J.; and Lakowicz, J.R. In Topics in Fluorescence in Fluorescence Spectroscopy, Geddes, C.D.; Lakowicz, J.R., Eds; Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA, 2005; pp. 401-448.
- (22) Lakowicz, J. R. Anal. Biochem. 2001, 298, 1-24.
- 30 (23) Lakowicz, J. R.; Shen, Y.; D'Auria, S.; Malicka, J.; Fang, J.; Grczynski, Z.; Gryczynski, I. Anal.Biochem. 2002, 301, 261-277.
- (24) Lakowicz J.R.; Shen Y.; Gryczynski Z.; D'Auria S.; Gryczynski I. Biochem Biophys Res Com.2001, 286, 875-879.
- (25) Malicka J.; Gryczynski I.; Lakowicz J.R. Biochem and Biophys Res Com. 2003, 306, 213-218.
- (26) Lakowicz J.R.; Malicka J.; D'Auria S.; Gryczynski I.; Anal Biochem. 2003, 320, 13-20.
- 35 (27) Aslan, K.; Lakowicz, J.R.; Szmecinski, H.; Geddes, C.D. J. Fluoresc. 2005, 15(1), 37-40.
- (28) Malicka, J.; Gryczynski, I.; Geddes, C, D.; Lakowicz, J. R. J. Biomed. Opt. 2003 , 8(3), 472-478.
- (29) Geddes, C. D.; Cao, H.; Gryczynski, I.; Gryczynski, Z.; Fang, J.; Lakowicz, J. R. J. Phys. Chem. A 2003, 107(18), 3443.



- (30) Aslan, K.; Lakowicz, J.R.; Geddes, C.D. *J. Phys. Chem. B.* 2005, 109, 6247-6251.
- (31) Aslan, K.; Leonenko, Z.; Lakowicz, J. R.; Geddes, C. D.; *J. Phys. Chem. B.* 2005, 109(8), 3157-3162.
- (32) Parfenov, A.; Gryczynski, I.; Malicka, J.; Geddes, C. D.; Lakowicz, J. R. *J. Phys. Chem. B.* 2003, 107(34), 8829-8833.
- 5 (33) Geddes C.D.; Parfenov, A.; Lakowicz, J.R. *Applied Spectroscopy* 2003, 57(5), 526-531.
- (34) Geddes, C.D.; Parfenov, A.; Roll, D.; Fang, J.; Lakowicz, J. R. *Langmuir*, 2003, 19(15), 6236-6241.
- (35) Aslan, K.; Badugu, R.; Lakowicz, J.R.; Geddes, C.D. *J. Fluoresc.* 2005, 15(2), 99-104.
- (36) Geddes, C.D.; Parfenov, A.; Roll, D.; Gryczynski, I.; Malicka, J.; Lakowicz, J. R. *Spectrochimica Acta Part A*, 2004, 60(8-9), 1977-1982.
- 10 (37) Geddes C.D.; Lakowicz J.R. *J Fluoresc.* 2002,12(2),121-129.
- (38) Geddes, C.D.; Gryczynski, I.; Malicka, J.; Gryczynski, Z.; Lakowicz, J. R. *Photonics Spectra*, 38 (2): 92+ February 2004.
- (39) Lakowicz, J. R. *Analytical Biochemistry* 2004, 324 (2): 153-169.
- (40) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Kluwer, New York, 1999.
- 15 (41) Matveeva, E.; Gryczynski Z.; Malicka, J.; Gryczynski, I.; Lakowicz, J.R. *Analytical Biochemistry* 2004, 334 (2): 303-311.
- (42) Sridar, V. *Current Science* 1998,74 (5): 446-450.
- (43) Caddick, S. *Tetrahedron* 1995, 51, 10403-10432.
- 20 (44) Sridar V. *Indian Journal Of Chemistry Section B-Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry* 1997, 36 (1): 86-87.
- (45) Varma, R. S. *Advances in Green chemistry: Chemical Synthesis using Microwave Irradiation*, Astrazeneca Research Foundation, India, Bangalore, 2002.
- (46) Lin, J.C.; Yuan, P.M.K.; Jung, D.T. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 1998, 47(2): 259-264.
- (47) Akins, R.E.; Tuan, R, S. *Molecular Biotechnology* 1995, 4 (1): 17-24.
- 25 (48) Rhodes, A.; Jasani, B.; Balaton, A. J.; Barnes, D.M. ; Anderson, E. ; Bobrow, L. G.; Miller, K. D. *American Journal of Clinical Pathology* 2001, 115 (1): 44-58.
- (49) Van Triest, B.; Loftus, B. M.; Pinedo, H. M.; Backus, H. H. J.; Schoenmakers, P.; Telleman F. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 2000, 48 (6): 755-760.
- 30 (50) Croppo, G. P.; Visvesvara, G. S.; Leitch, G.J.; Wallace, S.; Schwartz, D. A. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 1998, 122 (2): 182-186.
- (51) Philippova T. M.; Novoselov, V. I.; Alekseev, S. I. *Bioelectromagnetics* 1994, 15 (3): 183-192.
- (52) Roy, I.; Gupta, M. N. *Current Science* 2003, 85(12), 1685-1693.
- (53) Bismuto, E.; Mancinelli, F; d'Ambrosio, G.; Massa, R. *Eur. Biophys. J.* 2003, 32, 628-634.
- 35 (54) Porcelli, M.; Cacciapuoti, G.; Fusco, S.; Massa, R.; d'Ambrosio, G.; Bertoldo, C.; DeRosa, M.; Zappia, V. *Febs Letters* 1997, 402 (2-3): 102-106.
- (55) Adam, D. *Nature* 2003, 421, 571-572.
- (56) Whittaker, A. G.; Mingos, D. M. P. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 1995, 12, 2073-2079.

- (57) Kappe, C. O. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2002, 6, 314-320.
- (58) Whittaker, A. G.; Mingos, D. M. P. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 1993, 16, 2541-2543.
- (59) Technology Vision 2020, The US Chemical Industry, December 1996.
- 5 (60) Chen, S. T.; Sookheo, B.; Phutraikul, S.; Wang, K.T. *Enzymes in Nonaqueous Solvents: Applications in Carbohydrate and Peptide Preparation*, in *Enzymes in Nonaqueous Solvents*, Vulfson E. N.; Halliog P. J.; Bolland, H. L. (Eds.), Humana Press, New Jersey, 2001, pp.373-400.
- (61) Micheva, K. D.; Holz, R. W.; Smith, S. J. *J. Cell Biol.* 2001, 154, 355-368.
- (62) Petrali, J. P.; Mills K. R. *Micro Microanalysis*, 1998, 114-115.
- (63) Link, S.; El-Sayed, M. A., *J. Phys. Chem. B.*, 1999, 103, 8410-8426.
- 10 (64) Kreibig, U.; Genzel, L. *Surface Science* 1985, 156, 678-700.
- (65) Gao, F.; Lu, Q.; Komarneni, S. *Chem. Mater.* 2005; 17(4); 856-860.
- (66) Liu, F-K.; Chang, Y-C.; Huang, P-W.; Ko, F-H.; Chu, T-C. *Chem. Lett.* 2004, 33(8), 1050-1051.
- (67) Liu, F-K.; Huang, P-W.; Chu, T-C.; Ko, F-H. *Materials Letters* 2005, 59 (8-9), 940-944.
- (68) Liu, F-K.; Huang, P-W.; Chang, Y-C.; Ko, C-J.; Ko, F-H.; Chu, T-C. *J. Crystal Growth*, 2005,273 (3-4): 439-445.
- 15 (69) Liu, F-K.; Huang, P-W.; Chang, Y-C.; Ko, F-H.; Chu, T-C. *J. Mater. Res.* 2004, 19 (2): 469-473.
- (70) Aslan, K.; Lakowicz, J. R.; Geddes, C.D. *Analytical Biochemistry* (submitted).
- (71) Green, N. M. *Adv. Protein Chem.* 1975, 29, 85-133.
- (72) Wilchek, M.; Bayer, E. A. *Anal. Biochem.* 1998, 171, 1-6.
- (73) Wilchek, M.; Bayer, E. A. *Methods of Enzymology*; Vol. 184, Academic Press, San Diego. 1990.
- 20 (74) Baziard Y.; Breton, S.; Toutain, S.; Gourdenne, A. *Eur. Polym.J.* 1988, 24, 521-526.
- (75) Axelrod, D., Hellen, E. H. and Fulbright, R. M. *Total internal reflection fluorescence*, in *Topics in Fluorescence Spectroscopy*, Vol. 3: Biochemical applications, Lakowicz J. R., (Ed.), Plenum Press, New York, 1992pp. 289-343.
- (76) Sokolov, K.; Chumanov, G.; Cotton, T. M. *Anal. Chem.* 1998, 70, 3898-3905.
- (77) Chicoine, L.; Webster, P. *Micro Res. Tech.* 1998, 42, 24-32.
- 25 (78) Madden, V.J. *Micro Microanalysis* 4, 1998, 854-855.
- (79) Rangell, L. K.; Keller, G. A. *J. Histochem. Cytochem.* 2000, 28, 1153-1160.
- (80) Schichnes, D.; Nemson, J.; Sohlberg, L.; Ruzin, S. E. *Micro Microanalysis* 4, 1999, 491-496.
- (81) Ressner, U. A.; Crumrine, O. A.; Nau, P.; Elias, P. M. *Histochem. J.* 1997, 29, 387-392.
- (82) Schray, C. L.; Metz, A. L.; Gough, A. W. *Histologic* 2002, 35(1), 7-12.
- 30 (83) Rivas L., Sanchez-Cortes S., Garcia-Ramos J. V. and Morcillo G., (2001) *Langmuir*, 17(3), 574-577 (2001).
- (84) Shirtcliffe N., Nickel U. and Schneider S., *J. Colloid Interface Sci.*, 211(1), 122-129 (1999);
- (85) Pastoriza-Santos I., and Liz-Marzan L. M., *Pure Appl. Chem.*, 72(1-2), 83-90 (2000);
- (86) Pastoriza-Santos I., Serra-Rodriguez C. and Liz-Marzan L. M., *J. Colloid Interface Sci.*, 221(2), 236-241 (2000);
- (87) Bright R. Musick M. D. and Natan M. J., *Langmuir*, 14(20), 5695-5701 (1998);

- (88) Ni F. and Cotton T. M., *Anal. Chem.*, 58(14), 3159-5163 (1986).
- (89) Krelbig U., Gartz M. and Hilger A, *Ber. Bunsenges, Phys. Chem.*, 101(11), 1593-1604. (1997).
- (90) Freeman R. G., Grabar K. C., Allison K. J., Bright R. M., Davis J. A., Guthrie A. P., Hommer M. B., Jackson M. A., Smith P. C., Walter D. G. and Natan M. J., *Science*, 267, 1629-1632 (1995).
- 5 (91) Grabar K. C., Freeman R. G., Hommer M. B. and Natan M. J., *Anal. Chem.*, 67, 735-743 (1995).
- (92) Copending PCT International Application No. PCT/US 2005/039498.
- (93) Whittaker, D. M. P. Mingos (1993)., *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 16, 2541-2543.

Reivindicaciones

1. Un sistema para acortar el tiempo necesario para detectar o medir la presencia de una biomolécula en una muestra, comprendiendo el sistema:
  - a) un material metálico;
  - 5 b) una biomolécula en la muestra que es capaz de emitir fluorescencia, en donde la biomolécula se coloca a partir del material metálico a una distancia para mejorar la intensidad de fluorescencia de la biomolécula;
  - c) una cavidad de microondas;
  - d) una fuente de energía de microondas que tiene una frecuencia en un rango entre 0.3 y 10 GHz y un nivel de baja potencia en un rango entre aproximadamente 30 milivatios y 200 vatios; y
  - 10 e) una fuente de energía de excitación que emite en el rango UV a IR.
2. El sistema de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el material metálico comprende plata u oro.
3. El sistema de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el material metálico comprende múltiples partículas metálicas en la forma de islas en un sustrato.
4. El sistema de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el sustrato es vidrio, cuarzo o un material polimérico.
- 15 5. El sistema de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la biomolécula es un fluoróforo intrínseco.
6. El sistema de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la biomolécula se une a un fluoróforo extrínseco.
7. El sistema de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el material metálico se presenta en la forma de una matriz tridimensional, en donde las partículas metálicas están en la superficie del sustrato poroso o las partículas metálicas están incrustadas en el sustrato poroso.
- 20 8. El sistema de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la biomolécula se coloca a partir del material metálico a una distancia de aproximadamente 4 nm a 20 nm.
9. El sistema de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la biomolécula es una proteína o secuencia de nucleótidos.
10. El sistema de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además un espaciador unido al material metálico que se une a la biomolécula para colocar el componente fluorescente de la biomolécula a una distancia predeterminada del material metálico para mejorar la intensidad de fluorescencia de la biomolécula.
- 25 11. Un método de detección del ensayo que comprende:
 

proporcionar un material metálico conductor, en donde el material metálico se forma como una película, partículas, nanoestructuras, isla o coloides;

introducir al menos una biomolécula para disponer cerca del material metálico conductor, en donde la biomolécula es capaz de emitir luz y ser mejorada por una proximidad predeterminada al material metálico;

introducir el material metálico conductor en una cavidad de microondas;

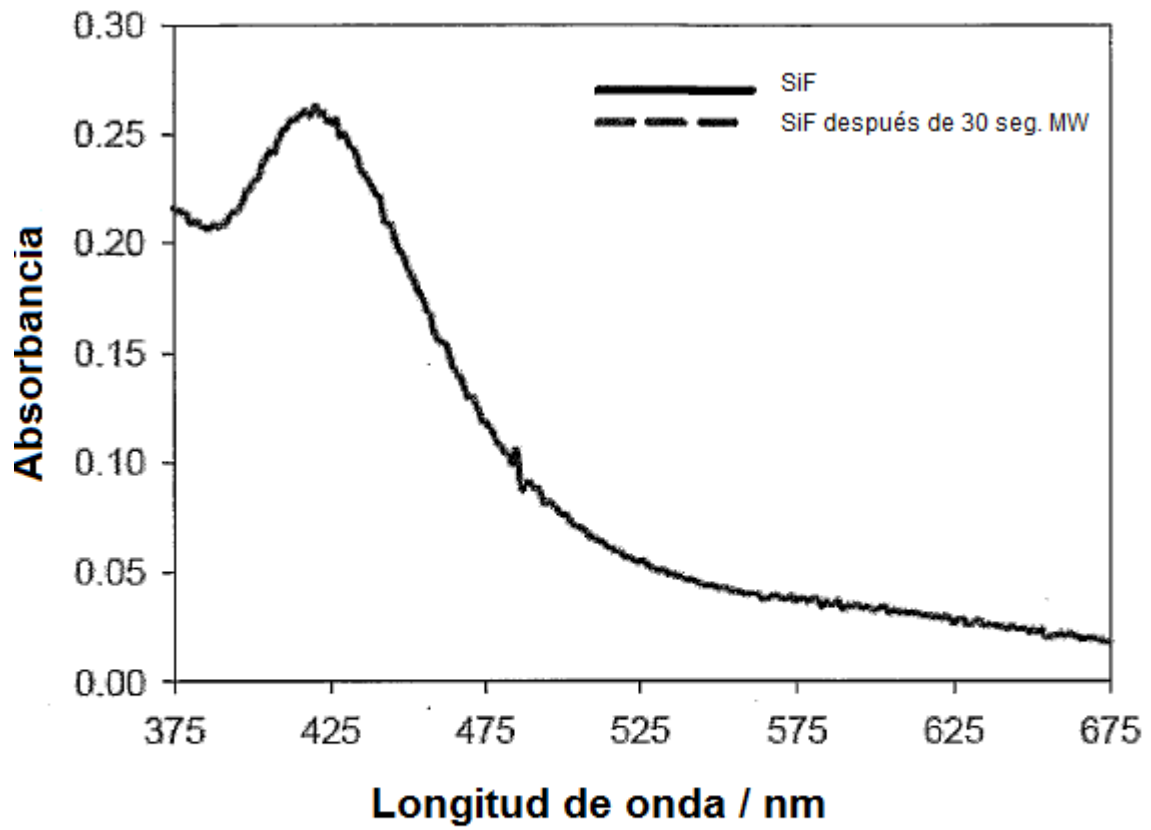
aplicar energía de microondas que tiene una frecuencia en un rango entre 0.3 y 10 GHz y un nivel de baja potencia en un rango entre aproximadamente 30 milivatios y 200 vatios para hacer un aumento de calor en el material metálico, aumentando así, la cinética de las reacciones químicas que implican la biomolécula;

35 aplicar la energía de excitación en el rango IR a UV; y

medir la luz emitida desde el sistema.
12. El ensayo de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el ensayo se selecciona entre el grupo que comprende inmunoensayos, ensayo de hibridación, ensayos de transferencia de energía de resonancia, ensayos basados en polarización/anisotropía, ensayos basados en quimioluminiscencia, ensayos basados en luminiscencia, o ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas.
- 40

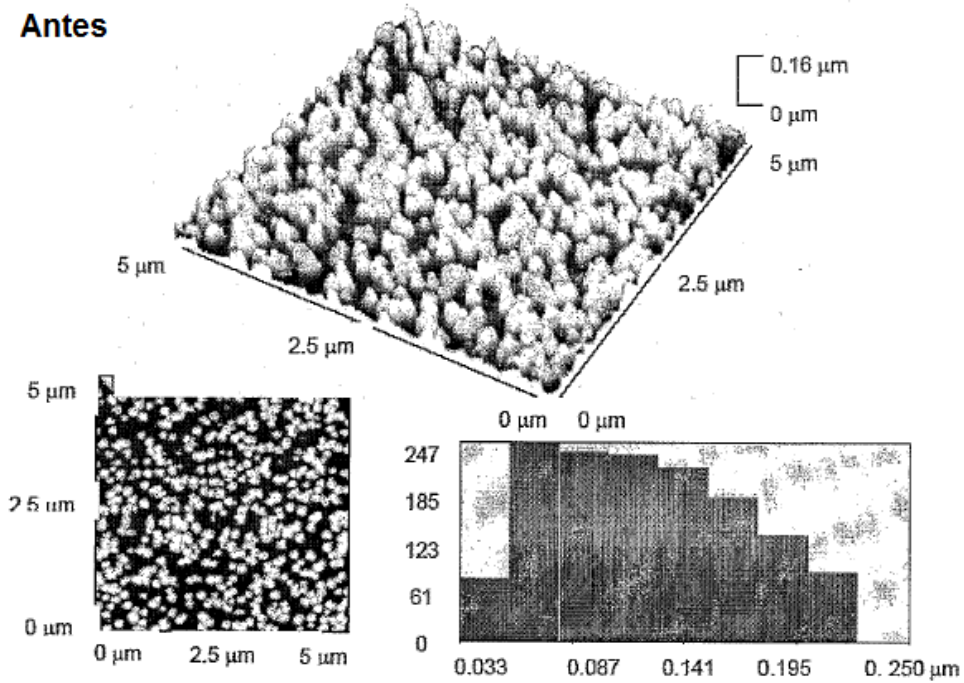
13. Un sistema de detección que comprende:
- un material metálico conductor colocado dentro de un recipiente, en donde el material metálico se forma como una película, partículas, nanoestructuras, isla o coloides;
- 5 al menos una biomolécula para disponer cerca el material metálico conductor, en donde la biomolécula es capaz de emitir luz y ser mejorada por una proximidad predeterminada al material metálico;
- una cavidad de microondas;
- una fuente de energía de microondas que tiene una frecuencia en un rango entre 0.3 y 10 GHz y un nivel de baja potencia en un rango entre aproximadamente 30 milivatios y 200 vatios para hacer un aumento de calor en el material metálico aumentando así, la cinética de reacciones químicas que implican la biomolécula;
- 10 una fuente de radiación para emitir la energía en el rango de UV a IR; y
- un dispositivo de medición para medir la luz emitida desde el sistema.
14. El sistema de detección de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la biomolécula comprende un componente que emite fluorescencia que tiene la capacidad de emitir fluorescencia cuando entra en contacto con la radiación en el rango de UV o IR.
- 15 15. El sistema de detección de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el material metálico comprende plata u oro.
16. El sistema de detección de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el material metálico comprende múltiples partículas metálicas en la forma de islas en un sustrato.
17. El sistema de detección de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el sustrato es de vidrio, cuarzo o un material polimérico.
- 20 18. El sistema de detección de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la biomolécula es un fluoróforo intrínseco.
19. El sistema de detección de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la biomolécula se une a un fluoróforo extrínseco.
20. El sistema de detección de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende además un espaciador unido al material metálico que se une a la biomolécula para colocar un componente fluorescente de la biomolécula a una distancia predeterminada del material metálico para mejorar la intensidad de fluorescencia de la biomolécula.
- 25 21. Un método de detección de fluorescencia mejorada por el metal, que comprende:
- aplicar un material metálico conductor a una superficie utilizada en un sistema de detección, en donde la superficie comprende vidrio, cuarzo o un material polimérico;
- introducir el material metálico conductor aplicado a una superficie en una cavidad de microondas;
- 30 introducir una solución que contiene al menos una biomolécula para disponer cerca la superficie metálica conductora, en donde la biomolécula es capaz de emitir fluorescencia;
- aplicar energía de microondas que tiene una frecuencia en un rango entre 0.3 y 10 GHz y un nivel de baja potencia en un rango entre aproximadamente 100 vatios y 200 vatios para hacer un aumento de calor en la solución, aumentando así, la cinética de las reacciones químicas que ocurren dentro del sistema de detección;
- 35 excitar la biomolécula con una fuente electromagnética para hacer que emita fluorescencia; y
- medir la emisión de fluorescencia en el sistema.
22. El método de acuerdo con la reivindicación 21, en donde el material metálico conductor comprende plata u oro.
23. El método de acuerdo con la reivindicación 21, en donde el material metálico conductor comprende múltiples partículas metálicas en forma de islas en un sustrato.
- 40 24. El método de acuerdo con la reivindicación 21, en donde la biomolécula se coloca a partir del material metálico a una distancia de aproximadamente 4 nm a 20 nm.

25. El método de acuerdo con la reivindicación 21, en donde la biomolécula es una proteína o secuencia de nucleótidos.
26. El método de acuerdo con la reivindicación 21, que comprende además un espaciador unido al material metálico que se une a la biomolécula para colocar un componente fluorescente de la biomolécula a una distancia predeterminada del material metálico para mejorar la intensidad de fluorescencia de la biomolécula.
- 5 27. Un método para detectar un patógeno diana en una muestra, comprendiendo el método:
- a) proporcionar un sistema que comprende:
- un material metálico inmovilizado colocado sobre un sustrato de superficie, en donde el material metálico inmovilizado tiene unido a él una sonda de secuencia de ADN de captura inmovilizada complementaria a una secuencia de ADN conocida del patógeno diana;
- 10 una sonda de secuencia de ADN de captura libre complementaria a una secuencia de ADN conocida del patógeno diana, en donde la sonda de secuencia de ADN de captura libre tiene unida a esta un fluoróforo; y
- una cavidad de microondas y una fuente de energía de microondas;
- b) poner en contacto la muestra con la sonda de secuencia de ADN de captura inmovilizada, en donde la secuencia de ADN del patógeno diana se une a la sonda de la secuencia de ADN de captura inmovilizada;
- 15 c) poner en contacto la secuencia de ADN unida del patógeno diana con la sonda la secuencia de ADN de captura libre, en donde la unión de la sonda de secuencia de ADN de captura libre con la secuencia de ADN del patógeno diana hace que el fluoróforo sea colocado a una distancia suficiente del material metálico inmovilizado para mejorar la emisión de fluorescencia;
- 20 d) irradiar el sistema con energía de microondas que tiene una frecuencia en un rango entre 0.3 y 10 GHz y un nivel de baja potencia en un rango entre aproximadamente 30 milivatios y 200 vatios en una cantidad suficiente para mejorar la unión de la sonda de secuencia de ADN de captura libre con la secuencia de ADN del patógeno diana, causando un aumento en la velocidad de las reacciones; y
- e) irradiar el sistema con energía electromagnética en un rango de radiación UV a IR para aumentar la emisión de fluorescencia por el fluoróforo colocado a una distancia predeterminada del material metálico.
- 25 28. El método de acuerdo con la reivindicación 27, en donde el material metálico conductor comprende partículas metálicas, nanoestructuras, islas, coloides, matriz porosa o una superficie metálica continua.
29. El método de acuerdo con la reivindicación 28, en donde el material metálico es un metal noble.
30. Un método de ensayo utilizando selección de alto rendimiento (HTS), comprendiendo el método:
- proporcionar una placa de pozos utilizada en los sistemas HTS que comprende una multiplicidad de pozos;
- 30 introducir nanoestructuras metálicas en los pozos;
- introducir la placa de pozos en la cavidad de microondas;
- introducir al menos una biomolécula para disponer cerca las nanoestructuras metálicas, en donde la biomolécula es capaz de emitir luz y ser mejorada por una proximidad predeterminada a los nanoestructuras metálicas;
- 35 aplicar energía de microondas que tiene una frecuencia en un rango entre 0.3 y 10 GHz y un nivel de baja potencia en un rango entre aproximadamente 30 milivatios y 200 vatios en la cavidad de microondas para hacer un aumento de calor en el material metálico aumentando así, la cinética de las reacciones químicas que implican la biomolécula;
- irradiar con energía electromagnética en el rango UV a IR; y
- medir la luz emitida desde el sistema.

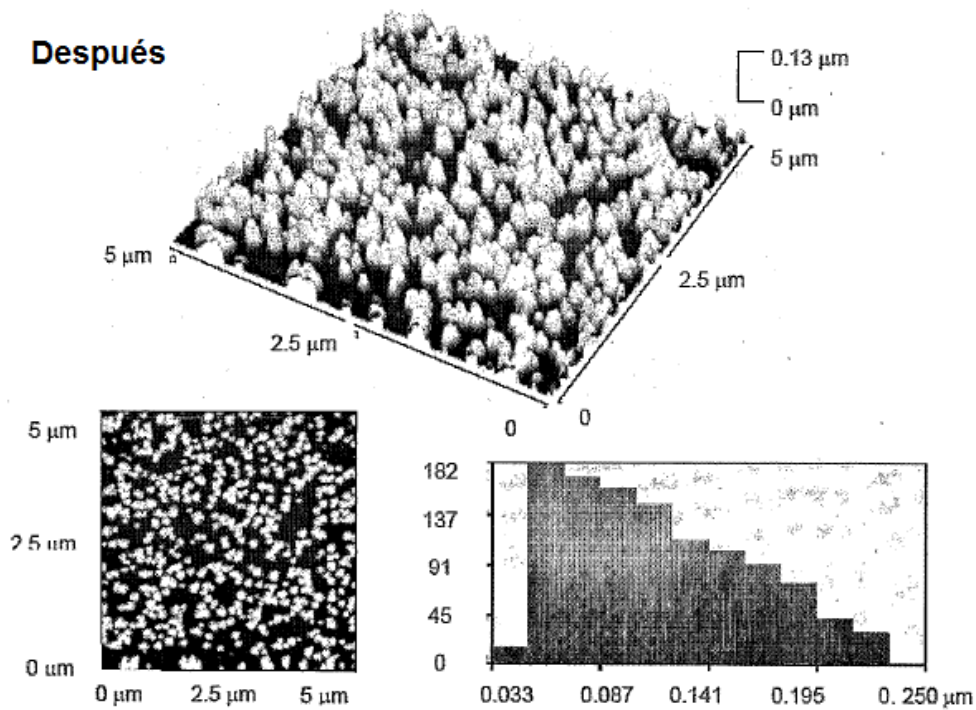


**Figura 1**

**Antes**

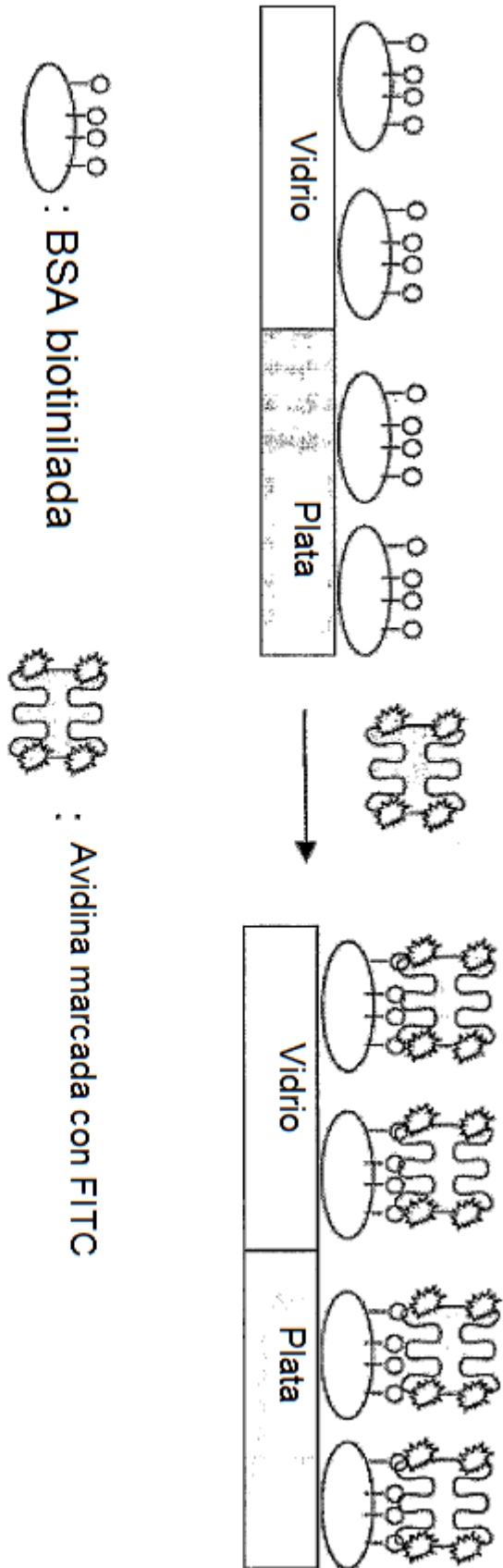


**Después**



**Figura 2**





**Figura 3**

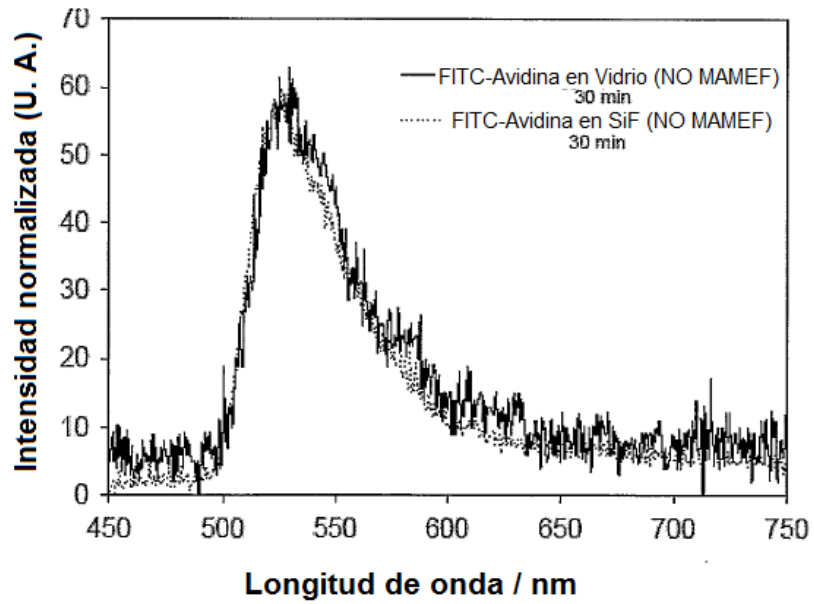
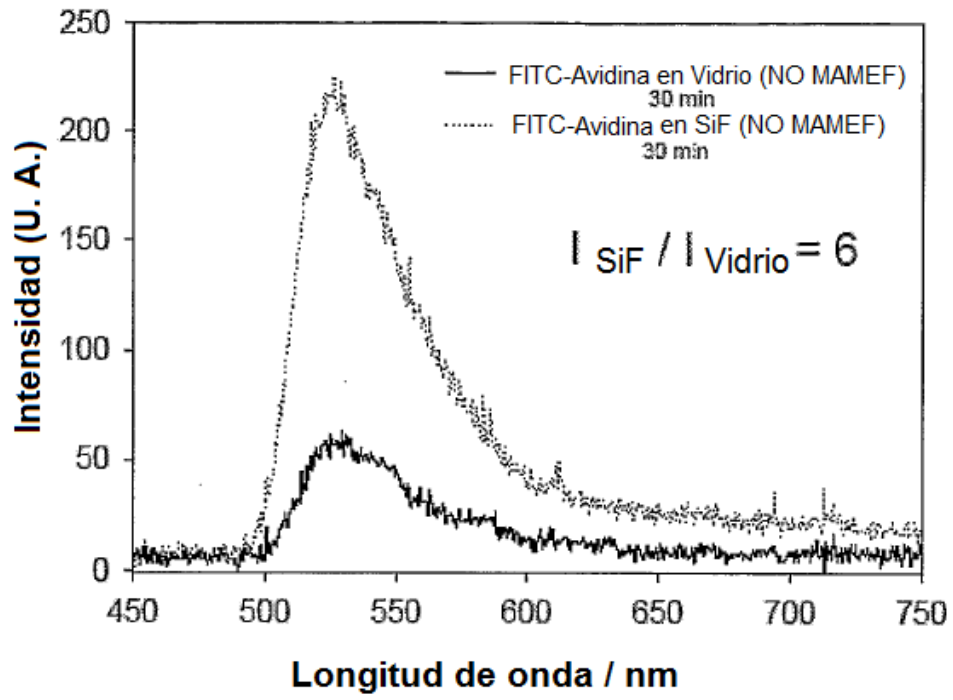
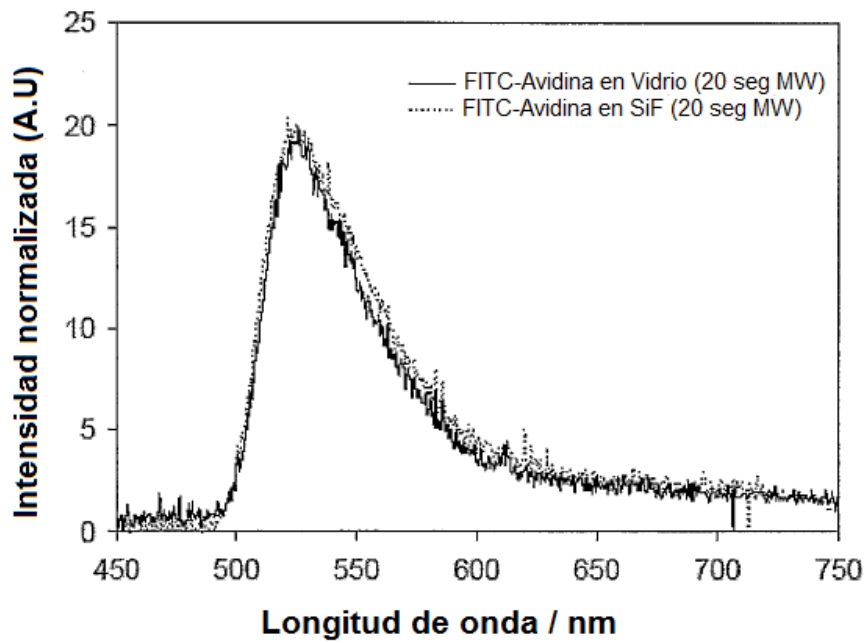
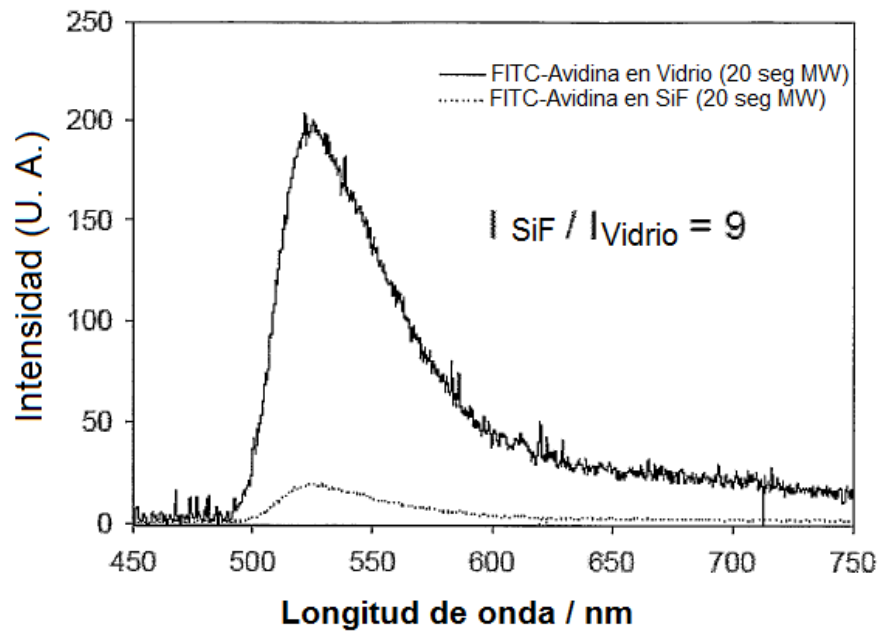
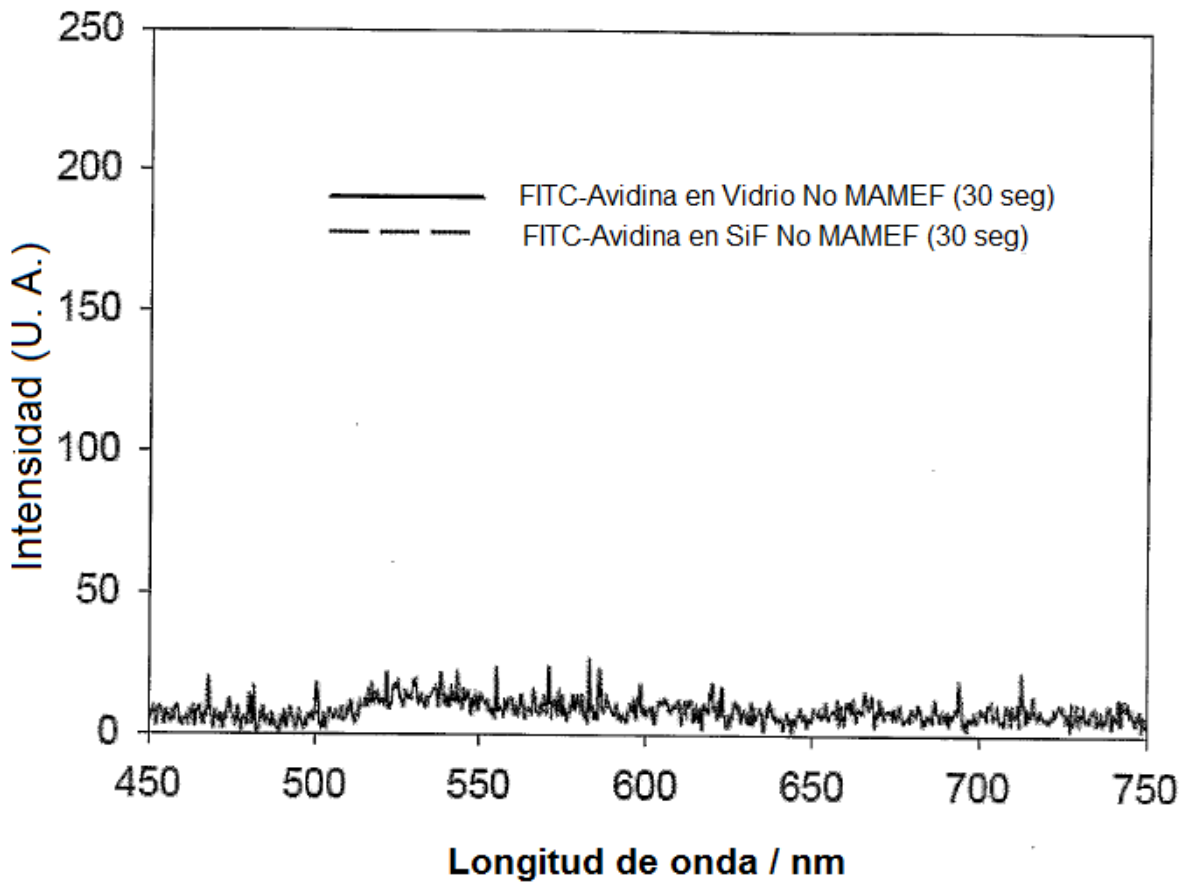


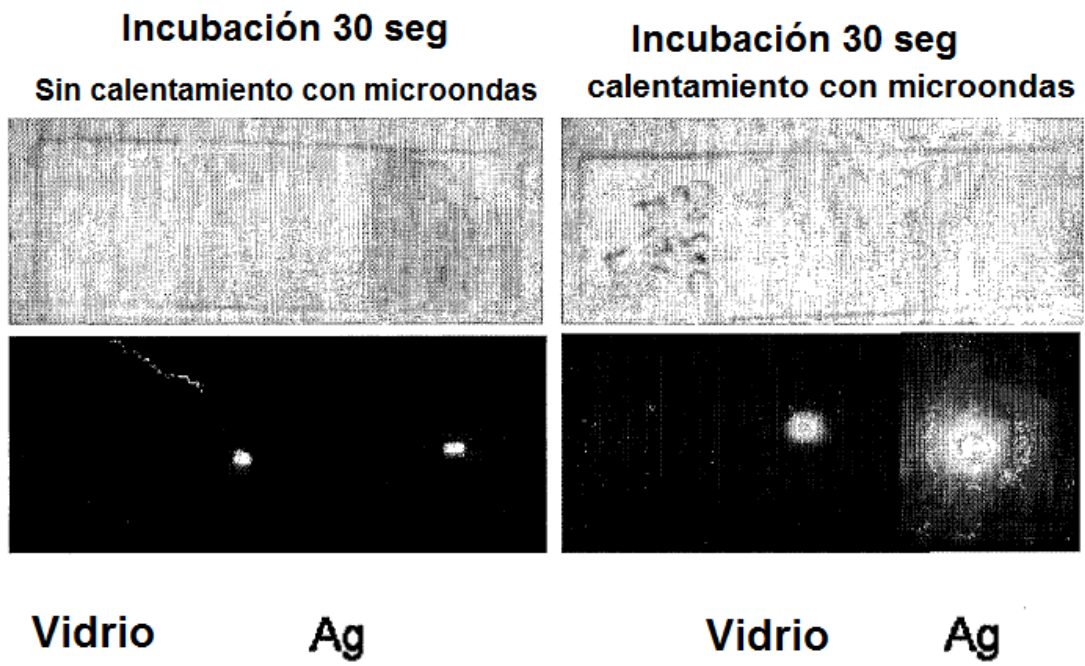
Figura 4



**Figura 5**



**Figura 6**



**Figura 7**

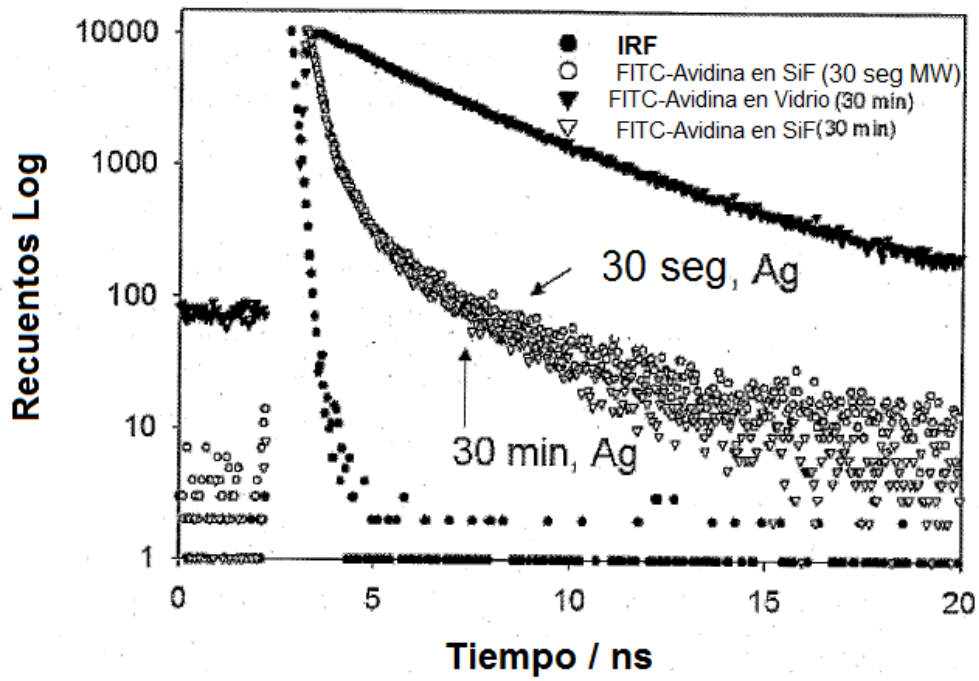
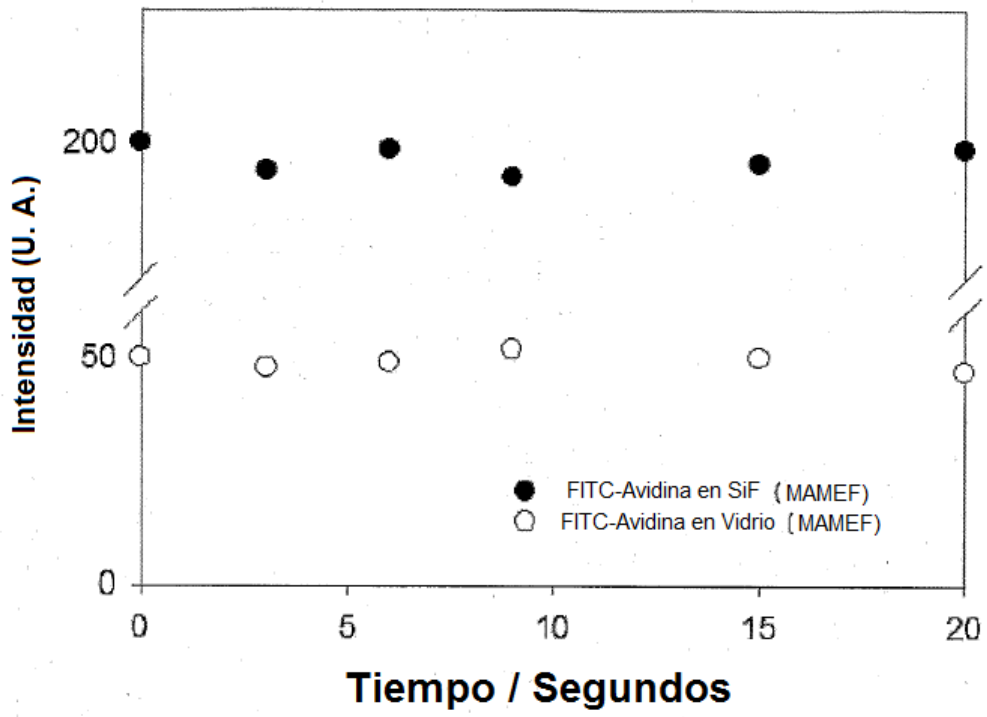
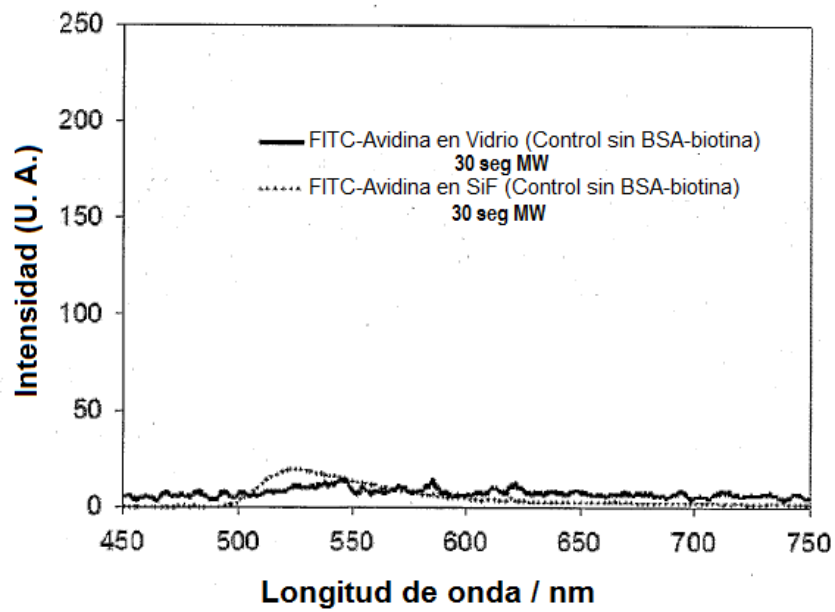
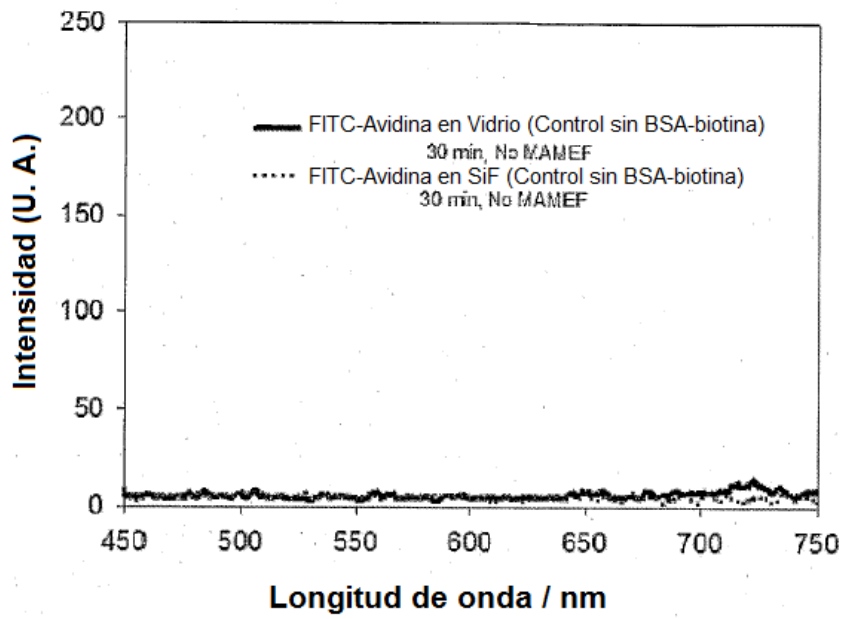


Figura 8

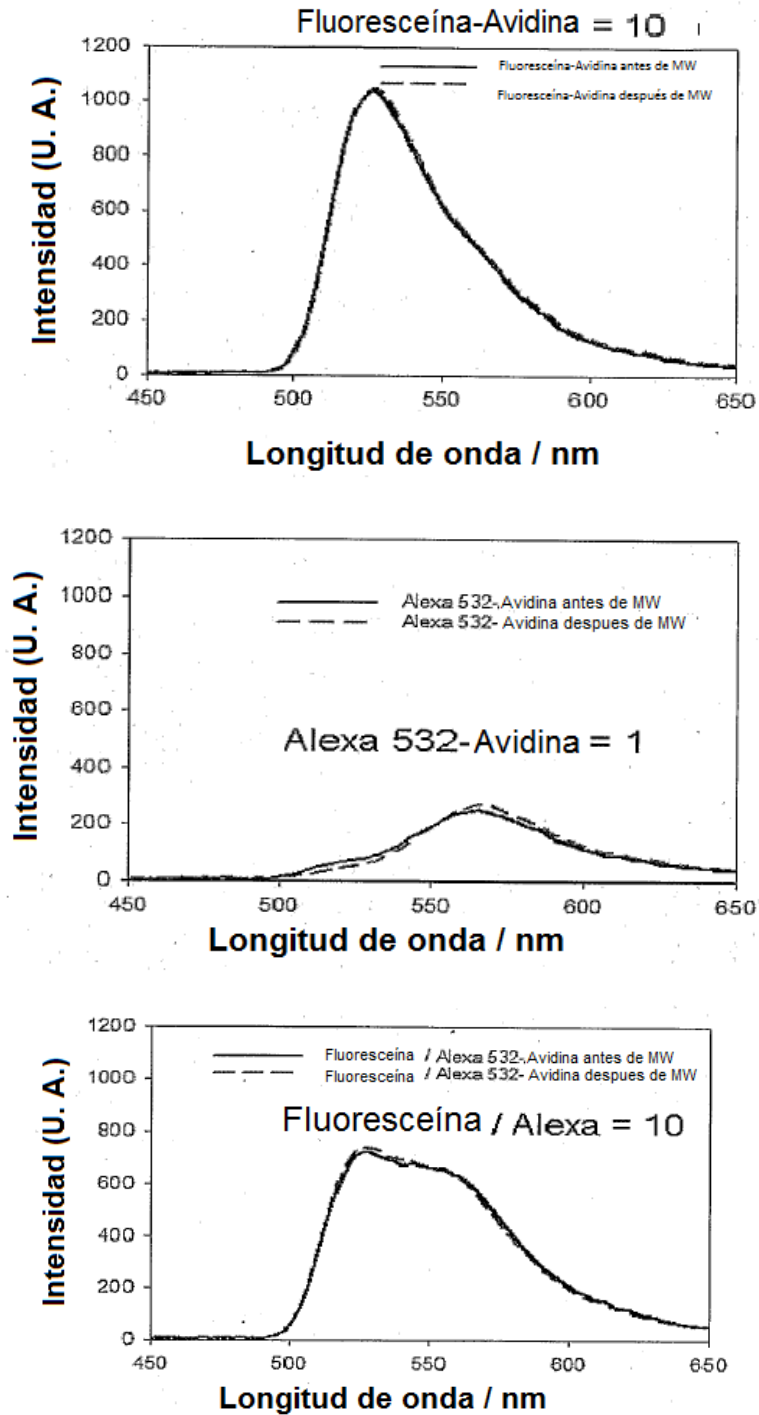


**Figura 9**



**Figura 10**





**Figura 11**

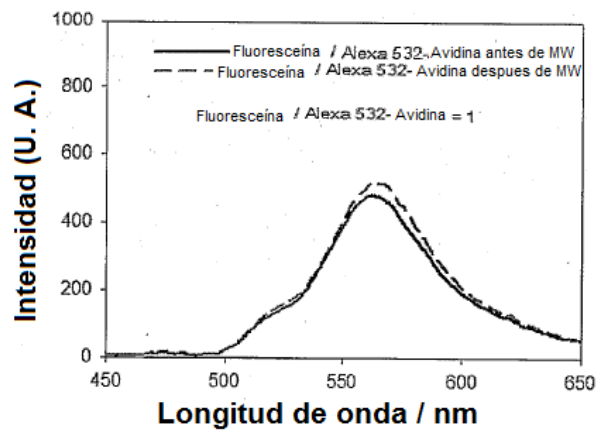
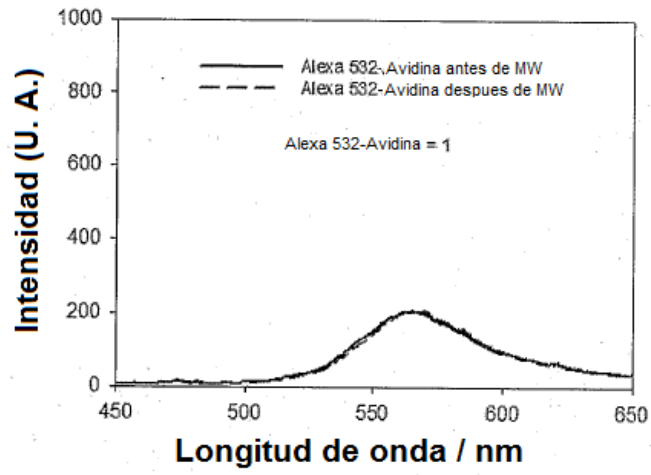
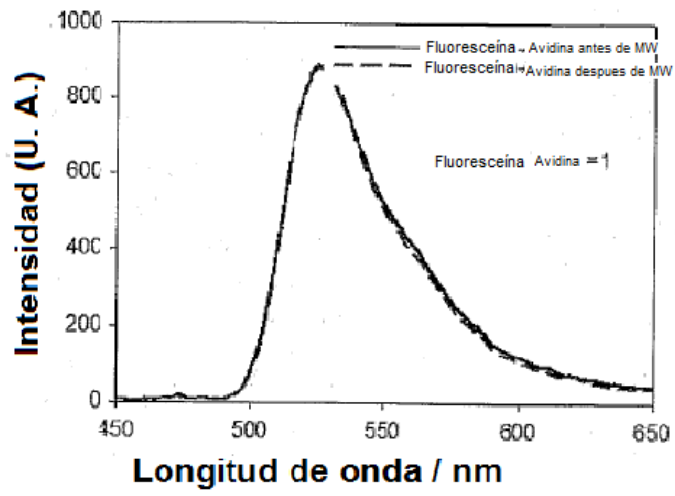


Figura 12

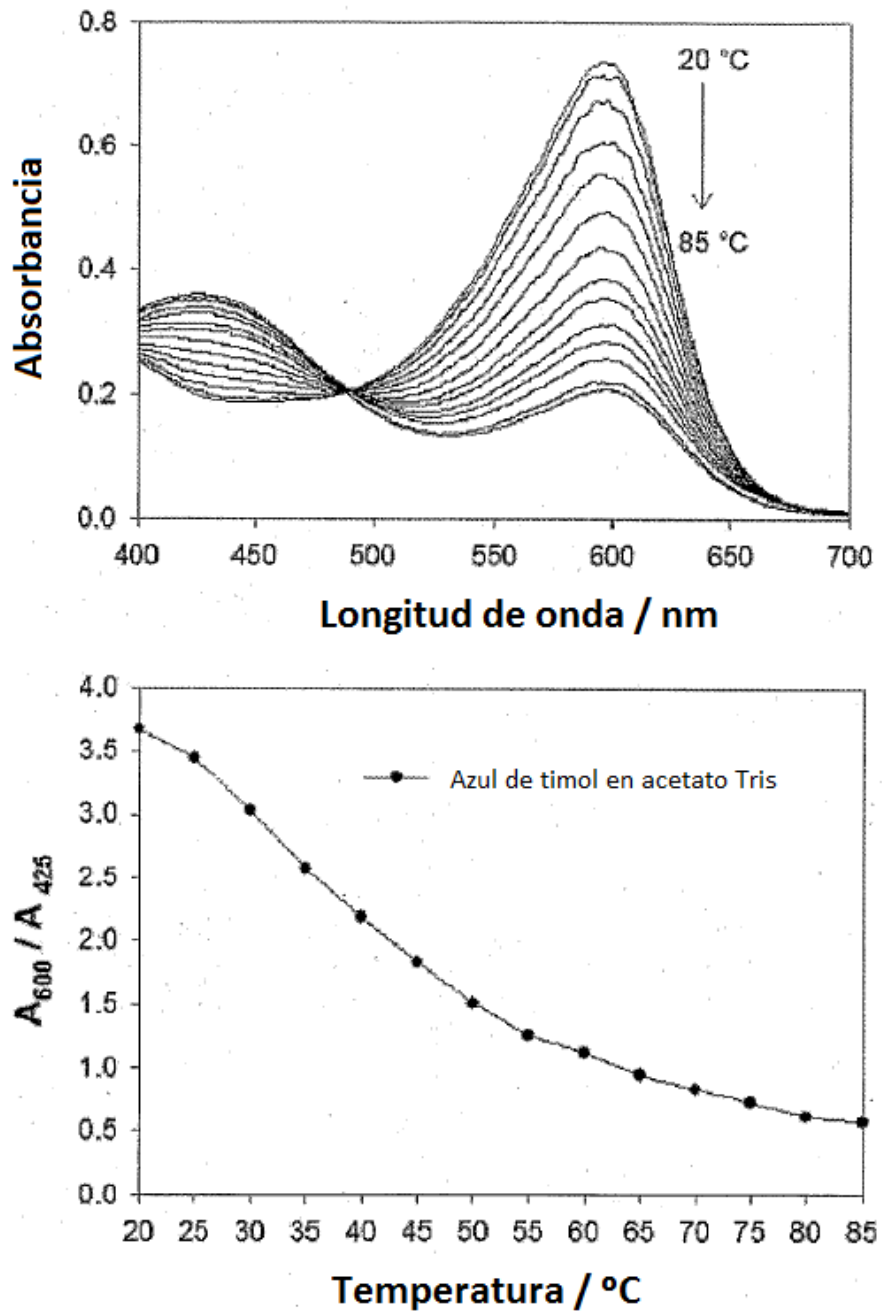
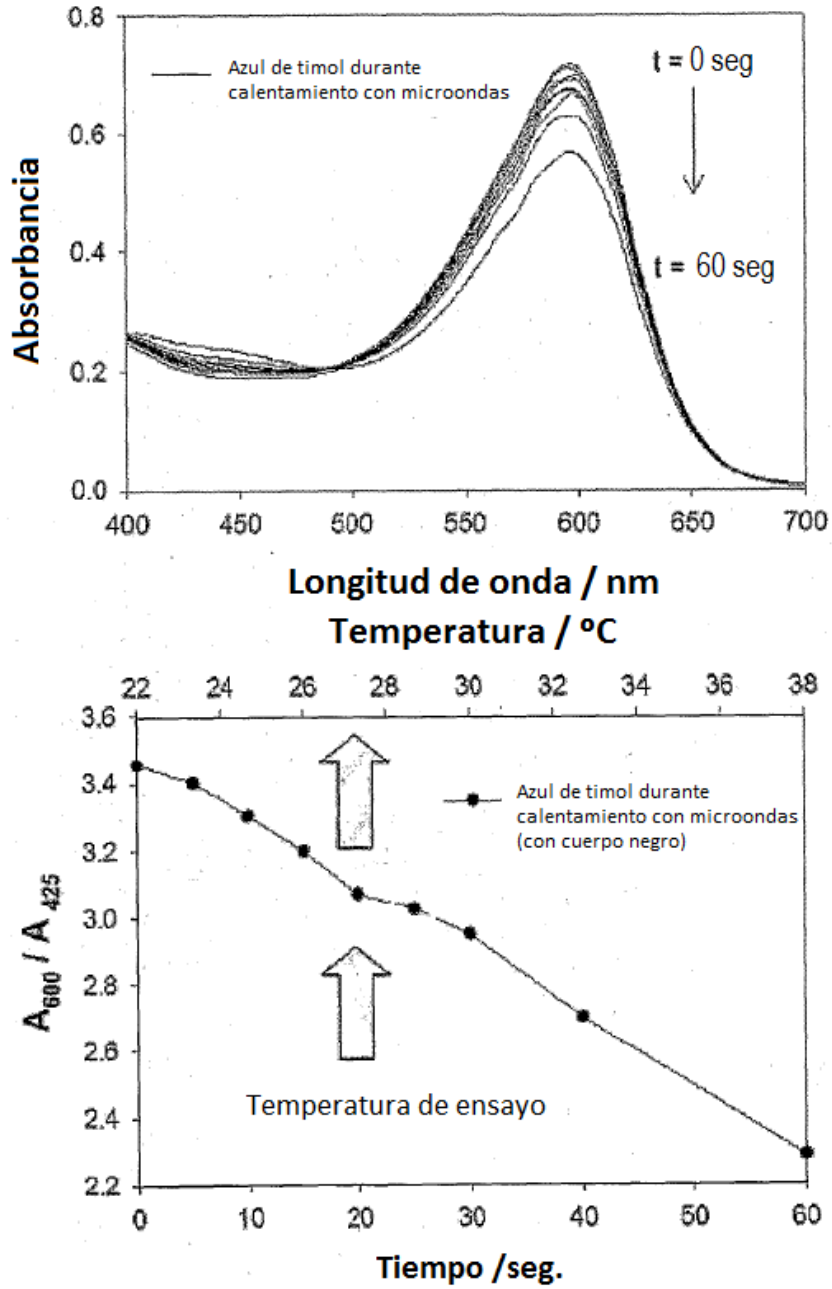
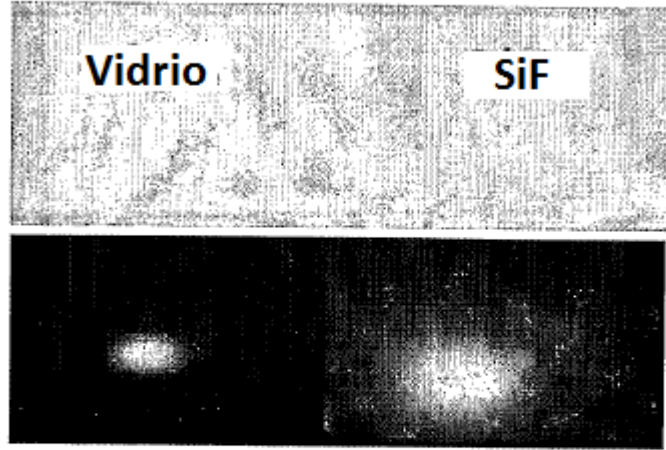


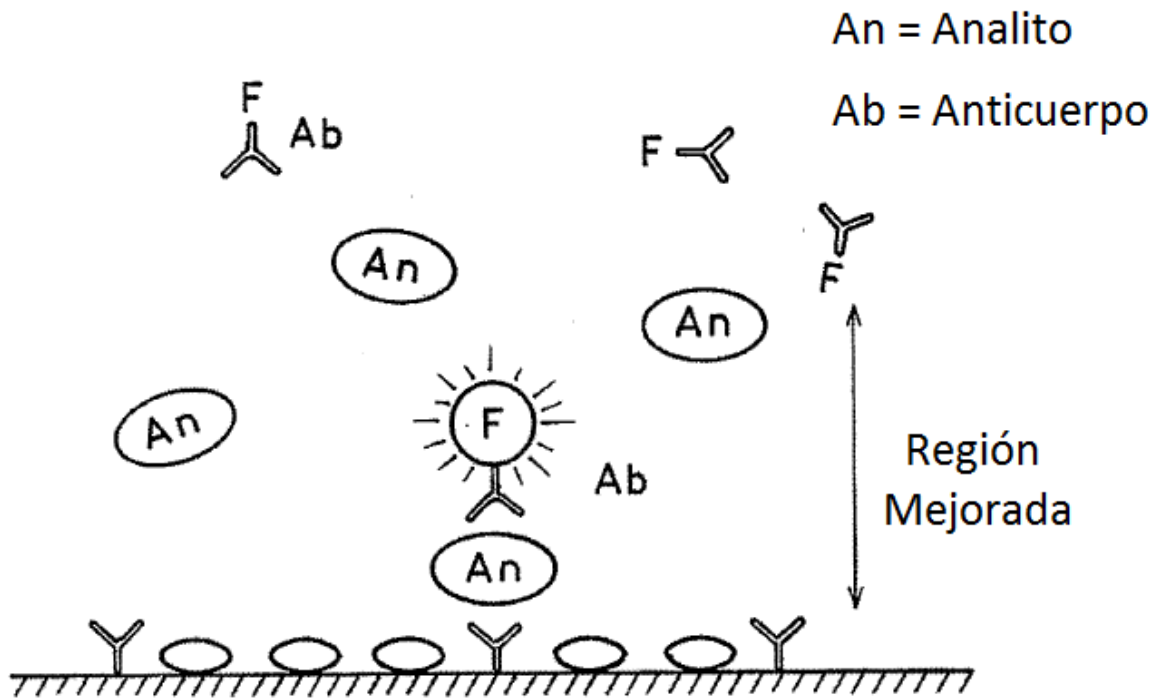
Figura 13



**Figura 14**



**Figura 15**



**Figura 16**

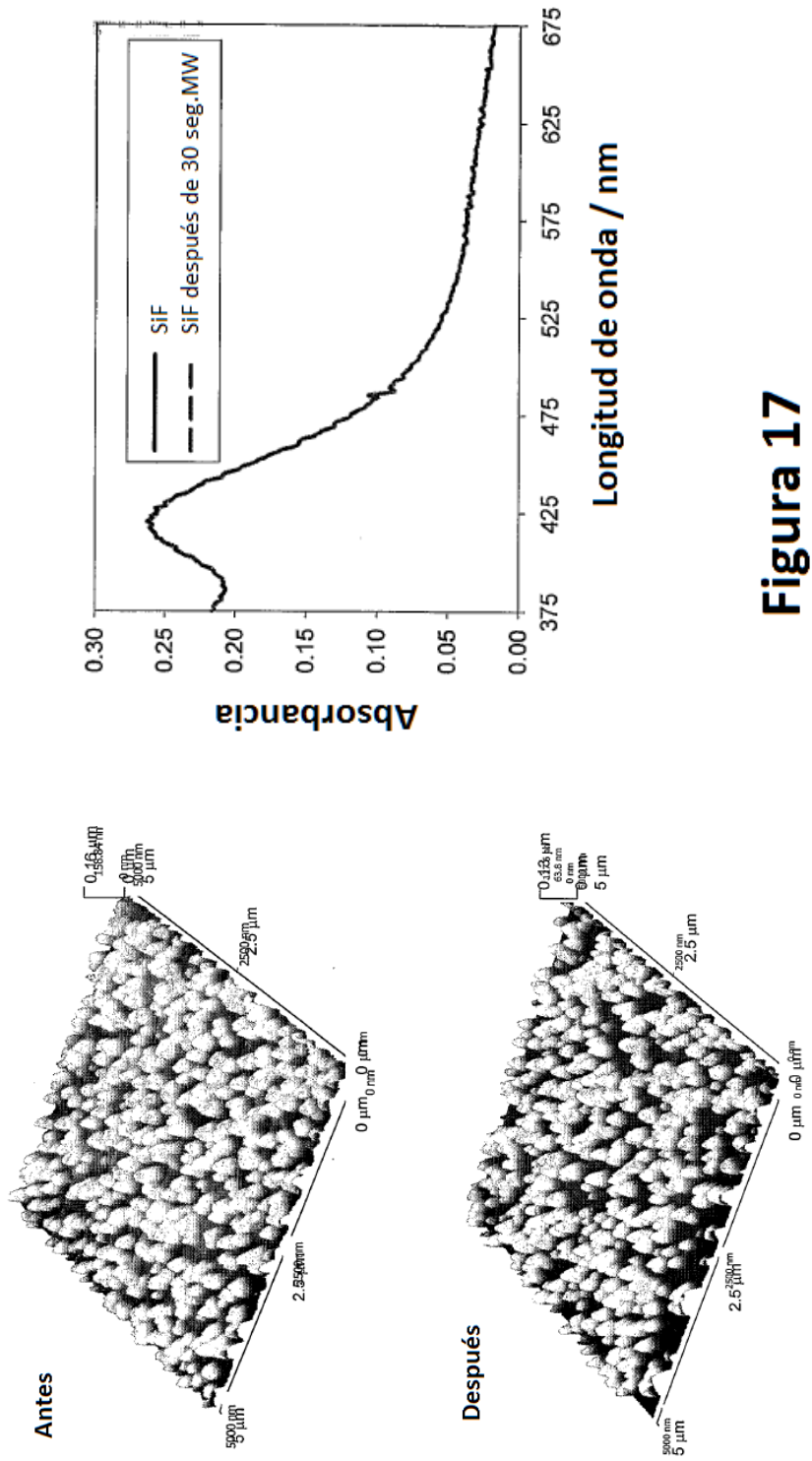
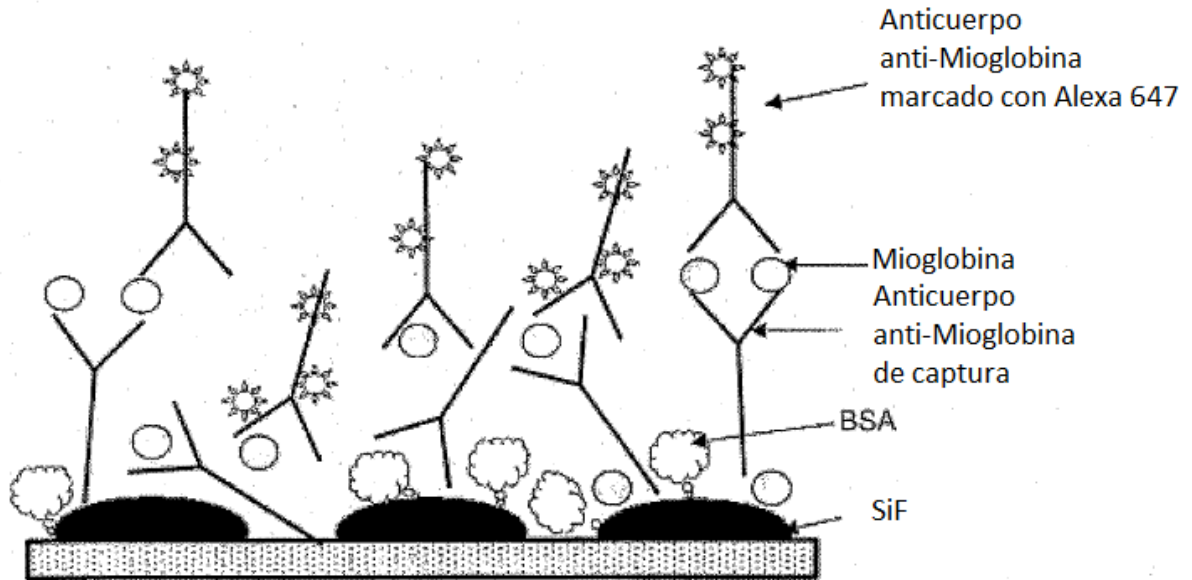


Figura 17



**Figura 18**



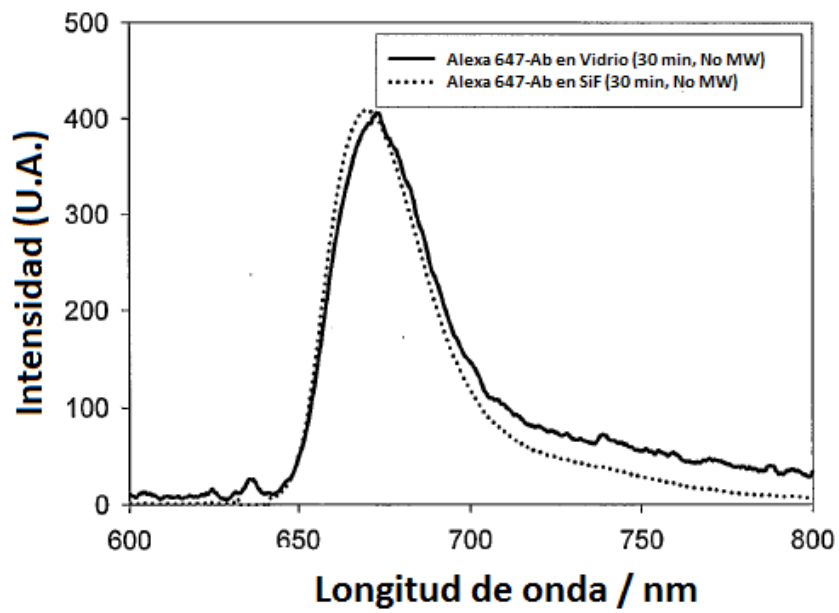
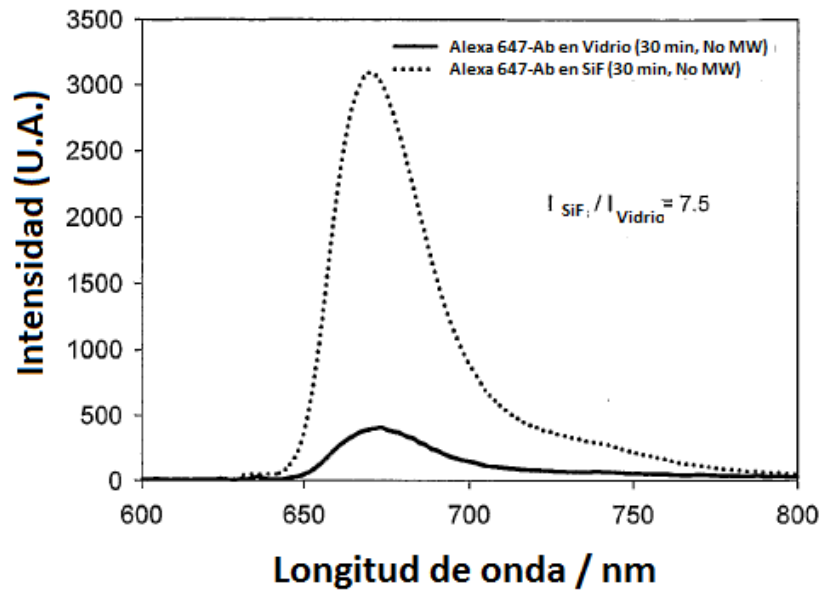


Figura 19A

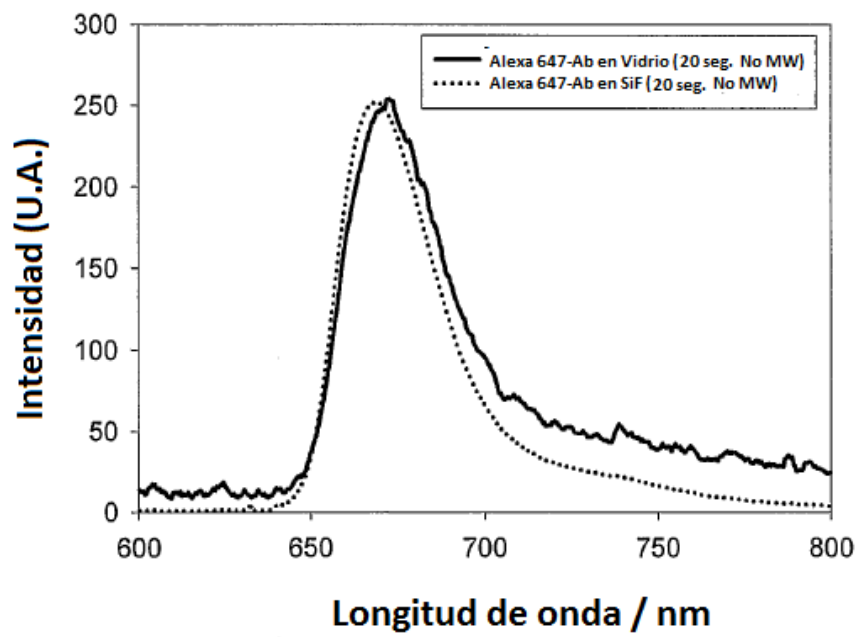
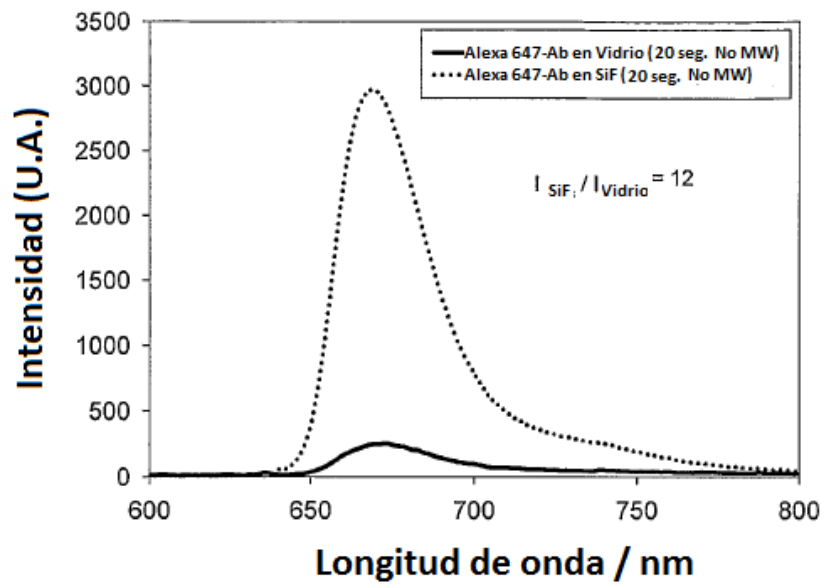
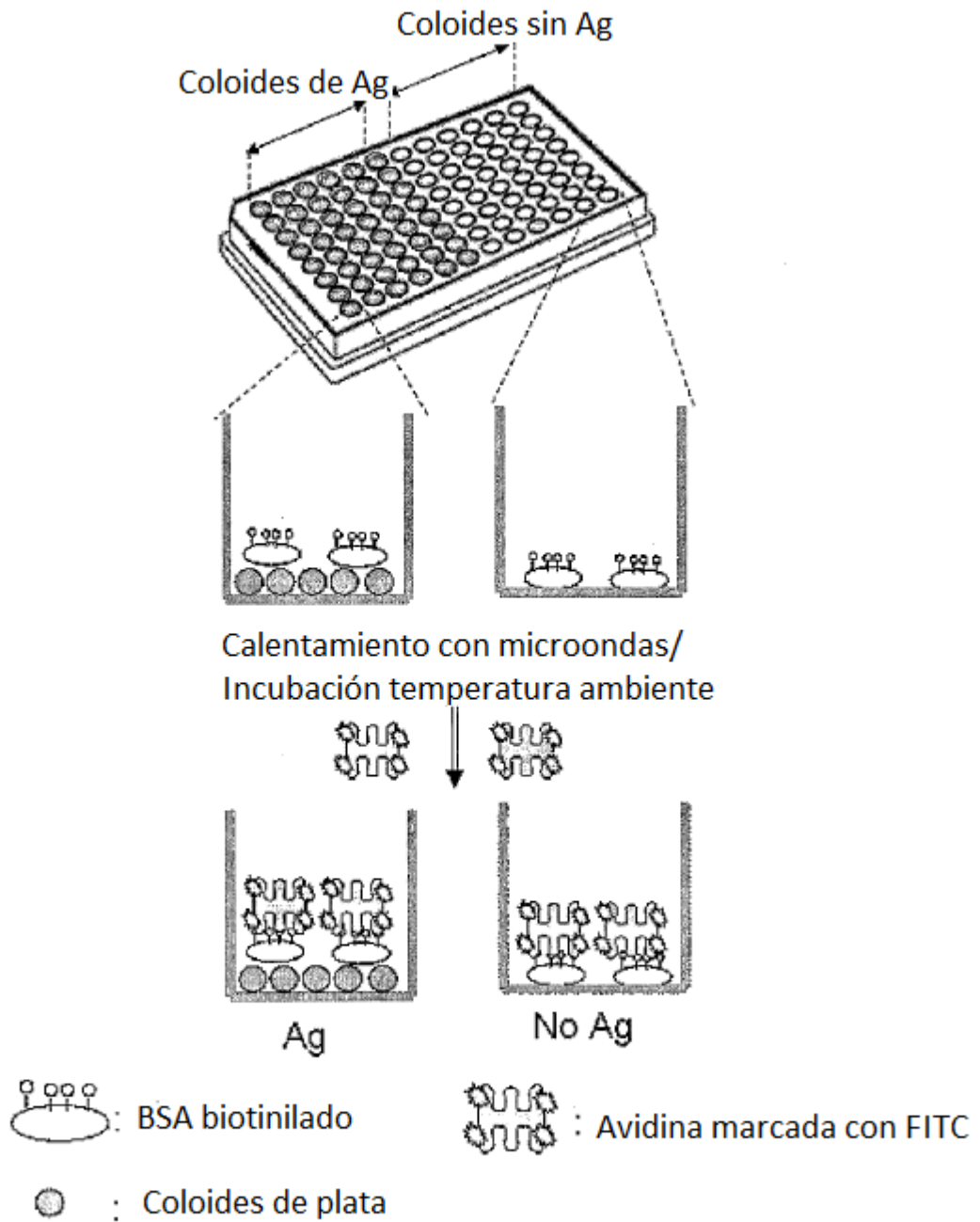
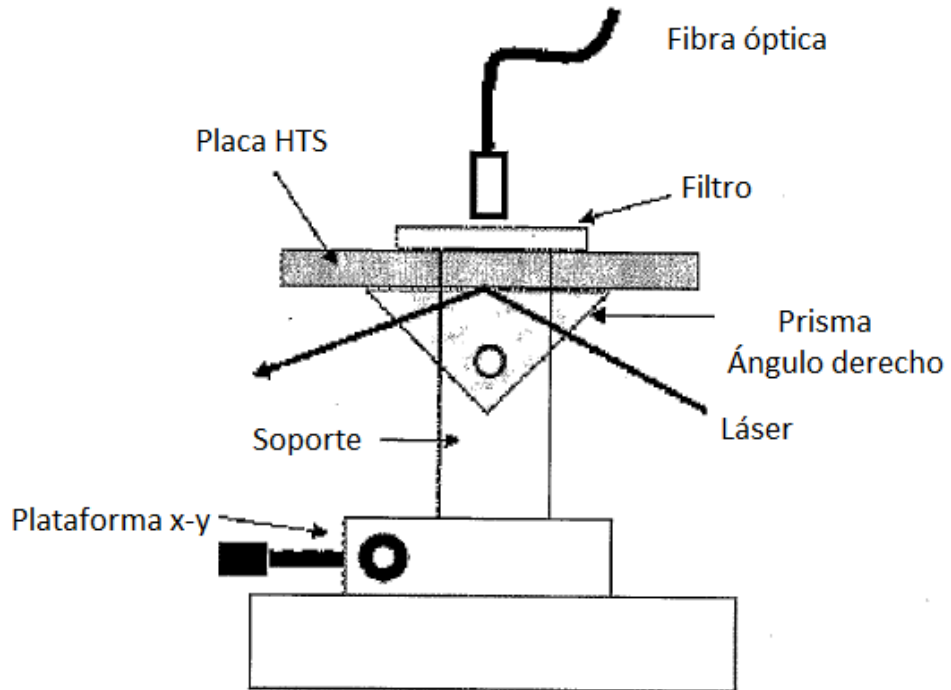


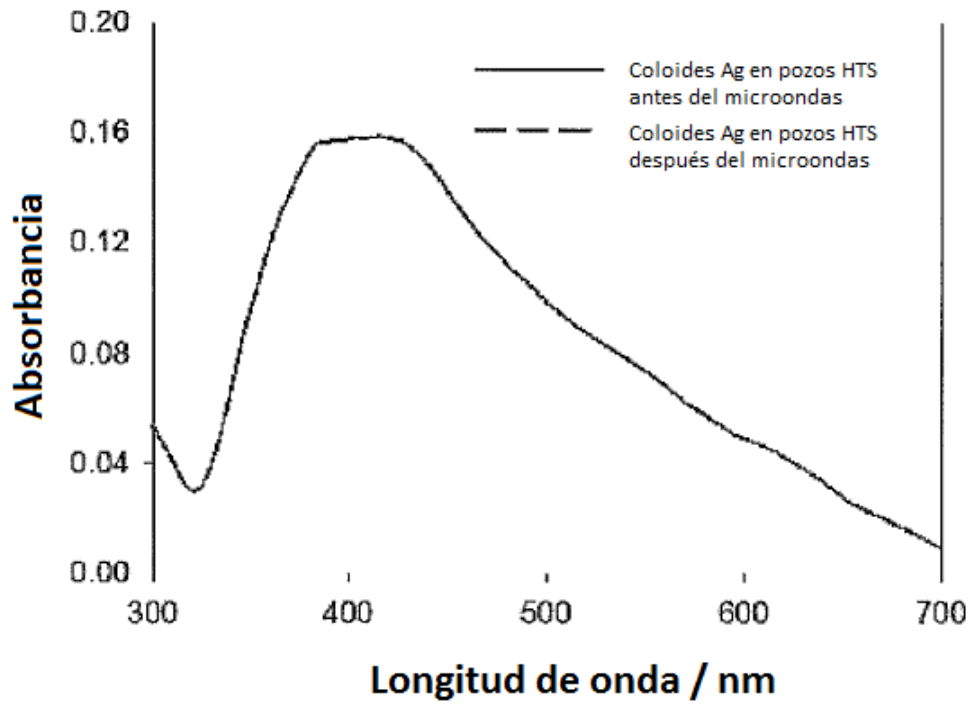
Figura 19B



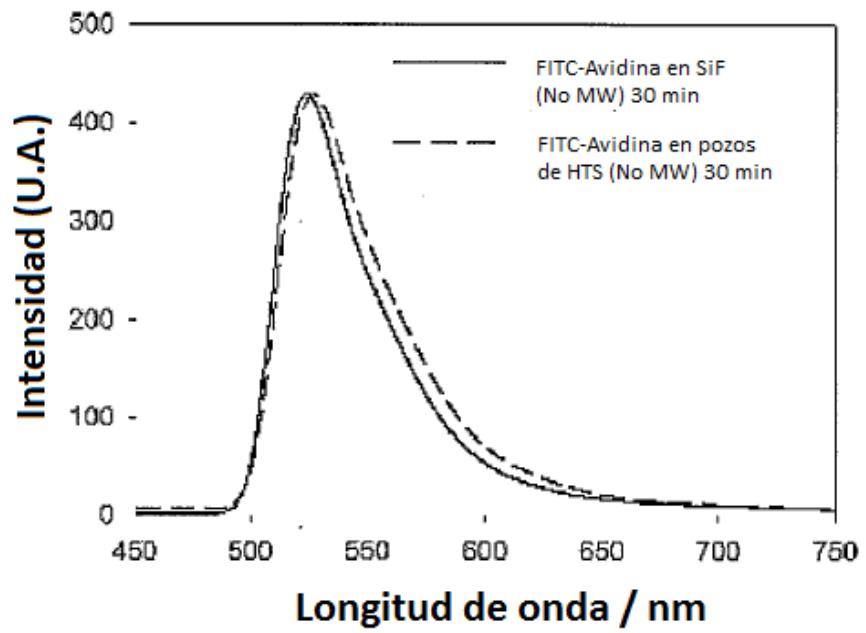
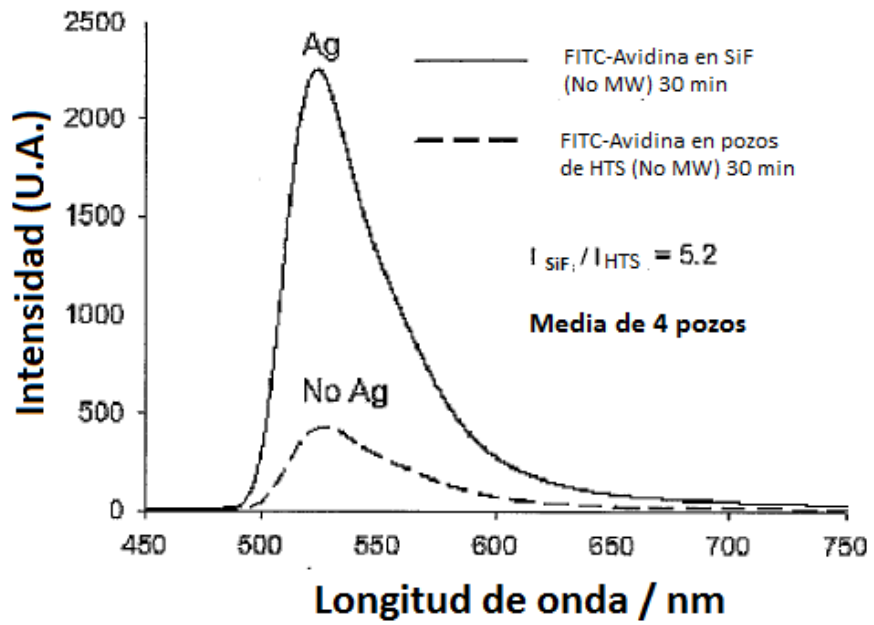
**Figura 20**



**Figura 21**



**Figura 22**



**Figura 23**

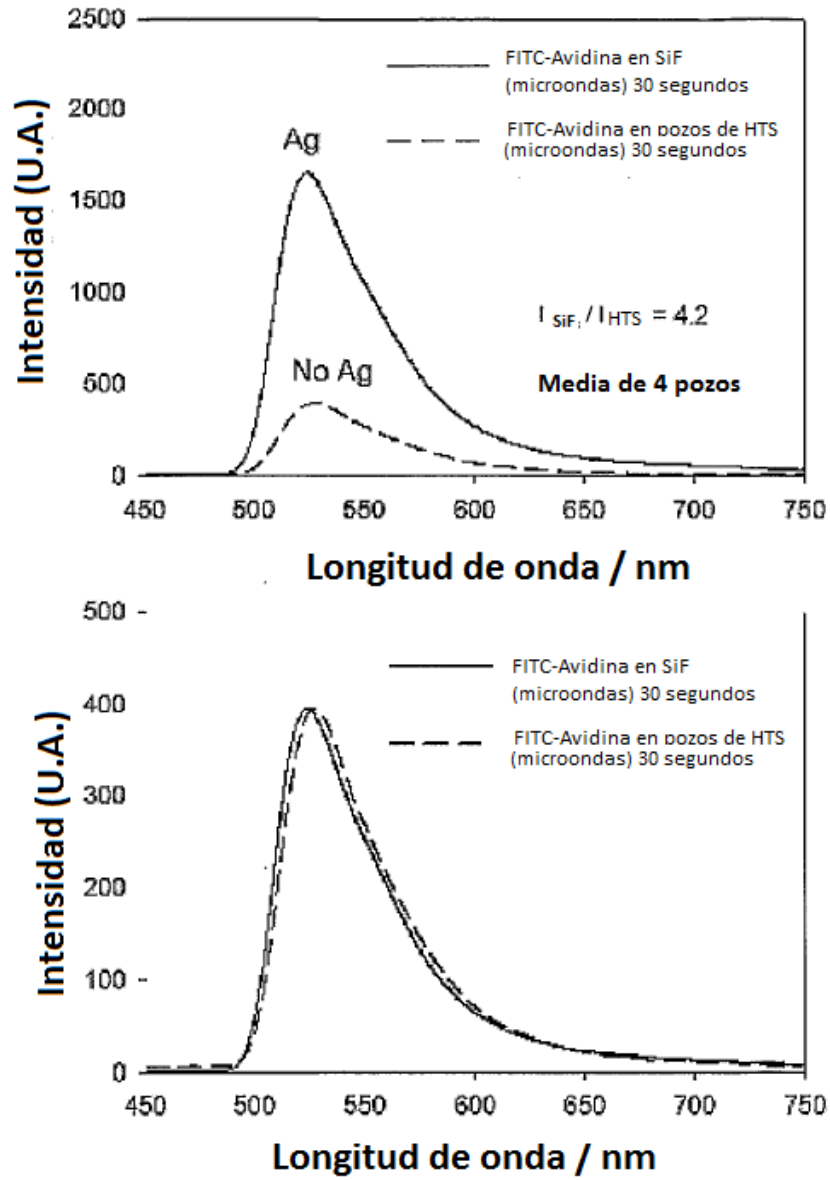
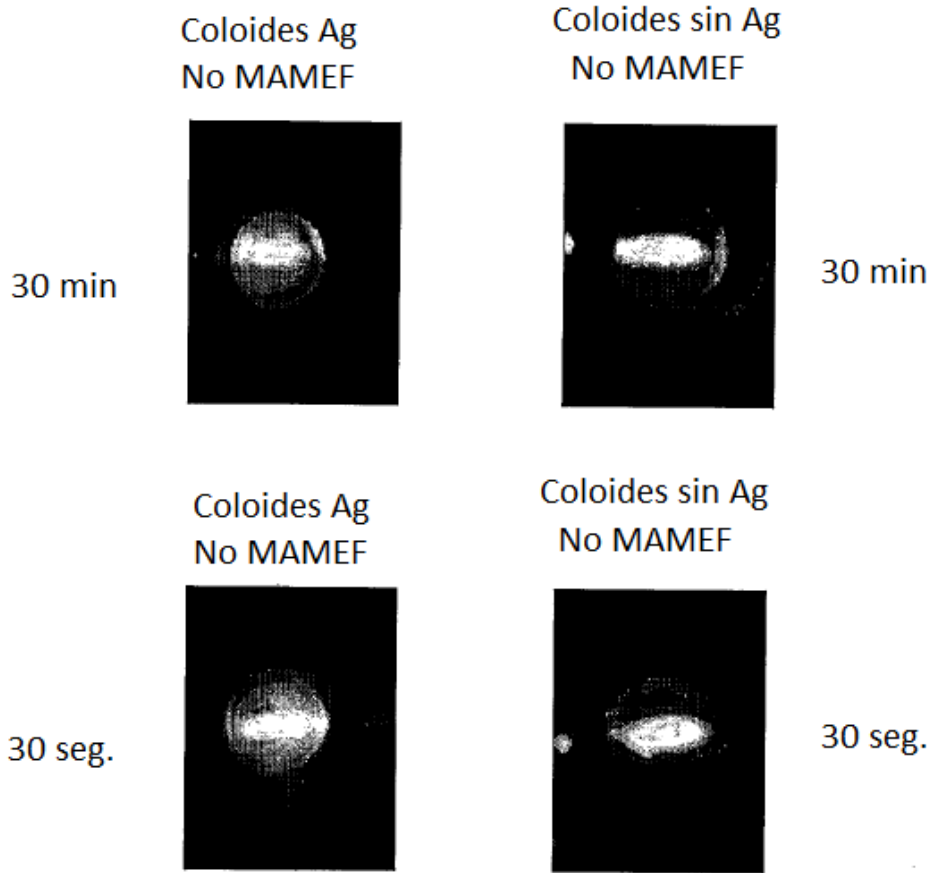
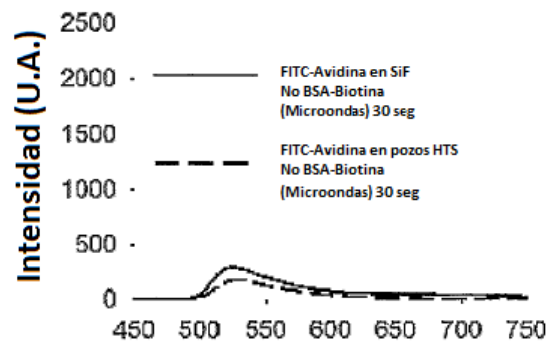
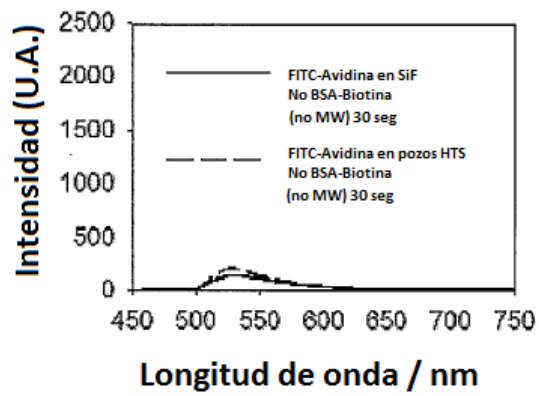
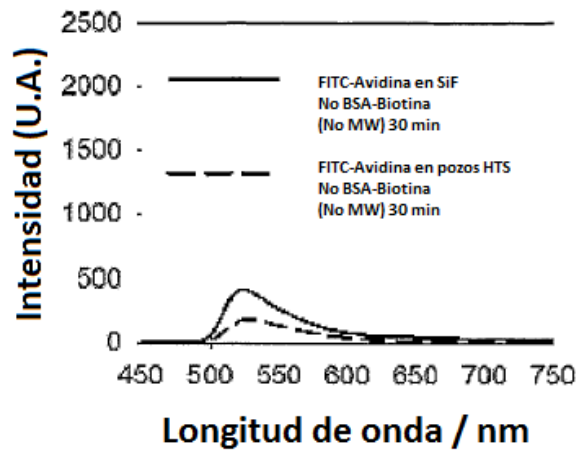


Figura 24



**Figura 25**





**Figura 26**