

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 611 996**

51 Int. Cl.:

G01N 21/17	(2006.01)
G01N 21/64	(2006.01)
G01N 15/02	(2006.01)
G01N 15/14	(2006.01)
B01L 3/00	(2006.01)
G01N 15/00	(2006.01)
G01K 11/12	(2006.01)
B01F 13/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.11.2007 PCT/EP2007/010037**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **29.05.2008 WO08061706**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.11.2007 E 07819870 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2016 EP 2100127**

54 Título: **Caracterización termo-óptica rápida de partículas**

30 Prioridad:

20.11.2006 EP 06024057
22.10.2007 EP 07020650

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.05.2017

73 Titular/es:

NANOTEMPER TECHNOLOGIES GMBH (100.0%)
Flössergasse 4
81369 München, DE

72 Inventor/es:

DUHR, STEFAN y
BAASKE, PHILIPP

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 611 996 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

Caracterización termo-óptica rápida de partículas

La presente invención, que se define por las reivindicaciones adjuntas, se refiere a un procedimiento y un dispositivo para una caracterización termo-óptica rápida de partículas y al uso de tal procedimiento y dispositivo.

5 En particular, la presente invención se refiere a un procedimiento y un dispositivo para medir las interacciones inter y/o intramoleculares de (bio)moléculas o partículas.

10 Sin embargo, cabe señalar que la presente invención no se limita a la medición/caracterización de biomoléculas. Por lo tanto, dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas, también pueden medirse y determinarse las características de otros compuestos/partículas por los medios y procedimientos desvelados en el presente documento, por ejemplo, pueden determinarse y/o medirse eventos cinéticos e interacciones de moléculas. Por consiguiente, también pueden medirse las reacciones químicas (como reacciones inorgánicas u orgánicas) mediante los procedimientos y bajo el uso de los dispositivos de la presente invención. También se prevé determinar formaciones complejas y / o su disociación.

15 En los procedimientos convencionales conocidos en la técnica para la caracterización de biomoléculas totalmente ópticas, las muestras con biomoléculas en soluciones se calientan homogéneamente hasta una cierta temperatura a la vez seguido de calentamiento adicional hasta el siguiente punto de temperatura. Un procedimiento común es comenzar a 20 °C. A continuación, se aumenta la temperatura, por ejemplo, en 1 °C. Después, se requiere un tiempo de espera de aprox. 2 minutos hasta que todo el sistema (cubeta y solución) ha alcanzado la temperatura aplicada. Esto se debe a la gran masa térmica. Sólo entonces se mide la fluorescencia. Este procedimiento se repite hasta 90 °C de una manera gradual. De acuerdo con ello, el calentamiento de todo el volumen de la muestra lleva mucho tiempo y es necesario emplear materiales conductores de calor en contacto con el líquido.

20 Las técnicas de separación conocidas en la técnica, tal como electroforesis en gel están en el núcleo de ADN moderno y de la biotecnología de proteínas. Sin embargo, la electroforesis es difícil de miniaturizar debido a los efectos electroquímicos en la interfaz metal-tampón y la tediosa preparación de la fase en gel.

25 Duhr et al. en *Physical Review Letters*, 97, 038103, 2006, se refiere al "Atrapamiento de moléculas optotérmicas por flujo de fluido opuesto con deriva termófora" y aprovecha el atrapamiento de moléculas optotérmicas, en particular, el atrapamiento de ADN en un único punto en flujos de fluido opuestos en el que uno de los flujos está causado por la gravedad y el otro flujo está causado por el calentamiento del láser en la muestra. La concentración creciente del ADN acumulativo, es decir, "atrapado", en el punto se observa por detección de fluorescencia.

30 Duhr et. al. en *European Phys. J. E* 15, 277, 2004 se refiere a la "termoforesis del ADN determinada por fluorescencia microfluida" y hace uso de fuerzas motrices termófora en dispositivos miniaturizados de biotecnología. Este artículo analiza un enfoque totalmente óptico en microfluidos delgados para medir y aplicar la termoforesis para biomoléculas en pequeños volúmenes. Las temperaturas se miden con alta resolución espacial por la fluorescencia sensible a la temperatura de un colorante fluorescente. Típicamente, una medición de acuerdo con Duhr et al. (2004, loc. cit.) tarda 300 s o incluso más. También se especula en Duhr et al. (2004, loc. cit.), que el movimiento de los polímeros, en particular el ADN, en un gradiente de temperatura es independiente de la longitud de la cadena de la molécula, una suposición acorde con las consideraciones teóricas, véase, por ejemplo, Braun y Libchaber, *Physical Review Letters* 89, 18 (2002). Esta hipótesis limita fuertemente la caracterización termo-óptica de las moléculas basada en la termoforesis, ya que la técnica únicamente dependerá de cambios en el tamaño de las moléculas y no mostrará ninguna sensibilidad a las propiedades superficiales, ya que es la esencia de la presente invención.

35 El procedimiento que se ha mencionado anteriormente tiene la desventaja de que tarda mucho tiempo. Este es también el caso de los procedimientos establecidos para la medición de las interacciones, el tamaño y la estabilidad, como Biacore (GE Healthcare), Evotec FCS-plus (Perkin-Elmer) o LightCycler 480 (Roche Applied Science). La tardanza de estas técnicas es típicamente de más de una hora.

45 Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento y un dispositivo mejorados para una caracterización termo-óptica de partículas o moléculas, en particular para proporcionar un procedimiento muy rápido para medir procesos inducidos térmicamente de partículas o moléculas, en particular de biomoléculas.

Estos objetos se consiguen mediante las características de las reivindicaciones independientes. En las reivindicaciones independientes se caracterizan las realizaciones preferidas adicionales.

50 La presente invención se refiere en particular a un procedimiento y un dispositivo para medir las interacciones inter y/o intramoleculares de las biomoléculas, partículas (por ejemplo, nanopartículas o micropartículas, microesferas, perlas, por ejemplo, microesferas).

55 El procedimiento de la presente invención permite mediciones de contacto libres, termo-ópticas de estos parámetros/características dentro de un lapso de tiempo de unos pocos milisegundos hasta unos pocos segundos, es decir, es posible un análisis muy rápido. En el contexto de la presente invención, una nanopartícula es una

partícula microscópica con al menos una dimensión de menos de 100 nm y una micropartícula/microperla es una partícula/perla que tiene una dimensión característica de menos de 1 mm, pero normalmente más de 100 nm.

En el contexto de esta invención, en particular las reivindicaciones, se observa que los términos "partícula" o "partículas" también se refieren a perlas, particularmente microperlas, nanopartículas o moléculas, particularmente biomoléculas, por ejemplo, ácidos nucleicos (tales como ADN, ARN, LNA, PNA), proteínas y otros biopolímeros, así como células biológicas (por ejemplo, células bacterianas o eucariotas) o fragmentos subcelulares, partículas víricas o virus y orgánulos celulares y similares. El término "partícula modificada" o "perla modificada" se refiere en particular a perlas o partículas que comprenden o están unidas a las moléculas, preferiblemente biomoléculas. Esto también comprende el recubrimiento de dichas perlas o partículas con estas (bio)moléculas.

De acuerdo con un modo de realización ejemplar de la invención, el procedimiento de la invención se basa en la absorbancia de la radiación láser infrarroja por soluciones acuosas y la posterior conversión en calor. De este modo, es posible crear amplias distribuciones de temperatura espaciales, es decir, bidimensionales o tridimensionales (2D, 3D) que comprenden todas las temperaturas deseadas, por ejemplo, entre 0 °C y 100 °C dentro de un área de, por ejemplo, aproximadamente 250 μm de diámetro o longitud, establecidas mediante calentamiento por láser local, por lo que se crean gradientes de temperatura deseados, en particular gradientes de temperatura fuertes. Tanto las distribuciones locales de temperatura como los gradientes de temperatura pueden utilizarse como se describe a continuación para medir parámetros, en particular parámetros biomoleculares. En un modo de realización ejemplar particular, la distribución de la temperatura está en la escala micrométrica. Esto puede ser ventajoso ya que los fuertes gradientes de temperatura acortan el tiempo de equilibrado de las necesidades del sistema a equilibrar (es decir, el tiempo de medición). En realizaciones ejemplares particulares, es ventajoso aumentar la temperatura en una escala de longitud de menos de 100 μm.

La presente invención se refiere a un procedimiento para medir interacciones inter y/o intramoleculares de partículas en una solución, según se define en la reivindicación 1 adjunta, con las etapas de: proporcionar una sonda de muestra con partículas marcadas en una solución; excitar con fluorescencia dichas partículas marcadas y detectar en primer lugar la fluorescencia de dichas partículas excitadas; irradiar un haz de luz láser en la solución para obtener una distribución de temperatura espacial en la solución alrededor del haz de luz láser irradiado (es decir, en y/o cerca del área de la solución que se irradia directamente por el haz de luz láser); detectar en segundo lugar una fluorescencia de las partículas en la solución en un tiempo predeterminado después de que se ha iniciado la irradiación láser en la solución, y caracterizar las interacciones inter y/o intramoleculares de las partículas en base a dichas dos detecciones, donde la irradiación del láser y la detección de la fluorescencia se realiza desde el mismo lado con respecto a la sonda de muestra.

Además, para partículas mayores de 100 nm, el movimiento de tales partículas puede ser detectado por el seguimiento de partículas individuales.

La caracterización termo-óptica de acuerdo con esta invención permite determinar las propiedades de las moléculas o partículas en soluciones, en particular en soluciones acuosas. También permite discriminar entre diferentes conformaciones de una especie de partículas o moléculas y también permite discriminar entre diferentes especies de partículas o moléculas diferentes. La caracterización se puede utilizar en todos los casos en los que las partículas muestran una respuesta a los cambios en el gradiente de temperatura y cambios en la temperatura absoluta. Una característica ventajosa de la presente invención es la presencia de una distribución de temperatura espacial definida. En particular, la distribución de temperatura se genera localmente a escalas de longitud microscópicas por calentamiento local con un láser enfocado. Otra característica ventajosa es que la respuesta de las partículas o moléculas se asigna a un determinado lugar de la distribución de temperatura espacial conocida generada ópticamente. Por consiguiente, la temperatura, el lugar y la respuesta de las partículas están directamente correlacionados.

Además, y en contraste con DUHR (2004; loc. cit.) la presente invención proporciona medios y procedimientos para las mediciones termo-ópticas y/o la caracterización termo-óptica de partículas o moléculas, en particular biomoléculas, mediante las mediciones y/o la detección de diferencias en las propiedades termo-ópticas. Sus propiedades termo-ópticas se originan principalmente a partir de diferencias en la movilidad termófora DT (es decir, la velocidad de las partículas/moléculas en un gradiente de temperatura). En particular, la señal detectada depende de la movilidad termófora $c/c_0 = \exp[-(D_T/D)(T-T_0)]$, con el coeficiente de difusión D , la concentración c y la temperatura T . Una DT independiente de la longitud del polímero como se espera en Duhr (2004; loc. cit.) y otros (por ejemplo, Chan et al., *Journal of Solution Chemistry* 32, 3 (2003); Schimpf et al., *Macromolecules* 20, 1561-1563 (1987)) harán la analítica de biopolímeros como el ADN y las proteínas casi imposible, ya que sólo los cambios en la constante de difusión contribuirían a las propiedades termo-ópticas, que son mínimas en la mayoría de los casos.

La caracterización termo-óptica de acuerdo con esta invención se basa en la creación de fuertes gradientes de temperatura a escalas de longitud microscópicas en solución, en particular en solución acuosa. De este modo, los estados energéticos de las moléculas en la solución se cambian dependiendo de la temperatura y las propiedades de la molécula, es decir, las moléculas experimentan un potencial espacial que se origina a partir de las diferencias espaciales de temperatura. Este potencial impulsa un movimiento dirigido de moléculas a lo largo del gradiente de temperatura, un efecto llamado termoforesis. En otros casos, el cambio de temperatura conduce, además de a la

termoforesis, a un despliegue de biopolímeros, como proteínas o ADN. El efecto de despliegue se observa a altas temperaturas y es una medida para la estabilidad de las moléculas (la razón del despliegue es la influencia aumentada de la componente de entropía de la energía), el efecto se separa de la termoforesis por una escala de tiempo característica. El análisis de estabilidad tiene lugar en milisegundos a un segundo, preferiblemente de aproximadamente 1 ms a 250 ms, de 1 ms a 200 ms, de 1 ms a 100 ms, de 1 ms a 80 ms, de 1 ms a 50 ms, más preferiblemente aproximadamente 40 ms, 80 ms-180ms, 80 ms-150 ms, mucho más preferiblemente de aproximadamente 50 ms.

La termoforesis se observa a veces en un intervalo de aproximadamente 0,5 segundos a 250 segundos, preferiblemente de 0,5 segundos a 50 segundos, preferiblemente de 1 segundo a 250 segundos, de preferiblemente 1 segundo a 50 segundos, preferiblemente de 1 segundo a 40 segundos, preferiblemente de 5 segundos a 20 segundos, preferiblemente de 5 segundos a 40 segundos, preferiblemente de 5 segundos a 50 segundos, preferiblemente de 5 segundos a aproximadamente 80 segundos, más preferiblemente de 5 segundos a 100 segundos. La termoforesis es un procedimiento que es sensible a las propiedades superficiales de las moléculas en una solución. No es necesario exponer las moléculas a una matriz diferente (como en la cromatografía) o interactuar con las moléculas físicamente de ninguna manera (por ejemplo, por contacto directo o añadiendo sustancias). Sólo son necesarias las interacciones entre las ondas electromagnéticas y la materia. La radiación infrarroja se utiliza para el calentamiento espacial (es decir, la manipulación de la materia) y la fluorescencia para detectar moléculas.

La esencia de la caracterización termo-óptica basada en la termoforesis, tal como se proporciona en el presente documento, es que las diferencias en la movilidad termófora (es decir, la velocidad de las moléculas en un gradiente de temperatura), y el radio hidrodinámico pueden detectarse analizando la distribución espacial de la concentración (es decir, por la distribución espacial de, por ejemplo, la fluorescencia) o las fluctuaciones de partículas aisladas atrapadas en el perfil de temperatura espacial. Este ejemplo es de particular relevancia para la trampa termo-óptica descrita en el presente documento para atrapar partículas, moléculas, perlas, componentes celulares, vesículas, liposomas, células y similares. Mientras que el radio hidrodinámico sólo está relacionado con el radio de una molécula, la movilidad termófora es sensible a la carga, las propiedades superficiales (por ejemplo, los grupos químicos en la superficie), la forma de una molécula (es decir, el tamaño de la superficie), la conformación de una proteína o la interacción entre biomoléculas o biomoléculas y partículas/nanocristales/microperlas. Esto significa que si se cambia cualquiera de las propiedades mencionadas, las moléculas experimentarán un potencial termodinámico diferente, dando como resultado diferencias en la movilidad termófora (es decir, cambio en el perfil de concentración espacial o amplitud de fluctuación de las partículas atrapadas).

Por lo tanto, las realizaciones ejemplares de la presente invención se refieren a procedimientos inducidos térmicamente, por ejemplo, un movimiento dirigido inducido por gradiente de temperatura o desnaturalización térmica.

La caracterización termo-óptica que se ha mencionado anteriormente proporciona los medios para el análisis termo-óptico rápido de partículas y/o moléculas, en particular para la caracterización termo-óptica de biomoléculas, como moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, ADN, ARN, PNA) o proteínas y péptidos. Esta caracterización comprende, entre otros, interacciones proteína-proteína, plegado/desplegado de proteínas o péptidos, interacciones intramoleculares, interacciones intermoleculares, la determinación de interacciones entre partículas o moléculas, y similares. Los procedimientos de la técnica anterior para la detección y cuantificación de interacciones y características moleculares, en particular interacciones y características biomoleculares, tardan mucho tiempo, lo que significa que el tiempo necesario para un análisis es del orden de 30 minutos hasta horas. De acuerdo con la presente invención, una medición típicamente tarda menos de 300 s, menos de 200 s, menos de 100 s o incluso menos de 50 s, lo cual es claramente más rápido que los procedimientos descritos en la técnica anterior. La presente invención puede detectar y cuantificar interacciones y caracterizaciones moleculares, en particular interacciones biomoleculares y/o propiedades bioquímicas/biofísicas de 1 segundo a 50 segundos. El término interacción comprende la interacción entre biomoléculas (por ejemplo, proteína, ADN, ARN, ácidos hialurónicos, etc.), pero también entre (nano)partículas/micro(perlas) (modificadas) y biomoléculas. En este contexto, las partículas, moléculas, biomoléculas, nanopartículas, micropartículas, perlas o microperlas modificadas comprenden partículas, moléculas, biomoléculas, nanopartículas, micropartículas, perlas o microperlas marcadas con fluorescencia. Las partículas, moléculas, biomoléculas, nanopartículas, micropartículas, perlas o microperlas marcadas con fluorescencia pueden ser, por ejemplo, partículas, moléculas, biomoléculas, nanopartículas, micropartículas, perlas o microperlas, a las que se han unido uno o más colorantes fluorescentes, por ejemplo, unidos de forma covalente. Por ejemplo, los colorantes fluorescentes pueden seleccionarse del grupo de 6-carboxi-2',4',5',7',7'-hexaclorofluoresceína (6-HEX SE, C20091, Invitrogen), 6-JOE SE o 6-TET SE (véase también la figura 6 adjunta).

Los términos "marcados" y "etiquetados" se usan como sinónimos en el contexto de esta invención. En el contexto de esta invención, las "partículas marcadas" se refieren a moléculas/partículas marcadas con fluorescencia u otras moléculas/partículas que pueden ser detectadas por medio de fluorescencia, por ejemplo, moléculas/partículas que comprenden un fluoróforo intrínseco, moléculas/partículas que comprenden colorantes intercalantes o partículas/moléculas con fluoróforos unidos.

Un experimento típico de acuerdo con esta invención, pero que no limita el alcance de la invención, para

detectar/cuantificar interacciones puede describirse como se indica a continuación:

Etapa 1a, medición de fondo:

Un tampón de muestra sin moléculas/partículas de muestra marcadas con fluorescencia se carga en una cámara de microfluidos y se mide la fluorescencia, mientras se enciende la fuente de luz de excitación.

5 Etapa 1b, Determinación del nivel de fluorescencia antes del calentamiento láser:

Una solución acuosa de una muestra marcada con fluorescencia (por ejemplo, biomoléculas, partículas, como nanopartículas o micropartículas, perlas, particularmente micropelotas, en las que, en realizaciones particulares, todas tienen una afinidad específica a otras biomoléculas) a una concentración dada se carga en la cámara de microfluidos (preferiblemente un capilar) que proporciona preferiblemente una altura definida de la cámara. La fluorescencia se excita y se registra con (por ejemplo, cámara CCD) o sin (por ejemplo, tubo fotomultiplicador, fotodiodo de avalancha) resolución espacial durante menos de 10 segundos, por ejemplo, en un dispositivo CCD o fotomultiplicador con tiempos de exposición de 25 milisegundos hasta 0,5 segundos. A continuación, la excitación de fluorescencia se desactiva.

Etapa 2, partiendo del calentamiento láser infrarrojo:

15 El láser de calentamiento por infrarrojos se activa y la distribución de temperatura espacial se establece dentro de unos pocos milisegundos en la solución. El gradiente de temperatura se ha calibrado una vez y no es necesario repetir esta calibración cada vez que se realiza un experimento. En particular, una configuración en la que el calentamiento por infrarrojos y la formación de imágenes de fluorescencia se realizan a través del mismo elemento óptico desde un lado es ventajoso para la estabilidad de los focos óptico e infrarrojo.

20 Una disminución del colorante de fluorescencia debido al fotoblanqueo inferior al 5 % es ventajosa en el experimento. En realizaciones particulares de la invención, no es necesaria ninguna corrección para el fotoblanqueo.

En algunas realizaciones particulares para medir las propiedades termóforas, la temperatura máxima está por debajo de la temperatura que se sabe que causa daño a las moléculas en la solución o altera su interacción (por ejemplo, temperaturas entre 1 y 5 °C por encima de la temperatura ambiente).

25 Dependiendo de las propiedades termóforas de las partículas o moléculas en la solución (es decir, si se mueven rápidamente en un gradiente térmico o lento), el láser infrarrojo calienta la solución durante 5 segundos hasta 100 segundos, preferiblemente durante 5 segundos hasta 50 segundos, más preferiblemente durante 5 segundos hasta 20 segundos.

Etapa 3, registro del perfil de fluorescencia espacial (es decir, concentración):

30 Después de este periodo de tiempo, la excitación de fluorescencia se activa y las imágenes se registran con la misma velocidad de fotogramas y longitud que se describe en la etapa 1b. La etapa 3 es la última etapa de adquisición necesaria para la evaluación de propiedades termo-ópticas.

35 Para la detección y cuantificación de interacciones son necesarias más mediciones siguiendo el protocolo que se ha descrito anteriormente. La etapa 1a se repite con un tampón de muestra y en la etapa 1b la solución acuosa de una muestra marcada con fluorescencia se mezcla con una cantidad de la biomolécula con la que se debe detectar o cuantificar la interacción. Por ejemplo, en la detección de una interacción de partículas y/o moléculas, la muestra marcada con fluorescencia (que comprende una pareja de unión) se mezcla con una cantidad suficiente de la segunda pareja de unión de manera que una cantidad sustancial de la molécula o partícula marcada con fluorescencia esté en el complejo con la pareja de unión. Si la fuerza de la interacción se cuantificará en cuanto a, por ejemplo, una disociación o asociación constante (K_a , K_d), que el procedimiento descrito anteriormente puede realizarse con concentraciones variables de la pareja de unión (por ejemplo, 0,1x - 10x la concentración de la pareja de unión marcada con fluorescencia). Esto significa que puede realizarse una titulación de pareja de unión.

45 **Procesamiento de los datos en bruto:** Opcionalmente, se puede realizar una corrección de blanqueo (lineal) para la cual es ventajoso esperar la retro-difusión de todas las moléculas después del final de la etapa 3. Esto aumenta el consumo de tiempo del análisis drásticamente. Para mediciones precisas y rápidas es ventajoso determinar la fuerza de blanqueo de una imagen a otra y corregir cada imagen individual con su propio factor de blanqueo. Para una corrección de blanqueo precisa, es ventajoso que el gradiente de temperatura a distancia del punto de calor sea bajo (por ejemplo, por debajo de 0,001 K/ μm). Las imágenes tomadas en la etapa 1b se utilizan para corregir todas las imágenes para la iluminación no homogénea. En caso de que la fluorescencia se registre sin resolución espacial (por ejemplo, fotodiodo de avalancha o fotomultiplicador), el fotoblanqueo se corrige mejor determinando una vez la característica de blanqueo de un cierto colorante sin calentamiento láser en un experimento de control.

50 **Evaluación de los datos:** Detección *cualitativa* de la interacción: A partir de la serie de imágenes se extrae la distribución de fluorescencia espacial del experimento de referencia (es decir, molécula/partícula marcada con fluorescencia sin pareja de unión) y el segundo experimento (es decir, si la pareja de unión está presente). La

fluorescencia se representa en función de la distancia desde el punto de calor. Un promedio sólo es posible para píxeles con la misma temperatura y la misma distancia. La distribución espacial de la concentración se obtiene corrigiendo las intensidades de fluorescencia para la respectiva dependencia de la temperatura del colorante. Con el conocimiento de la dependencia de la temperatura del colorante fluorescente y la distribución de temperatura espacial, el efecto de una fluorescencia decreciente debido al aumento de la temperatura se puede corregir. En realizaciones particulares, no es necesaria una corrección de la dependencia de la temperatura para la detección cualitativa de la interacción, así como para su cuantificación, y la distribución de fluorescencia espacial es suficiente. Puede utilizarse cualquier colorante fluorescente en el mercado, en particular realizaciones incluso sin caracterización de su dependencia de la temperatura. Las propiedades fluorescentes de un colorante pueden variar con las condiciones del tampón, tales como el pH.

Los valores del perfil de fluorescencia se integran hasta la distancia en la que la temperatura está por debajo de, por ejemplo, el 10 % de la temperatura máxima (por ejemplo 70 µm). Los valores integrados se comparan y un cambio da una indicación precisa si existe una afinidad entre las sustancias a las concentraciones utilizadas, ya que la interacción cambia las propiedades termo-ópticas (por ejemplo, movilidad termófora, tamaño superficial y grupos químicos en la superficie). En la mayoría de los casos, la interacción conduce a una mayor fluorescencia (concentración) a temperaturas más altas.

En el caso de que toda la sección transversal de un capilar se caliente (es decir, usando, por ejemplo, lentes cilíndricas para dar al haz láser IR una forma elipsoidal, que calienta una sección transversal de un capilar homogéneamente), la intensidad de dos o más píxeles del punto de calor centrado puede promediarse. En realizaciones particulares, todos los píxeles a la misma distancia que la línea caliente tienen la misma temperatura. Esto es ventajoso para mediciones de alta precisión. En caso de que la fluorescencia se registre sin resolución espacial, se mide el cambio de fluorescencia en el centro del punto/línea de calor. En realizaciones particulares, puede ser ventajoso calentar toda la sección transversal. En general, si se registra más de una única trama en la etapa 1b y 3 es posible una integración de tramas múltiples.

Para una cuantificación de afinidades moleculares o afinidades de partículas, se lleva a cabo el mismo procedimiento para todos los experimentos a diversas concentraciones de parejas de unión no fluorescentes. El resultado de la integración para el experimento de referencia (es decir, sin pareja de unión) se resta de los valores integrados obtenidos para las diferentes concentraciones de parejas de unión. A partir de esta evaluación, se puede obtener la cantidad de complejos que interactúan en unidades arbitrarias. Mediante la división de estos valores por el valor en el que la unión se satura, se puede obtener la cantidad relativa de complejos formados entre las moléculas que interactúan, en particular la pareja de unión, a una cierta concentración de aglutinante. A partir de estos conjuntos de datos también la concentración de la pareja de unión libre, por ejemplo, no fluorescente, se puede determinar y la intensidad de la interacción puede cuantificarse en cuanto a la constante de asociación o de disociación (véanse también los ejemplos adjuntos).

Como se ha mencionado previamente, también es posible detectar la unión de moléculas a partículas inorgánicas o nanocristales más grandes utilizando el procedimiento que se ha descrito anteriormente y en el presente documento a continuación. Las partículas inorgánicas, por ejemplo, partículas de CdSe, pueden modificarse con un número variable (por ejemplo 1, 2, 3, o 3 o más, pero preferiblemente hasta 3) de poli-etilen-glicol (PEG) de diferente peso molecular. En realizaciones particulares, se unen de 1 a 3 moléculas de polietilenglicol (PEG) a las partículas. El perfil de fluorescencia espacial se mide tal como se describe en el presente documento para la detección de interacciones biomoleculares (véanse los ejemplos adjuntos). Además, los datos sin procesar se procesan como se describe en el presente documento. Para medir el número o tamaño de las moléculas de PEG unidas a las partículas o nanocristales, puede ser suficiente comparar los perfiles de fluorescencia espacial obtenidos con el protocolo que se ha descrito anteriormente. Sin embargo, una corrección para la disminución dependiente de la temperatura de la fluorescencia permite una cuantificación en cuanto al coeficiente de Soret. Se ilustra en las figuras y ejemplos adjuntos, particularmente en la Fig. 26, que el coeficiente de Soret aumenta linealmente con el número de moléculas de PEG unidas a los nanocristales. La pendiente del aumento depende del peso molecular del PEG. La unión de moléculas individuales del tamaño de una proteína es detectable como se ilustra en, por ejemplo, la Fig. 26 adjunta.

Los términos "interacción" o "afinidad" como se usan en el presente documento, y en particular en el experimento ilustrativo no limitativo que se ha descrito anteriormente, no sólo se refieren a la interacción de moléculas/partículas distintas (por ejemplo, interacciones intermoleculares), sino también con interacciones intramoleculares, como eventos de plegado de proteínas y similares.

Se entiende por el experto en la técnica que el término "fluorescencia", como se emplea en el presente documento, no se limita a la "fluorescencia" en sí, sino que los medios, procedimientos y dispositivos desvelados en el presente documento también pueden usarse y emplearse mediante el uso de otros medios, en particular, la luminiscencia, como la fosforescencia. Por consiguiente, la expresión "excitar con fluorescencia dichas partículas marcadas y en primer lugar detectar y/o medir la fluorescencia de dichas partículas excitadas" se refiere a la "etapa de excitación" en el procedimiento identificado anteriormente y puede comprender la excitación correspondiente de la luminiscencia, es decir, la excitación se realiza con una longitud de onda más corta que la detección de la siguiente emisión. Por lo tanto, la expresión "detectar y/o medir en segundo lugar una fluorescencia de las partículas" en el

contexto de esta invención se refiere a una etapa de detección de dicha emisión después de la excitación. El experto en la técnica conoce en el contexto de esta invención que la longitud de onda de "excitación" y la longitud de onda de "emisión" tienen que estar separadas.

5 De acuerdo con una primera realización ilustrativa de la presente invención, el tiempo predeterminado (después del cual se detecta y/o se mide en segundo lugar una fluorescencia de las partículas/moléculas en la solución) es suficientemente pequeño para que los cambios de concentración inducidos por la termoforesis y el artefacto relacionado con o debido a la convección son insignificantes. En otras palabras, el tiempo predeterminado es suficientemente corto para separar la escala del tiempo de reacción inter e intramolecular de efectos de temperatura más lenta, por ejemplo, termoforesis, convección térmica. Por lo tanto, el tiempo predeterminado está preferiblemente dentro del intervalo de 1 ms a 250 ms, más preferiblemente entre 80 ms y 180 ms, en particular 150 ms. En particular, en los casos en los que la solución se proporciona en una cámara con buena conductividad térmica, por ejemplo, zafiro, diamante y/o silicio, un tiempo predeterminado más corto ya es suficiente, por ejemplo, 1 ms, 5 ms, 10 ms o 15 ms. Para la medición, es ventajoso que la cámara y la solución estén en un equilibrio térmico. En otras palabras, para cámaras con una buena conductividad térmica, la solución y la cámara son más rápidas en un equilibrio térmico de tal manera que son suficientes tiempos cortos predeterminados. En el caso de que la conductividad térmica sea deficiente, tarda más tiempo hasta que la cámara y la solución están en equilibrio térmico, es decir, el tiempo predeterminado es más largo, por ejemplo, 100 ms a 250 ms.

20 En realizaciones particulares de la invención, el tiempo de detección o de exposición está en el intervalo de 1 ms a 50 ms. El tiempo en el que se registra la señal de detección debe ser suficientemente corto para que el cambio de posición de una molécula individual sea insignificante para la detección durante la etapa de detección. Por ejemplo, en caso de que la detección se realice con una cámara CCD con una resolución de 320 x 200 píxeles, es ventajoso que durante el tiempo de detección una molécula/partícula individual sea detectada por sólo un píxel, ya que cada píxel representa una cierta temperatura. Si la posición de una partícula cambia demasiado, es decir, más de un píxel, la partícula puede estar expuesta a una temperatura diferente, lo que disminuye la precisión de medición. El uso de un dispositivo de cámara CCD para la detección también comprende el uso de una cámara con sólo una única línea de píxel (por ejemplo, cámara de línea) para la detección unidimensional.

30 En una realización particular de la invención, el haz láser se desenfoca de tal forma que un gradiente de temperatura dentro de la distribución de la temperatura está en el intervalo de 0,0 a 2K/μm, preferiblemente de 0,0 a 5 K/μm. Por lo tanto, los pequeños gradientes de temperatura aseguran que el movimiento de partículas termóforo es insignificante durante el tiempo desde el inicio de la irradiación láser hasta el final de la detección.

Al menos todas las temperaturas necesarias para detectar la desnaturalización térmica de una molécula tienen que estar dentro del campo de visión del dispositivo de cámara.

35 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, el haz de láser se irradia a través de uno o una pluralidad de elementos ópticos en la solución. El enfoque del haz láser se realiza en algunas realizaciones realizadas de tal manera que los gradientes de temperatura se encuentran dentro de los intervalos definidos anteriormente. El enfoque del láser puede conseguirse, por ejemplo, por una única lente, una pluralidad de lentes o una combinación de una fibra óptica y una lente o una pluralidad de lentes o un objetivo donde la divergencia del haz láser incidente se ajusta adecuadamente. Además, pueden disponerse otros elementos ópticos para controlar el foco y/o la dirección del haz láser entre la solución y el láser.

40 De acuerdo con otra realización más de la presente invención, la distribución de temperatura alrededor del haz láser se mide mediante una medición adicional, por ejemplo, la distribución de la temperatura se mide en las mismas condiciones en base a la fluorescencia dependiente de la temperatura conocida del colorante, como se ilustra en las figuras adjuntas, en particular la Fig. 3a, 3b y 15). En particular, se puede determinar una distribución de temperatura en base a la fluorescencia detectada del colorante sensible a la temperatura, en la que dicho colorante sensible a la temperatura se calienta (a través de la solución) mediante el haz láser irradiado y la intensidad de fluorescencia espacial de fluorescencia se mide sustancialmente perpendicular alrededor del haz láser.

50 De acuerdo con un ejemplo, el tiempo predeterminado (después de lo cual (por ejemplo, una fluorescencia de) las partículas/moléculas en la solución se detectan y/o se miden en segundo lugar) es suficientemente largo para que los cambios de concentración basados en el movimiento termóforo puedan detectarse. Por lo tanto, el tiempo predeterminado está preferiblemente dentro del intervalo de 0,5 a 250 s. En dicho tiempo predeterminado, la concentración cambia dentro de la distribución de temperatura espacial en la solución debido a efectos termóforos, y tal cambio de concentración puede detectarse mediante un cambio en la distribución de fluorescencia.

55 En realizaciones particulares de la invención, el haz láser se enfoca de tal manera que se consigue un gradiente de temperatura dentro de la distribución de temperatura en el intervalo de 0,001 a 10 K/μm. La temperatura dentro del campo de visión (particularmente en el borde del campo de visión) no alcanza necesariamente el valor de la temperatura ambiente. Es ventajoso un aumento de temperatura a una distancia hasta el centro de calor (es decir, en el borde del campo de visión) del 10 % o menos (en °C) en comparación con la temperatura máxima (en °C).

De acuerdo con una realización adicional, la fluorescencia antes y después de la irradiación del láser se detecta con

una cámara CCD. El uso de una cámara CCD proporciona la ventaja de que el cambio de la concentración puede detectarse en una pluralidad de posiciones de forma simultánea. En realizaciones particulares, la cámara CCD es una cámara CCD 2D (bidimensional), es decir, la matriz CCD comprende una pluralidad de píxeles de sensor (sensores fotoeléctricos de luz) en una primera y una segunda dirección, en la que las direcciones primera y segunda son preferiblemente perpendiculares entre sí. De acuerdo con una realización adicional, la cámara CCD es una cámara de línea o de exploración de línea, es decir, la matriz CCD comprende una pluralidad de píxeles de sensor en una primera dirección (una línea de píxeles de sensor) pero simplemente un píxel en una segunda dirección. Dicha cámara se denomina también como cámara CCD 1D (unidimensional). En otras palabras, una matriz unidimensional, usada en cámaras de barrido en línea, captura una única porción o línea de una imagen, mientras que una matriz bidimensional captura una imagen 2D entera. La matriz CCD de la cámara de línea también puede comprender tres líneas de sensores, cada una para un canal de color (rojo, verde y azul). Sin embargo, de acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, también es posible medir las características de las partículas basándose en un cambio de fluorescencia detectado de un único píxel del CCD. Por lo tanto, también es posible utilizar un fotodiodo o un fotomultiplicador en lugar de un solo píxel del CCD. En algunas realizaciones, el brillo de la fluorescencia antes y después de la irradiación del láser se mide con un fotodiodo o un único píxel con el CCD en el centro del haz láser.

Mediante la formación de imágenes en un dispositivo de cámara CCD, una cámara de línea o un fotodiodo PMT/Avalancha, la fluorescencia puede promediarse a lo largo de la altura de la lámina líquida usada. Por consiguiente, la solución tridimensional puede reducirse a dos dimensiones. Por lo tanto, el procedimiento descrito en las realizaciones es también aplicable a láminas lipídicas bidimensionales, típicamente usadas como sistemas modelo para procesos de membrana (por ejemplo, membrana lipídica bicapa unida a superficie soportada (tBLM, como se ilustra en las figuras adjuntas, particularmente la figura 38), o monocapas clásicas de Langmuir). Los compuestos marcados con fluorescencia que flotan en esta membrana (por ejemplo, lípidos, proteínas y similares) se mueven en gradientes de temperatura y se reordenan de acuerdo con su energía de solvatación. La redistribución de fluorescencia en estas capas o membranas lipídicas se puede emplear en el contexto de la invención, como la redistribución de los compuestos en solución para detectar propiedades o características bioquímicas o biofísicas, como cambios conformacionales, interacciones, radio hidrodinámico y similares. En el sistema de membrana, la distribución de la temperatura local se establece por la solución acuosa circundante, por ejemplo, la solución acuosa por encima de una superficie soportada por membrana. Por la conducción de calor, la capa lipídica por encima de una solución acuosa también adopta la temperatura correspondiente.

De acuerdo con el primer modo de realización ilustrativo de la invención, las partículas pueden ser biomoléculas y/o (nano o micro) partículas y/o perlas, en particular micropérlas, y combinaciones de estos. Con el uso de nanopartículas modificadas/micropartículas/proteínas de micropérlas, el ADN y/o ARN pueden ser detectados mediante uniones específicas de proteínas, ADN y/o ARN a las nanopartículas/micropérlas, ya que la unión específica cambia el movimiento termóforo de las nanopartículas/micropérlas. La velocidad de las partículas mayores de 100 nm puede detectarse por un único seguimiento de partículas.

La luz láser puede estar dentro del intervalo de 1200 nm a 2000 nm. Esta gama es ventajosa para soluciones acuosas. El grupo hidroxilo de agua se absorbe fuertemente en dicho intervalo de longitudes de onda. Además, otros disolventes con un grupo hidroxilo como el glicerol, pueden calentarse por calentamiento con láser infrarrojo). El láser es, en algunos modos de realización, un láser de alta potencia dentro del intervalo de 0,1 W a 10 W, preferiblemente de 1 W a 10 W, más preferiblemente de 4 W a 6 W. En algunos modos de realización, las concentraciones de partículas de una solución acuosa están dentro del intervalo de 1 atto Molar (por ejemplo, micropérlas de partícula individual) a 1 Molar, preferiblemente de 1 atto Molar a 100 μ Molar.

De acuerdo con una realización adicional, la solución puede ser una solución salina con concentraciones en el intervalo de 0 a 1 M.

De acuerdo con aún otra realización adicional de la invención, la distribución de la temperatura espacial generada por los haces láser está en un intervalo de 0,1 °C a 100 °C. La sensibilidad a la temperatura del material de interés establece los límites de la temperatura máxima utilizada en experimentos. En particular, se generan rangos de temperatura de 0,1 °C hasta al menos 40 °C, preferiblemente hasta al menos 60 °C, más preferiblemente hasta al menos 80 °C, e incluso más preferiblemente hasta al menos 100 °C mediante el haz LÁSER para medir la estabilidad del ADN, por ejemplo. El experto en la técnica es consciente de que las temperaturas correspondientes se pueden lograr, por ejemplo, enfriando el sistema experimental, así como mediante el uso de LÁSER con la potencia correspondiente. El experto en la técnica también es consciente de que mediante enfriamiento de la muestra global es posible una mayor amplitud de aumento de temperatura (es decir, mediante calentamiento por láser) sin causar daño a los materiales sensibles a la temperatura. Los intervalos de temperatura ilustrativos, pero no limitativos, y las temperaturas máximas para diferentes materiales y caracterizaciones termo-ópticas, se dan en la tabla 1. Por consiguiente, también pueden alcanzarse temperaturas más altas en el centro del gradiente de calor (punto de potencia del láser máxima en y sobre la analizar/caracterizar) como se ilustra, entre otros, en la figura 3 adjunta. Dichas altas temperaturas pueden alcanzarse en cámaras de alta presión. Además, en algunos modos de realización, se crea un gradiente de temperatura dentro del intervalo de 0,1 nm a 500 μ m de diámetro en torno al haz LÁSER.

Tabla 1: Intervalos de temperatura ilustrativos para el análisis term-óptico

Caract. term-óptica* Material de las muestras	Análisis de estabilidad	Interacción, eventos cinéticos	Longitud del radio hidrodinámico	conformación, estructura, modificación química	Trampa term-óptica
Ácidos nucleicos (ADN, ARN, etc.)	p. 0 °C-100 °C mr.p. 20 °C -95 °C ms. p. 30 °C-80 °C ms. p. 30 °C-85 °C	p. 0 °C-80 °C mr.p. 20 °C-80 °C mr.p. 20 °C-40 °C ms. p. 20 °C-30 °C	p. 0 °C-80 °C mr.p. 20 °C-80 °C mr.p. 20 °C-40 °C ms. p. 20 °C-30 °C	p. 0 °C-100 °C mr.p. 10 °C-90 °C ms.p. 20 °C-90 °C	p. 0 °C-80 °C mr.p. 20 °C -60 °C mr.p. 20 °C-40 °C ms. p. 20 °C-30 °C
proteínas	p. 0 °C-100 °C mr.p. 20 °C -95 °C ms. p. 30 °C-85 °C	p.0 °C-40 °C mr.p. 0 °C-30 °C mr.p. 10 °C-20 °C mr. p. 15 °C-20 °C ms. p. 20 °C-25 °C	p. 0 °C-60 °C mr.p. 0 °C-40 °C mr.p. 10 °C-40 °C ms. p. 20 °C-30 °C	p. 0 °C-80 °C mr.p. 20 °C-60 °C mr.p. 20 °C-40 °C ms. p. 0 °C-60 °C	p. 0 °C-40 °C mr.p. 10 °C-30 °C mr.p. 15 °C-30 °C ms. p. 20 °C-30 °C
vesículas, liposomas	p. 0 °C-100 °C mr.p. 20 °C -95 °C ms. p. 30 °C-85 °C	p. 0 °C-40 °C mr.p. 10 °C-50 °C mr.p. 20 °C-40 °C ms. p. 30 °C-40 °C ms. p. 20 °C-25 °C	p. 0 °C-60 °C mr.p. 0 °C-40 °C mr.p. 10 °C-40 °C ms. p. 20 °C-30 °C	p. 0 °C-80 °C mr.p. 20 °C-60 °C mr.p. 20 °C-40 °C ms.p. 20 °C-30 °C	p. 0 °C-40 °C mr.p. 10 °C-30 °C mr.p. 15 °C-30 °C ms. p. 20 °C-30 °C
(Micro) partículas (por ejemplo, sílice, poliestireno, etc.)	p. 0 °C-100 °C mr.p. 20 °C -95 °C ms. p. 30 °C-85 °C	p. 0 °C-60 °C mr.p. 10 °C-50 °C mr.p. 20 °C-40 °C ms. p. 20 °C-30 °C	p. 0 °C-80 °C mr.p. 0 °C-60 °C mr.p. 10 °C-50 °C ms. p. 20 °C-30 °C	p. 0 °C-100 °C mr.p. 10 °C-60 °C mr.p. 20 °C-40 °C ms.p. 20 °C-30 °C	p. 0 °C-80 °C mr.p. 20 °C-60 °C mr.p. 20 °C-40 °C ms.p. 20 °C-30 °C
PEG	p. 0 °C-100 °C mr.p. 20 °C-95 °C ms. p. 30 °C-85 °C	p. 0 °C-100 °C mr.p. 10 °C-50 °C mr.p. 20 °C-40 °C ms. p. 20 °C-30 °C	p. 0 °C-80 °C mr.p. 0 °C-60 °C mr.p. 10 °C-50 °C ms. p. 20 °C-30 °C	p. 0 °C-100 °C mr.p. 10 °C-60 °C mr.p. 20 °C-40 °C ms.p. 20 °C-30 °C	p. 0 °C-80 °C mr.p. 20 °C-60 °C mr.p. 20 °C-40 °C ms.p. 20 °C-30 °C

Tabla 1: (continuación)

Polímeros de azúcar (por ejemplo, alginato, ácidos hialurónicos)	p. 0 °C-100 °C mr.p. 20 °C -95 °C ms. p. 30 °C-85 °C	p. 0 °C-100 °C mr.p. 10 °C-50 °C mr.p. 20 °C-40 °C ms. p. 20 °C-30 °C	p. 0 °C-60 °C mr.p. 0 °C-50 °C mr.p. 10 °C-40 °C ms. p. 20 °C-40 °C	p. 0 °C-100 °C mr.p. 10 °C-60 °C mr.p. 20 °C-40 °C ms. p. 20 °C-30 °C	p. 0 °C-80 °C mr.p. 20 °C-60 °C mr.p. 20 °C-40 °C ms. p. 20 °C-30 °C
capas lipídicas bidimensionales (por ejemplo, que contienen proteínas)	p. 0 °C-100 °C mr.p. 20 °C -95 °C ms. p. 30 °C-85 °C	p. 0 °C-40 °C mr.p. 10 °C -40 °C mr.p. 20 °C -40 °C mr. p. 30 °C-40 °C ms. p. 20 °C-25 °C	p. 0 °C-60 °C mr.p. 0 °C-40 °C mr.p. 10 °C-40 °C ms. p. 20 °C-30 °C	p. 0 °C-80 °C mr.p. 20 °C-60 °C mr.p. 20 °C-40 °C ms. p. 0 °C-60 °C	p. 0 °C-40 °C mr.p. 10 °C-30 °C mr.p. 15 °C-30 °C ms. p. 20 °C-30 °C
(Nano) partículas	p. 0 °C-100 °C mr.p. 20 °C -95 °C ms. p. 30 °C-85 °C	p. 0 °C-100 °C mr.p. 10 °C -50 °C mr.p. 20 °C -40 °C ms. p. 20 °C-30 °C	p. 0 °C-80 °C mr.p. 0 °C-60 °C mr.p. 10 °C-50 °C ms. p. 20 °C-30 °C	p. 0 °C-100 °C mr.p. 10 °C-60 °C mr.p. 20 °C-40 °C ms. p. 20 °C-30 °C	p. 0 °C-80 °C mr.p. 20 °C-60 °C mr.p. 20 °C-40 °C ms. p. 20 °C-30 °C
Compuestos de carbono inorgánico (por ejemplo, nanotubos de	p. 0 °C-100 °C mr.p. 20 °C -95 °C ms. p. 30 °C-85 °C	p. 0 °C-100 °C mr.p. 10 °C -50 °C mr.p. 20 °C -40 °C ms. p. 20 °C-30 °C	p. 0 °C-80 °C mr.p. 0 °C-60 °C mr.p. 10 °C-50 °C ms. p. 20 °C-30 °C	p. 0 °C-100 °C mr.p. 10 °C-60 °C mr.p. 20 °C-40 °C ms. p. 20 °C-30 °C	p. 0 °C-80 °C mr.p. 20 °C-60 °C mr.p. 20 °C-40 °C ms. p. 20 °C-30 °C

* La temperatura indicada aquí proporciona los intervalos de temperatura preferidos de la muestra a la que pueden medirse las propiedades termo-ópticas. El aumento de la temperatura inducido por el calentamiento por láser puede comprender sólo una pequeña porción de la temperatura total, por ejemplo, una caracterización termo-óptica de nanopartículas puede realizarse a 75 °C de temperatura de muestra global con un aumento de la temperatura por calentamiento de láser de 5 °C; una caracterización de proteínas puede realizarse en una muestra enfriada a 10 °C y se calienta con un láser infrarrojo hasta una temperatura máxima de 30 °C

p.: preferiblemente, mr. p.: más preferiblemente, ms.p.: mucho más preferiblemente

En el contexto de la invención, el término LÁSER es equivalente al término "láser" y viceversa.

Un ejemplo se refiere a un dispositivo para medir las características termo-ópticas de las partículas en una solución. Tal dispositivo de este tipo comprende un medio de recepción para recibir partículas/moléculas, particularmente partículas o moléculas marcadas o etiquetadas, dentro de la solución, medios para excitar las partículas/moléculas, particularmente las partículas/moléculas marcadas o etiquetadas, medios para detectar la excitación de las partículas/moléculas, en particular las partículas/moléculas marcadas o etiquetadas, y medios para obtener una distribución de temperatura espacial en la solución. Tal dispositivo conocido como dispositivo de acuerdo con la presente invención para la medición de interacciones inter y/o intramoleculares de partículas en una solución como se define en la reivindicación adjunta 26, comprende un medio de recepción para recibir las partículas marcadas dentro de una solución, medios para excitar con fluorescencia las partículas marcadas, medios para detectar la fluorescencia excitada en dicha solución, y un láser para irradiar un haz de luz láser en la solución para obtener una distribución de temperatura espacial en la solución alrededor del haz de luz láser irradiada, en el que el láser y los medios para detectar la fluorescencia excitada se disponen en el mismo lado con respecto a los medios de recepción.

Particularmente, la luz láser puede enfocarse localmente en la solución y la distribución de temperatura espacial puede obtenerse mediante la conducción de la energía absorbida como calor en la solución. Mediante el ajuste del ancho de enfoque de la radiación IR electromagnética, se pueden ajustar las dimensiones espaciales de la distribución de temperatura, es decir, se consigue una distribución de temperatura amplia o estrecha. Se pueden conseguir ajustes adicionales con respecto a la geometría de la distribución de la temperatura escogiendo un material para la cámara de microfluidos/capilar que presenta cierta conductividad térmica (por ejemplo, alta conductividad térmica, estrecha distribución de la temperatura y viceversa). De acuerdo con $c/c_0 = \exp[-(D_T/D)(T-T_0)]$, la amplitud de estado estacionario de la señal termo-óptica está relacionada exponencialmente con el aumento de temperatura. Utilizando la relación que se ha mostrado anteriormente, una distribución de la temperatura espacial se puede ajustar exactamente a la distribución de la concentración espacial ajustando los coeficientes D_T y D . El tiempo que tarda el sistema en alcanzar el estado estacionario tiene, además de una dependencia de D , también una fuerte dependencia de D_T y el gradiente de temperatura. El producto del gradiente de temperatura y la movilidad termófora D_T da la velocidad con la que las partículas se mueven a lo largo del gradiente de temperatura. Como regla empírica, cuanto más fuerte es el gradiente de temperatura y mayor es la movilidad termófora, más corto es el tiempo necesario para medir las propiedades termo-ópticas. Por lo tanto, es ventajoso que se establezca una distribución de temperatura en escalas de longitud microscópicas (por ejemplo, 250 μm) para obtener un fuerte gradiente de temperatura.

De acuerdo con realizaciones adicionales de la presente invención, los medios para excitar con fluorescencia las partículas/moléculas o partículas/moléculas marcadas pueden ser cualquier dispositivo adecuado seleccionado del grupo que consiste en láser, fibra láser, diodo-láser, LED, halógeno, HBO (las lámparas HBO son, por ejemplo, lámparas de arco corto en las que se quema el arco de descarga en una atmósfera de vapor de mercurio a alta presión), HXP (las lámparas HXP son, por ejemplo, lámparas de arco corto en las que el arco de descarga se quema en una atmósfera de vapor de mercurio a una presión muy alta. Por ejemplo, a diferencia de las lámparas HBO funcionan a una presión sustancialmente más alta y emplean un ciclo halógeno. Las lámparas HXP generan luz UV y visible, incluida una porción significativa de luz roja. También se utilizan preferiblemente medios adicionales para la excitación como se menciona en la memoria descriptiva.

De acuerdo con realizaciones particulares de la presente invención, los medios para detectar la fluorescencia, en la solución, pueden ser cualquier dispositivo adecuado seleccionado del grupo que consiste en una cámara CCD (CCD 2D o exploración lineal), cámara de línea, tubo fotomultiplicador (PMT), fotodiodo de avalancha (APD), cámara CMOS. Los medios adicionales de detección a los que se hace referencia en la memoria descriptiva también se utilizan en realizaciones particulares.

Los medios de recepción para recibir las partículas marcadas dentro de una solución pueden ser una cámara, una cámara de microfluidos delgada, una cubeta o un dispositivo para proporcionar la muestra en forma de una única gotita. Es ventajoso proporcionar la sonda de muestra dentro de una cámara que tiene un espesor en la dirección del haz de luz láser de 1 μm a 500 μm , en particular de 1 μm a 250 μm , en particular de 1 μm a 100 μm , en particular de 3 μm a 50 μm , en particular de 5 μm a 30 μm . Un experto en la técnica entenderá que el término cámara también se refiere, por ejemplo, a un capilar, un chip de microfluído o una placa de múltiples pocillos. En algunas realizaciones, la cámara tiene la misma anchura que la dimensión en la dirección de la luz láser (por ejemplo, un capilar). En combinación con una geometría elipsoidal de calentamiento láser correspondiente, tal sistema puede reducirse de una simetría radial a una sola dimensión, ya que puede usarse una cámara CCD con una única línea de píxeles (CCD de exploración de línea) para integrar la fluorescencia de toda la anchura de la cámara. En una realización particular, los medios de recepción para recibir las partículas marcadas dentro de un soporte de muestra de alias de solución se unen a un elemento óptico, tal como un objetivo. Tal configuración evita movimientos relativos del porta-muestras con respecto al objetivo. También se usan en algunas realizaciones medios adicionales de recepción a los que se hace referencia en la memoria descriptiva.

El láser para la irradiación de la luz láser puede ser, por ejemplo, un láser IR, por ejemplo, un láser con una longitud de onda entre 1200 y 2000 nm, preferiblemente de 1455 nm y/o 1480 nm y una potencia de radiación de 0,1 a 10 W.

La luz láser puede acoplarse al dispositivo de la presente invención por medio de unidades ópticas tales como fibras láser (monomodo o multimodo) con o sin colimador. Otros medios de irradiación a los que se hace referencia en la memoria descriptiva se usan también en algunas realizaciones y están dentro de la habilidad normal del experto.

5 El dispositivo de acuerdo con la presente invención puede comprender además una unidad de control para controlar los medios para excitar las partículas y/o los medios para detectar las partículas excitadas. En particular, la unidad de control está adaptada para permitir que el dispositivo de la presente invención realice las etapas del procedimiento como se analiza con respecto al presente procedimiento inventivo.

10 La unidad de control puede controlar el tipo (por ejemplo, longitud de onda), la intensidad, la duración y/o el tiempo para el inicio y la detención de la irradiación de los medios para la excitación. Por ejemplo, en una realización particular en la que los medios de excitación son un láser, la duración y/o el tiempo de inicio y detención para generar un haz láser pueden controlarse por la unidad de control.

15 La unidad de control puede controlar adicionalmente, o como alternativa, la exposición, la sensibilidad, la duración y/o el tiempo de inicio y tiempo de detención para la detección/medición por medio de los medios de detección. Por ejemplo, en una realización particular en la que los medios para la detección son una cámara CCD, la temporización de exposición de la cámara CCD puede controlarse por la unidad de control.

20 La unidad de control puede estar además adaptada para controlar los medios de detección dependientes del estado funcional de los medios de excitación. En particular, puede ser ventajoso sincronizar la temporización de la excitación con el momento de la detección. Por ejemplo, en una realización particular en la que el medio de excitación es un láser y el medio para la detección es una cámara CCD, la temporización de exposición del CCD se sincroniza con la irradiación del láser. Esto se puede conseguir controlando directamente el CCD y el láser, por ejemplo, encendiendo y apagando el CCD y el láser de forma sincrónica.

Como alternativa, o adicionalmente, la unidad de control puede controlar los medios, en particular los medios ópticos, que se disponen entre los medios para la excitación y los medios de recepción y/o se disponen entre los medios para la detección y los medios de recepción.

25 El dispositivo de acuerdo con la presente puede comprender al menos un obturador dispuesto entre los medios de recepción para recibir las partículas/moléculas marcadas y los medios para excitar las partículas/moléculas, en particular el láser. El dispositivo de acuerdo con la presente puede comprender, adicionalmente o como alternativa, al menos un obturador dispuesto entre los medios de recepción para recibir las partículas marcadas y los medios para detectar las partículas/moléculas, en particular la cámara CCD. Tal obturador puede controlarse por la unidad de control para adaptar la temporización de la etapa de excitación con la temporización de la detección.

30 Una única unidad de control puede cumplir las funciones de varios elementos, es decir, la unidad de control puede comprender una pluralidad de subunidades que están adaptadas para controlar medios particulares.

35 El dispositivo de acuerdo con la presente puede comprender además al menos un divisor de haz y/o un espejo, por ejemplo, un filtro dicróico o un espejo dicróico, es decir, un filtro de color usado para pasar selectivamente la luz de una pequeña gama de colores mientras que refleja otros colores, o un AOFT. El espejo dicróico puede reflejar una longitud de onda corta (reflectancia > 80 %) y transmitir una longitud de onda larga (transmisión > 80 %). El espejo dicróico puede comprender, por ejemplo, una transmisión IR mayor del 90 % y una reflectancia de al menos una longitud de onda comprendida entre 350 a 650 nm. En algunas realizaciones, en lugar de un espejo dicróico puede usarse un espejo de plata. El espejo (dicróico) puede disponerse en una posición fija dentro del dispositivo. Sin embargo, de acuerdo con algunas realizaciones, el espejo (dicróico) puede ser móvil, por ejemplo, accionado por unos medios de accionamiento (que pueden ser controlados por los medios de control).

40 El dispositivo de acuerdo con la presente puede comprender al menos un filtro de emisión y/o de excitación (paso de banda/paso largo) para filtrar la longitud de onda específica.

45 En otras palabras, el dispositivo de acuerdo con la presente invención puede comprender también medios ópticos dispuestos entre los medios de recepción para recibir las partículas marcadas y los medios para detectar las partículas y/o entre los medios de recepción para recibir las partículas marcadas y los medios para excitar las partículas. Dichos medios ópticos pueden estar adaptados para controlar la dirección de propagación de la luz por medio de transmisión o reflexión y/o para filtrar o separar diferentes longitudes de onda mediante filtros (dicróicos). Tales medios ópticos pueden ser medios ópticos pasivos o medios ópticos activos que pueden controlarse por la unidad de control. Por ejemplo, se puede disponer un módulo de análisis (por ejemplo, un espejo de exploración Galvano) entre los medios de recepción para recibir las partículas marcadas y los medios para excitar las partículas. El intervalo de exploración y la temporización de tal módulo de exploración pueden ser controlados por la unidad de control, preferiblemente en dependencia con el control de los medios de recepción y/o medios para la excitación.

55 Los medios ópticos que son ventajosos para el dispositivo de acuerdo con la presente invención, en particular para realizar las etapas del procedimiento de la presente invención se han ilustrado anteriormente y a continuación. En particular, una pluralidad de medios ópticos que son útiles para un dispositivo de la presente invención se ilustran en la descripción detallada de la invención.

De acuerdo con un ejemplo, la irradiación del láser y la detección de la fluorescencia se lleva a cabo desde diferentes direcciones, por ejemplo, la irradiación es desde abajo y la detección es por encima de la muestra (como se ilustra en las figuras adjuntas, particularmente la Fig. 1). Sin embargo, de acuerdo con la invención, los medios para la irradiación y la detección se disponen en el mismo lado con respecto a la sonda de muestra (véase, por ejemplo, la Fig. 2). El dispositivo de acuerdo con la presente invención puede tener cualquier orientación con respecto a la dirección de la gravedad, es decir, el dispositivo puede estar orientado, por ejemplo, sustancialmente perpendicular, paralelo o antiparalelo con respecto a la dirección de la gravedad.

En realizaciones particulares de la invención, la sonda de muestra se proporciona en una cámara. El espesor de la sonda de muestra en la cámara en la dirección del haz de luz láser es preferiblemente pequeño, por ejemplo, de 1 μm a 500 μm , en particular de 1 μm a 250 μm , en particular de 1 μm a 100 μm , en particular de 3 μm a 50 μm , en particular de 5 μm a 30 μm . Un experto en la técnica entenderá que el término cámara también se refiere, por ejemplo, a un capilar, un chip de microfluído o una placa de múltiples pocillos. En una realización adicional, la cámara tiene la misma anchura que la dimensión en la dirección de la luz láser (por ejemplo, un capilar). En combinación con la correspondiente geometría de calentamiento láser elipsoidal, tal sistema puede reducirse desde una simetría radial a una única dimensión. Se puede utilizar una cámara CCD con una única línea de píxeles para integrar la fluorescencia de toda la anchura de la cámara. Además, sólo se puede utilizar un único píxel (o un fotodiodo o fotomultiplicador) asignado al centro del punto de calor para la detección de interacciones, conformación, etc. Se ilustra en las figuras adjuntas, en particular en la Fig. 27, cómo se utiliza un capilar para la caracterización termo-óptica. Un capilar puede situarse sobre un soporte sólido/portamuestras/fase con buenas propiedades de conducción de calor. El soporte sólido/portamuestras/fase puede enfriarse o calentarse por un elemento Peltier. Mediante el uso de un elemento Peltier, se puede ajustar la "temperatura ambiente" de la solución. Es ventajoso medir la conformación de la proteína a diferentes temperaturas, ajustar la termoforesis de (bio)moléculas/(nano)partículas/(micro)perlas a un valor cercano al cambio de signo de la termoforesis (es decir, el de un evento de unión cambia el comportamiento termóforo desde la acumulación a temperaturas más altas hasta el agotamiento de las temperaturas más altas). Un enfriamiento de la cámara permite calentar las moléculas sensibles a la temperatura con una potencia láser mucho mayor. En realizaciones adicionales, se colocan válvulas en el extremo del capilar para excluir cualquier deriva del líquido dentro del capilar. A menudo la deriva es causada por la evaporación al final de un capilar.

Sin embargo, también es posible proporcionar la sonda de muestra sin una cámara, tal como en forma de una gota, por ejemplo, una gota de tampón.

En algunas realizaciones ejemplares de la invención, la fluorescencia se detecta dentro de un intervalo de aproximadamente 50 nm a 500 μm en la dirección del haz láser.

En realizaciones ejemplares adicionales, la fluorescencia se detecta sustancialmente perpendicular con respecto al haz de luz láser con una cámara CCD. La segunda detección de fluorescencia es en algunas realizaciones una medición espacial de la fluorescencia en dependencia de la distribución de temperatura sustancialmente perpendicular con respecto al haz de luz láser.

Las figuras adjuntas muestran configuraciones particulares no limitativas para los dispositivos de acuerdo con la presente invención y ejemplos que no están dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Estos dispositivos son particularmente útiles en la medición de la termoforesis. La formación de imágenes por fluorescencia y la focalización por láser infrarrojo se realizan preferiblemente a través de la misma unidad óptica, por ejemplo, a través del mismo objetivo. En particular, se puede usar un objetivo con muy baja refracción de la luz IR. Esto es beneficioso porque un perfil de temperatura espacial local a la escala micrométrica es ventajoso y deseable en el contexto de los medios y procedimientos proporcionados en el presente documento. La alta refracción de la luz IR por el objetivo puede conducir a una amplia distribución de la temperatura con una alta elevación de la temperatura de fondo. Para resolver este efecto menos ventajoso, se puede usar un objetivo con alta transmisión en la región IR del espectro electromagnético (preferiblemente a 1200-1600 nm, es decir, corregido para la radiación IR). Se prefiere aquí un objetivo que comprende solamente un pequeño número de lentes (es decir, objetivo con menos corrección para longitudes de onda visibles). Como se describe en el presente documento, si se utiliza una cámara de microfluidos con una elevada relación de aspecto (longitud/anchura), puede ser ventajoso cambiar el perfil del haz láser IR a una forma elipsoidal, para calentar homogéneamente toda la sección transversal del capilar. Esto permite, entre otras cosas, mediciones de alta precisión con una cámara de línea, fotodiodo o fotomultiplicador. Una cámara de línea proporciona simplemente una resolución de línea a lo largo del capilar y promedia la fluorescencia espacial de toda una sección transversal (anchura) del capilar.

El fotodiodo o fotomultiplicador no tiene resolución espacial, pero está situado de manera que mida la fluorescencia en la región caliente central. Dicho posicionamiento está dentro de las habilidades normales del experto en la técnica. Tanto la cámara de línea como el fotodiodo combinado con una iluminación elipsoidal de la cámara de microfluidos (es decir, capilar) se utilizan en algunas realizaciones ejemplares de la invención para la adquisición de datos.

La Fig. 23 adjunta ilustra un modo de realización ejemplar adicional correspondiente, en la que se documenta la detección simultánea de dos o más fluoróforos/partículas marcadas diferentes. Las diferentes longitudes de onda de

emisión de las dos o más partículas/moléculas marcadas se dividen, por ejemplo, a través de un espejo dicróico o AOTF en dos o más direcciones diferentes. En esta realización, un canal de detección puede usarse, por ejemplo, para medir la temperatura a través de la fluorescencia dependiente de la temperatura de un colorante, por ejemplo, Cy5 a una longitud de onda, por ejemplo, 680 nm +/- 30 nm. En el otro canal, la curva de fusión de una partícula/molécula marcada se puede registrar a una longitud de onda de, por ejemplo, 560 nm +/- 30 nm. También permite la detección paralela de partículas/moléculas, por ejemplo, diferentes partículas/moléculas, por ejemplo, con diferentes marcadores luminiscentes o fluorescentes

Una ventaja de la presente invención es que, a diferencia de la técnica anterior, ahora se pueden medir/determinar/caracterizar las partículas, en particular, y como se ilustran, (bio)moléculas o (nano o micro) partículas o (micro)perlas empleando distribuciones de temperatura espaciales con resolución de μm .

Por consiguiente, con los medios, procedimientos y dispositivos proporcionados en el presente documento, es posible, entre otros, medir, detectar y/o verificar procesos biológicos, químicos o biofísicos y/o investigar, estudiar y/o verificar muestras, como muestras biológicas o farmacéuticas. También son factibles pruebas de diagnóstico y son realizaciones ejemplares de esta invención. Entre otros, se prevé y es factible medir la longitud de moléculas de ácido nucleico (como ADN, ARN), para medir las características de fusión de proteínas o moléculas de ácido nucleico, como, por ejemplo, de ADN bicatenario o ARN bicatenario (dsDNA/dsRNA) o de moléculas de ácido nucleico híbridas, como híbridos de ADN/ARN, para medir y/o analizar secuencias de ácidos nucleicos, como la detección y/o medición de polimorfismos de nucleótidos únicos (SNP) (véase también las figuras adjuntas, en particular la figura 4) o para medir la estabilidad de las moléculas de ácido nucleico en correspondencia y en función de su longitud relativa; para medir y/o verificar los productos finales de PCR, por ejemplo, en un diagnóstico médico general, también en un diagnóstico de cuerpo polar, un diagnóstico de preimplantación, un análisis forense. Por consiguiente, es evidente para el experto en la técnica que los medios y procedimientos proporcionados en esta invención son, particularmente y no limitantes, útiles en mediciones y/o verificaciones en las que la longitud, el tamaño, las afinidades con otras moléculas/partículas de una partícula/molécula es de interés.

Por ejemplo, los procedimientos proporcionados en el presente documento, así como los dispositivos son útiles en la detección y medición de la longitud, la estabilidad de la temperatura, así como puntos de fusión de moléculas de ácido nucleico y proteínas. Por lo tanto, está dentro del alcance de la presente invención que, por ejemplo, los cebadores (ADN) y las sondas (de ADN o ARN) se midan y/o se verifiquen después o durante su síntesis. También se prevé la medición de moléculas de ácido nucleico en plantillas, como chips de ADN. El término fusión en el contexto de esta invención se refiere a la desnaturalización térmica de biomoléculas, como ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN, ADN) o proteínas.

Además, se contempla en el contexto de la presente invención la medición, detección y/o verificación de mutaciones y variaciones genéticas en moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, en forma de polimorfismos conformacionales monocatenarios (SSCP) o en forma de polimorfismos de longitud de fragmento de restricción (RFLP) y similares. La presente invención también proporciona la posibilidad de analizar heterodúplex. Los heterodúplex se generan por desnaturalización por calor e hibridación de una mezcla de, por ejemplo, moléculas de ADN de tipo silvestre y mutante. En particular, también es posible medir el efecto de la unión de proteínas a una molécula de ADN sobre la estabilidad de esta última. Además, es posible medir la estabilidad térmica de las proteínas y el efecto de moléculas (por ejemplo, moléculas pequeñas, fármacos, fármacos candidatos) sobre la desnaturalización térmica.

También dentro del alcance de la presente invención se encuentra, por ejemplo, la medición de interacciones proteína-proteína, como formaciones complejas de estructuras proteicas o de proteínas o de fragmentos de las mismas. Dichas mediciones comprenden, pero sin limitación, la medición de reacciones de unión a anticuerpo-antígeno (también en forma de anticuerpos monocatenarios, fragmentos de anticuerpo, cromocuerpos y similares). Sin embargo, los modos de realización de la presente invención también se refieren a la detección y/o medición de eventos de disociación, como, por ejemplo, la disociación de complejos de proteínas. Por lo tanto, la invención es también útil en la medición, determinación y/o verificación de eventos de disociación, como en la medición de la disociación de complejos proteínicos, por ejemplo, complejos anticuerpo-antígeno y similares. Las figuras adjuntas también muestran que los medios y procedimientos proporcionados en el presente documento son útiles, por ejemplo, en la medición de curvas de fusión para las moléculas de ácido nucleico, proteínas y análisis correspondientes.

El experto en la técnica entiende que el término "micropartícula/nanopartícula modificada", como se emplea en el presente documento, no se limita a "micropartícula/nanopartícula" en sí, sino que los medios, partículas y materiales divulgados en el presente documento también pueden usarse y emplearse por el uso de otros medios, en particular, medios coloidales, como espumas, emulsiones y soles.

Dado que las micropartículas muestran una termoforesis muy fuerte, como se ilustra en los ejemplos y figuras adjuntos, particularmente en la Fig. 33, pueden utilizarse como un material portador para la detección y caracterización de, por ejemplo, biomoléculas, como proteínas o ácidos nucleicos. Mediante el uso de micropartículas, la señal termófora de, por ejemplo, las biomoléculas puede mejorarse. La atracción de una micropartícula a un valor extremo (por ejemplo, la temperatura máxima) de la distribución de temperatura espacial debida a la termoforesis puede ser lo suficientemente fuerte para atrapar las micropartículas allí (como se ilustra en

los ejemplos y figuras adjuntos, particularmente en la Fig. 34).

Una micropartícula es una partícula con una longitud característica de menos de 1 mm y más de 100 nm sin restricción del material (por ejemplo, partículas de sílice/vidrio/biodegradables recubiertas o no recubiertas, partículas de poliestireno/recubiertas/de citometría de flujo/de PMMA/melamina/NIST, partículas de agarosa, partículas magnéticas, partículas de oro o partículas de plata recubiertas o sin recubrir, u otros metales, metales de transición, materiales biológicos, semiconductores, partículas orgánicas e inorgánicas, microesferas de poliestireno fluorescente, microesferas de poliestireno no fluorescente, materiales compuestos, liposomas, células y similares).

Una nanopartícula es una partícula con una longitud característica de menos de 100 nm sin restricción del material (por ejemplo, puntos cuánticos, nanocristales, nanocables, pozos cuánticos).

Las partículas o perlas de acuerdo con esta invención pueden modificarse de tal manera que, por ejemplo, las biomoléculas, por ejemplo, ADN, ARN o proteínas, pueden ser capaces de unirse (en algunas realizaciones específicamente y/o covalentemente) a las partículas o perlas. Por lo tanto, dentro del alcance de esta invención se encuentra el análisis termo-óptico de las características de perlas y/o partículas y en particular de moléculas unidas a o unidas a tales perlas o partículas. En particular, tales moléculas son biomoléculas. En consecuencia, la expresión "micro(perlas)/(nano o micro)partículas modificadas", en particular, se refiere a perlas o nanopartículas que comprenden moléculas adicionales a analizar o caracterizar (un ejemplo no limitativo para el caso de nanopartículas se muestra en las figuras y ejemplos adjuntos, particularmente en la Fig. 34). Las micropartículas/(nano o micro)partículas modificadas o no modificadas pueden interactuar con otras partículas/moléculas, tales como biomoléculas (por ejemplo, ADN, ARN o proteínas) en solución. El experto entiende que las propiedades termóforas de las partículas modificadas cambiarán tras la unión de las biomoléculas en solución a las biomoléculas unidas a la partícula como modificación. Tal interacción puede influir en la fuerza que actúa sobre la partícula/molécula (modificada). Mediante el ajuste de la irradiación láser IR, el movimiento resultante puede verse influenciado de tal manera que la partícula/perla queda atrapada. El "atrapamiento" de la partícula/perla, en particular partículas/perlas que comprenden biomoléculas, significa que la partícula/perla permanece dentro de una cierta posición, mostrando únicamente fluctuaciones comparativamente bajas. Estas fluctuaciones son diferentes de las fluctuaciones basadas en movimientos Brownianos. Cuando una biomolécula de solución se une a la partícula modificada biomolecularmente, la fuerza que actúa sobre la partícula/perla cambiará debido a un cambio de las propiedades termóforas, lo que puede dar como resultado el movimiento de la partícula fuera de la posición determinada donde la partícula/perla se atrapó o/y en un cambio de las fluctuaciones de la partícula/perla. El procedimiento descrito aquí se denomina "trampa termo-óptica" y es particularmente útil en ciertos ejemplos descritos en el presente documento. La "trampa termo-óptica" también se ilustra en los ejemplos y figuras adjuntos. Otros sinónimos para la "trampa termo-óptica" son "trampa optotérmica", "trampa termófora", así como "pinzas optotérmicas" o "pinzas termóforas".

Por consiguiente, un ejemplo también se refiere a una trampa optotérmica. Los términos "termo-ópticos", "termo-óptico", "optotérmico" y "opto-térmico" se utilizan como sinónimos. Este ejemplo particular ilustra que los objetivos dados, por ejemplo, perlas/partículas modificadas marcadas con fluorescencia con un tamaño de 100 nm hasta varios μm (por ejemplo, perlas de poliestireno o perlas de sílice) y vesículas y células de lípidos muestran un movimiento dirigido a la temperatura máxima de una distribución de temperatura espacial generada aplicando radiación láser IR a una solución acuosa como se ilustra en las figuras adjuntas, particularmente la figura 39.

Como se muestra en el ejemplo adjunto, los dispositivos y los procedimientos de la presente invención definida por las reivindicaciones adjuntas, también se pueden emplear para la captura termófora de moléculas o partículas, incluyendo las estructuras lipídicas (como vesículas o liposomas), así como los componentes celulares de incluso células. También se prevé que los dispositivos y procedimientos de la presente invención se pueden usar para la captura termófora de células o componentes celulares, como núcleos celulares, cromosomas, mitocondrias, cloroplastos y similares. El atrapamiento termóforo como se muestra en el presente documento, es particularmente útil para estudiar interacciones de, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, con otras proteínas, por ejemplo, interacciones anticuerpo-antígeno y similares), para estudiar eventos de transporte a través de membranas (por ejemplo, vesículas o liposomas), para la determinación de actividad de proteínas de membrana comprendidas en membranas/vesículas/liposomas biológicos, como bombas de iones, transportadores de membrana y similares. Además, la mera presencia de moléculas, partículas, liposomas, vesículas, perlas, células o componentes celulares en dicha solución puede detectarse y/o analizarse mediante el uso de los dispositivos y procedimientos de captura termóforos descritos en el presente documento. Las moléculas, partículas, vesículas, perlas, células o componentes celulares y similares atrapados termóforamente pueden transportarse y moverse dentro de la solución de análisis (véanse también las figuras adjuntas). Se prevé que las moléculas, partículas, liposomas, vesículas, perlas, células o componentes celulares atrapados termóforamente queden expuestos a diferentes soluciones de tampón para ciertas aplicaciones, es decir, el tampón en torno a las moléculas, partículas, vesículas, perlas, células o componentes celulares atrapados, etc. se pueden intercambiar y se pueden realizar mediciones correspondientes.

También se proporcionan en los ejemplos adjuntos ejemplos adicionales en el contexto del atrapamiento termóforo. Es evidente para el experto en la técnica que los conceptos de termoforesis como se divulgan en el presente documento también pueden emplearse, por ejemplo, en la clasificación de vesículas, componentes celulares (como, por ejemplo, mitocondrias, cloroplastos, núcleos, cromosomas) o incluso células enteras. Por consiguiente, el presente ejemplo también proporciona un procedimiento para atrapar termo-ópticamente moléculas, partículas,

vesículas, perlas, liposomas, células o componentes celulares, etc., comprendiendo dicho procedimiento las etapas de proporcionar una sonda de muestra con moléculas, partículas, vesículas, perlas, liposomas, células o componentes celulares (preferiblemente marcados); irradiar un haz de luz láser en la solución para obtener una distribución de temperatura espacial en el haz de luz láser irradiado; detectar opcionalmente las moléculas, partículas, vesículas, perlas, células o componentes celulares (preferiblemente marcados); y atrapar las moléculas, partículas, vesículas, liposomas, perlas, células o componentes celulares (preferentemente marcados) de acuerdo con la movilidad termófora de dichas moléculas, partículas, vesículas, perlas, células o componentes celulares. Por ejemplo, las moléculas, partículas, vesículas, perlas, células o componentes celulares (preferiblemente marcados) pueden quedar atrapados en el centro del punto de calor generado por láser (en particular cuando la movilidad termófora de las moléculas, las partículas, las vesículas, los liposomas, las perlas, las células o los componentes celulares atrapados, etc. es negativa). Sin embargo, las moléculas, partículas, vesículas, perlas, células o componentes celulares (preferiblemente marcados) también pueden quedar atrapados en una temperatura mínima (global o local), en particular, cuando la movilidad termófora de las moléculas, partículas, vesículas, perlas, células o componentes celulares atrapados, etc. es positiva. El experto en la materia es consciente de que la expresión "movilidad termófora", DT se refiere a un coeficiente que relaciona la velocidad (v) de una molécula/partícula/perla, etc. dada al gradiente de temperatura (∇T), de acuerdo con $v = -DT\nabla T$.

Los ejemplos proporcionados en el presente documento anteriormente en el contexto del procedimiento para la medición de características termo-ópticas de las partículas/moléculas, etc. en una solución, se aplican al procedimiento de atrapamiento termo-óptico de moléculas, partículas, vesículas, perlas, liposomas, células o componentes celulares, etc. *mutatis mutandis*. También se proporcionan en el presente documento dispositivos para el atrapamiento termo-óptico y también se ilustran en las figuras adjuntas, por ejemplo, el dispositivo como se muestra en la figura 19 o 24 adjunta. Un dispositivo correspondiente comprende, por consiguiente, un láser IR para irradiar un haz láser en la solución que contiene las moléculas, partículas, vesículas, perlas, liposomas, células o componentes celulares (preferiblemente marcados) a atrapar, para obtener una distribución de temperatura espacial en dicha solución en torno al haz de luz láser irradiado. Por lo tanto, dicho dispositivo para atrapar de forma termo-óptica moléculas, partículas, vesículas, perlas, liposomas, células, componentes celulares, etc., (preferiblemente marcados), puede comprender: (a) un medio de recepción para recibir moléculas, partículas, vesículas, perlas, células, componentes celulares (opcionalmente marcados), etc. dentro de una solución; (b) (opcionalmente) medios para excitar con fluorescencia las partículas marcadas; (c) (opcionalmente) medios para detectar la fluorescencia excitada en dicha solución; y (d) un láser IR para irradiar un haz de luz láser en la solución para obtener una distribución de temperatura espacial en la solución alrededor del haz de luz láser irradiado.

El movimiento de moléculas, partículas, vesículas, liposomas, perlas, células, componentes celulares, etc., puede describirse por una fuerza termófora que actúa sobre la partícula. Suponiendo un equilibrio termodinámico, esta fuerza puede derivarse de la entalpía libre de Gibbs a presión constante.

$$F = -1/2 * S_T * k_B * \text{grad}(T^2)$$

donde S_T es el coeficiente Soret y k_B la constante Boltzmann.

La temperatura T es una función de x e y : $T = T(x,y)$. Por ejemplo, en una geometría simétrica radial como la distribución de temperatura espacial generada por un láser IR enfocado (como se ilustra en las figuras adjuntas, particularmente en la Fig. 3a), puede verse fácilmente que la fuerza puede atraer una partícula al máximo de la distribución de la temperatura espacial. Si $S_T < 0$ da como resultado una fuerza que atrapa la partícula/perla objetivo dada, por ejemplo, una micropartícula de sílice, preferiblemente una micropartícula de sílice recubierta, al máximo (local o global) de la distribución de temperatura.

A diferencia de las pinzas ópticas/atrapamiento óptico que se conoce en la técnica, la trampa termo-óptica de acuerdo con el presente ejemplo se basa en diferentes principios. En lugar de usar un gradiente de campo electromagnético como se usa para el pinzamiento óptico, se utiliza un gradiente de temperatura para atrapar, mover y controlar una partícula de acuerdo con la presente invención. Por lo tanto, no es necesaria una óptica confocal sofisticada en algunos ejemplos de la trampa termo-óptica. El uso de gradientes de temperatura también permite la atracción de moléculas desde distancias de $1 \mu\text{m}$ a varios cientos de micrómetros de distancia al foco láser, dependiendo del ancho del gradiente de temperatura (por ejemplo, el ancho del foco láser IR). En comparación con la trampa termo-óptica, la región de captación para pinzas ópticas es muy estrecha del orden de unos pocos micrómetros.

Como se muestra en el Ejemplo 1 adjunto, el coeficiente de Soret S_T es una función del área superficial A de la partícula diana, por ejemplo, la perla, la carga cuadrática eficaz $\text{coeff } \sigma_{\text{eff}}$ y la entropía de hidratación específica de área de partícula S_{hyd} . Así, la fuerza termófora también será proporcional a estas propiedades de las partículas.

Si una de estas propiedades cambia (preferiblemente la carga eficaz o la entropía de hidratación), la fuerza de atrapamiento cambia también. Si cambia la fuerza de atrapamiento/el potencial de atrapamiento, también cambian las fluctuaciones (como también se ilustra en la Fig. 32 adjunta) registrando las fluctuaciones de la partícula, se puede detectar un cambio en las propiedades termóforas de la partícula y, por lo tanto, se puede detectar la unión de, por ejemplo, biomoléculas a esta partícula/perla.

En el caso de una partícula/perla, por ejemplo, una micropartícula de sílice, preferiblemente una micropartícula de sílice recubierta, más preferiblemente una micropartícula de sílice revestida con grupos especiales en su superficie (por ejemplo, proteínas). Estos grupos pueden ser capaces de unirse específicamente a proteínas, anticuerpos, moléculas pequeñas, ADN, ARN, etc. Si hay una unión de una de estas especies al grupo específico en la perla/partícula, las propiedades (por ejemplo la superficie A) de la partícula, por ejemplo, la perla, cambian, lo que puede dar como resultado un S_T diferente y, por lo tanto, una fuerza termófora diferente F (por ejemplo, el signo/dirección de la fuerza puede cambiar).

Un ejemplo particular se refiere a la medición de las fluctuaciones de tal partícula/molécula diana dada en el máximo de la distribución de la temperatura mediante la detección de su posición a través de la medición de la fluorescencia o similares. Cuando la partícula/molécula está atrapada en la distribución de temperatura, la solución a su alrededor se puede intercambiar fácilmente con una solución que contiene moléculas no marcadas o marcadas que se prevé que se unan a la partícula "atrapada", por ejemplo, al modificarse de una manera que permita la unión específica (por ejemplo, por anticuerpos). Un evento de unión puede detectarse por un cambio en la amplitud de las fluctuaciones (es decir, el potencial en el que la partícula se atrapa cambia debido a la unión de moléculas a la superficie de la partícula). Mediante la detección de las características dependientes del tiempo de la variación en la amplitud, se puede medir y establecer una cinética de unión.

En otro ejemplo particular, puede aprovecharse el cambio en el signo de S_T de la partícula diana. Si $S_T < 0$, una partícula, por ejemplo, una perla o una micropartícula de sílice fluorescente, con grupos/sitios de unión específicos, queda atrapada a la temperatura máxima en la distribución de temperatura espacial. Si S_T de la partícula diana cambia su signo tras, por ejemplo, la aglomeración o unión de los grupos de unión con moléculas, por ejemplo, moléculas pequeñas, la partícula diana se aleja forzosamente del máximo de la distribución de temperatura espacial y la partícula, por ejemplo, la perla, experimenta una repulsión en lugar de la atracción, dando lugar a un cambio cualitativo detectable del comportamiento de la partícula diana. Por ejemplo, si la fuerza cambia de atracción a repulsión, la partícula puede alejarse del máximo de la distribución espacial de la temperatura. De este modo, pueden detectarse las moléculas, por ejemplo, las moléculas pequeñas, que se unen a dichos grupos de unión en la superficie de la partícula/perla. La unión de moléculas, por ejemplo, moléculas pequeñas, se pueden medir fácilmente mediante simples procedimientos de seguimiento de partículas. La partícula puede llevarse a condiciones cercanas a un cambio de signo cambiando las condiciones del tampón (por ejemplo concentración de sal), la temperatura de la solución o por modificaciones específicas, por ejemplo, con moléculas hidrófobas o cargadas. Es evidente que la expresión "partícula diana" o "perla diana" también se refiere en este ejemplo a partículas y perlas modificadas de forma correspondiente, como partículas/perlas que comprenden o están ligadas a biomoléculas o partículas/perlas recubiertas con dichas biomoléculas. Por lo tanto, las realizaciones que se han mencionado anteriormente para "partículas/perlas" y en particular, partículas/perlas modificadas, se aplican mutatis mutandis.

La fuerza que actúa sobre la partícula diana, por ejemplo, una micropartícula de sílice recubierta con grupos especiales, se puede medir rastreando su posición mediante un procedimiento apropiado, como fluorescencia (si la partícula puede excitarse por fluorescencia), contraste de fase, interferencia, formación de imágenes en campo lejano, etc.

También es posible aplicar una segunda fuerza sobre la partícula diana, por ejemplo, una micropartícula magnética recubierta específicamente, de tal manera que la fuerza resultante es una superposición de la fuerza termófora y la segunda fuerza (por ejemplo, una fuerza magnética). La segunda fuerza puede ser, por ejemplo, una fuerza magnética (para partículas magnéticas) o una fuerza eléctrica (para partículas cargadas) o una fuerza hidrodinámica u otra fuerza óptica, como la que genera una pinza óptica.

Entonces se puede medir la superposición de fuerzas resultante, por ejemplo midiendo las fluctuaciones de la partícula (como también se ilustra en la Fig. 32 adjunta). Esta superposición puede utilizarse para aumentar la sensibilidad del procedimiento, por ejemplo, utilizando fuerzas de oposición de tal manera que un pequeño cambio en una de las propiedades de la partícula/perla diana, dará como resultado un movimiento de la partícula/perla diana, mientras que sin un cambio en las propiedades de la partícula/perla, la partícula/perla permanece en el mismo lugar. El aumento de la sensibilidad puede deberse a la posibilidad de ajuste de la segunda fuerza (por ejemplo, una fuerza magnética).

La "trampa termo-óptica" también se puede usar para mover una partícula/molécula diana, por ejemplo, una perla/partícula, en dos dimensiones perpendiculares al eje de la radiación incidente láser IR. Si el foco del láser IR se mueve, por ejemplo, mediante el uso de espejos galvanicos o un deflector óptico acústico (AOD), el máximo resultante de la distribución de la temperatura espacial también se mueve, así como la partícula/molécula/perla diana. O viceversa, la cámara se puede mover y el foco de láser IR se mantiene fijo (también como se ilustra en las figuras adjuntas, particularmente la Fig. 34).

Usando una diversidad de puntos focales láser IR, los lotes de partículas/perlas/moléculas pueden moverse simultáneamente, dando la oportunidad de multiplexar y también de combinar diferentes partículas diana, por ejemplo, micropartículas específicamente recubiertas, entre sí. Por lo tanto, si hay una partícula diana con un anticuerpo y otra partícula diana con el antígeno correspondiente, las partículas diana pueden moverse por dos focos láser IR hasta que estén en contacto y el anticuerpo se una al antígeno. De esta manera, las

partículas/moléculas diana se unen entre sí y puede crearse una composición de partículas.

De acuerdo con esta invención, también es posible generar un patrón de interferencia de la radiación láser IR, dando como resultado una rejilla espacial de máximos de temperatura. Con esta rejilla espacial de la distribución espacial de la temperatura, las partículas/moléculas diana pueden atraparse y también pueden moverse moviendo el patrón de interferencia.

Como se demuestra también en las figuras adjuntas, la presente invención es particularmente útil en la determinación de moléculas de ácido nucleico de cadena sencilla o doble (véase, por ejemplo, la figura 5 adjunta). Esto permite, entre otras cosas, determinar si una sonda/muestra dada comprende moléculas de ácido nucleico monocatenarias y/o bicatenarias. Esto es particularmente relevante en los casos en que se ha de determinar si una muestra biológica dada comprende, por ejemplo, ácidos nucleicos víricos, como ADN monocatenario o ARN monocatenario.

Como se documenta en el presente documento, un modo de realización de la presente invención se basa en el hecho de que con los medios y procedimientos de esta invención es posible medir, en intervalos de tiempo muy cortos, interacciones inter e intramoleculares. En la primera realización ilustrativa de la invención como se describe en el presente documento, se divulga un procedimiento termo-óptico que permite la detección de un amplio intervalo de temperatura (en una sonda/muestra dada) al mismo tiempo, por lo que dicho "mismo tiempo" es un intervalo de tiempo de aproximadamente 1 ms a 250 ms, en particular 80 ms a 180 ms y, como se ilustra a 150 ms, todavía, como mucho, a 250 ms. Esta primera realización ilustrativa de la invención no se basa ni está relacionada con la termoforesis. Por el contrario, la termoforesis es, en gran medida, excluida. La primera realización está relacionada, por ejemplo, con la determinación de las curvas de fusión, por ejemplo, la determinación de la curva o curvas de (punto de) fusión del ADN y la proteína. Un ejemplo no limitante de este primer modo de realización es la determinación/medición de un único polimorfismo de nucleótido, en base a como se proporciona en la figura 4 adjunta. El "punto de fusión" se define por moléculas disociadas al 50 %. Es evidente en el presente documento que el procedimiento divulgado, como se proporciona en el primer modo de realización, no se limita a la determinación de puntos de fusión de moléculas de ADN.

En una termoforesis, los efectos termóforos tienen una función, entre otros, en un tiempo predeterminado de aproximadamente 0,5 segundos a aproximadamente 250 segundos, preferiblemente de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 150 segundos, más preferiblemente de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 100 segundos, más preferiblemente de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 80 segundos, más preferiblemente de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 50 segundos e incluso más preferiblemente en aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 40 segundos, se miden y/o se detectan cambios de concentración dentro de una distribución de temperatura espacial. Aquí, los cambios de concentración y los cambios no estructurales de las partículas/moléculas a caracterizar de acuerdo con los procedimientos de la invención se miden/detectan. Los cambios estructurales en este contexto se refieren a la desnaturalización térmica mencionada en la primera realización.

El ejemplo ilustra que los cambios conformacionales y los cambios en la superficie (como el tamaño y la química) y las interacciones pueden medirse mediante caracterización termo-óptica debido a que las propiedades termóforas están alteradas. Además, los dispositivos de "atrapamiento" termo-ópticos son ilustrativos para este ejemplo.

También se ilustran ilustraciones correspondientes de la utilidad de este ejemplo en los ejemplos adjuntos, por ejemplo, la determinación del radio hidrodinámico y la interacción entre proteínas, la detección de interacciones entre biomoléculas y la discriminación de ácidos nucleicos por tamaño, la detección de la unión de moléculas a partículas, la investigación de la conformación, estructura y superficie de las (bio)moléculas, la detección de cambios de conformación, como el plegado/despliegue de biomoléculas, el atrapamiento de partículas (por ejemplo, el atrapamiento de estructuras o lípidos vesiculares) o (bio)moléculas, y la detección de modificaciones covalentes y no covalentes de partículas.

Se documenta y se ilustra en el presente documento a continuación que, por ejemplo, la termoforesis de ácidos nucleicos (en particular del ADN) es dependiente de la longitud/tamaño y los medios y procedimientos proporcionados en el presente documento permiten la determinación y elucidación de ADN monocatenario frente a bicatenario, así como la determinación también de ácidos nucleicos pequeños de hasta por ejemplo, 100, 300, 1000 o 5000 nucleótidos o pares de bases. Un ejemplo no limitante se ilustra en la figura 5 adjunta, en la que la movilidad en un gradiente de temperatura se mide por los medios y procedimientos proporcionados en el presente documento. Aquí, se muestra que, en particular, el segundo modo de realización de esta invención permite la verificación distintiva entre longitud/tamaño (en el ejemplo particular 20mer frente a 50mer) y/o el "tipo de cadena" de las moléculas de ácido nucleico (en el ejemplo particular, ADN monocatenario frente a ADN bicatenario). De nuevo, tampoco esta segunda realización ilustrativa de la presente invención no está limitada a la detección de ADN corto o a la determinación de moléculas de ácido nucleico monocatenario o bicatenario. Además, pueden medirse las interacciones entre partículas/moléculas, conformaciones, radios hidrodinámicos, cinética de unión y estabildades de partículas/moléculas, por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN, ARN, PNA, LNA), nanopartículas, perlas, particularmente micropérlas, lípidos, liposomas, vesículas, células, biopolímeros (ácido hialurónico, alginato y similares), láminas lipídicas bidimensionales, sustancias inorgánicas (por ejemplo, nanotubos

de carbono, buckyballs, etc.), polietilenglicol (PEG). Las moléculas que se han mencionado anteriormente muestran, por ejemplo, diferencias en la estabilidad de la temperatura. Los intervalos de temperatura específicos de las moléculas ilustrativas para la medición de las respectivas propiedades termo-ópticas se dan en la Tabla 1.

5 Los ejemplos de usos de los medios, procedimientos y dispositivos divulgados en el presente documento no han de ser considerados como limitantes e ilustran la invención. En particular, la presente invención definida por las reivindicaciones adjuntas, y sus correspondientes medios y procedimientos no se limitan al uso de la detección, medición y/o verificación de biomoléculas, como ácidos nucleicos o proteínas/estructuras proteínicas. Como es evidente a partir de la invención como se divulga en el presente documento, dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas, también se puede adaptar cualquier sistema sensible a la temperatura a los
10 procedimientos y dispositivos divulgados en el presente documento.

Por ejemplo, es factible medir también reacciones químicas, como reacciones inorgánicas u orgánicas.

El experto en la técnica es consciente de que la invención, como se divulga en el presente documento, sólo está restringida por el hecho de que la reacción a medir, detectar, verificar y evaluar tiene que tener lugar en una solución que puede calentarse ópticamente mediante luz láser.

15 En algunos modos de realización, el dispositivo de acuerdo con la presente invención se basa en una configuración de microscopía de fluorescencia con un medio de excitación, por ejemplo, un diodo emisor de luz (LED) para la excitación, un conjunto de filtros de excitación/emisión, un soporte de muestras para una cámara de microfluidos y una cámara CCD rápida para el registro espacial resuelto de la intensidad de fluorescencia. Esta configuración de microscopía de fluorescencia está bien establecida en las ciencias biológicas y otras áreas. De acuerdo con un modo de realización ejemplar de la presente invención, tal configuración común se extiende mediante un láser infrarrojo (IR) cuya radiación está enfocada. El láser puede estar dispuesto por debajo del porta-muestras de modo que la radiación se enfoca desde debajo del porta-muestras hasta la cámara de microfluidos mediante una lente corregida por infrarrojos (como se ilustra en las figuras adjuntas, particularmente la Fig. 1). Sin embargo, de acuerdo con la invención, el láser, el medio de detección y el medio de excitación pueden disponerse en un lado común del porta-muestras, por ejemplo, por debajo del porta-muestras como se representa, por ejemplo, en la Fig. 2. En un modo de realización ejemplar, el portamuestras se une al objetivo. Tal configuración evita movimientos relativos del porta-muestras con respecto al objetivo. De acuerdo con un modo de realización adicional, es posible mover el láser libremente en el plano del objeto usando dos espejos de infrarrojos impulsados por tensión. Además, es ventajoso el uso de películas líquidas delgadas (aprox. de 1 μm a 500 μm , preferiblemente de 1 μm a 50 μm , más preferiblemente de 1 μm a 20 μm , aún más preferiblemente de 1 μm a 10 μm), por ejemplo, en cámaras de líquido fino, de soluciones de biomoléculas con radiación IR coherente local. Sin embargo, el procedimiento de la presente invención no está limitado a cámaras de líquido fino. Es posible una extensión a μl gotas o nl gotas de soluciones acuosas, capilares y placas de micro-pocillos como se ilustra en las figuras adjuntas, por ejemplo, la Figura 2 y 16 a 24. De acuerdo con otra realización ejemplar, el calentamiento por infrarrojos y la detección de fluorescencia se realizan a través del mismo objetivo, lo que hace que la configuración sea mucho más flexible y compacta (véase, por ejemplo, la Figura 2 y 16 a 24). El uso de un objetivo para enfocar tanto la radiación electromagnética de la parte infrarroja como visible del espectro comprende la necesidad de que el objetivo lo haga ambas con alta calidad óptica. En particular, la radiación infrarroja no debe presentar una dispersión fuerte por el objetivo. Una dispersión fuerte conducirá a una compensación de alta temperatura y un gradiente de temperatura comparativamente fuerte a distancias desde el centro caliente. Esta situación se evita en algunas realizaciones descritas aquí. La fuerte dispersión aumenta el tiempo de medición y disminuye la precisión. Sin quedar limitado a la teoría, esto puede deberse a un aumento de la escala de longitud donde la termoforesis es fuerte, por lo que el sistema necesita más tiempo para alcanzar el estado estacionario. El segundo efecto puede deberse al hecho de que la corrección de blanqueo no lineal sólo es precisa si la termoforesis es despreciable a mayor distancia del punto de calor. Esto se logra cuando la difracción de la radiación infrarroja es baja. Por consiguiente, y de acuerdo con esta invención, sólo se puede usar una dirección en el espacio para la detección y la manipulación. El procedimiento descrito y los dispositivos divulgados en el presente documento pueden integrarse en instrumentos establecidos y sistemas de alto rendimiento.

50 El agua muestra una fuerte absorción de radiación en el régimen de infrarrojos mayor de 1200 nm. La energía absorbida se convierte en calor. Las lentes coherentes LÁSER IR e IR permiten la creación de una densidad de potencia muy alta de la radiación infrarroja en solución. Mediante el control de la óptica LÁSER, el foco LÁSER se puede mover y cambiar. Esto incluye la óptica que cambia la relación de aspecto del haz láser radial simétrico para producir un foco en forma de línea. Esto es particularmente útil si las mediciones se realizan en un capilar. Puesto que toda la sección transversal se calienta homogéneamente, sólo existe un perfil de temperatura espacial a lo largo de la longitud del capilar. Un gradiente de temperatura en una única dirección de espacio aumenta la precisión de la medición ya que se pueden promediar todos los píxeles con la misma distancia desde el centro caliente. En particular, esto permite el uso de una cámara CCD con una única línea de píxeles. En este caso, la integración de fluorescencia se obtiene por hardware. Usando un fotodiodo o fotomultiplicador, se mide la fluorescencia de un elemento de volumen finito (es decir, del centro del punto/línea de calor), sin ninguna resolución espacial. Una resolución espacial de detección de fluorescencia sólo es necesaria en los casos en los que el radio hidrodinámico es la propiedad termo-óptica de interés. La técnica de calentamiento óptico permite la creación de amplias distribuciones de temperatura y gradientes de temperatura fuertes a escala micrométrica. En la posición del foco

LÁSER se encuentra la temperatura más alta. Este límite de temperatura superior puede ajustarse controlando la potencia del LÁSER y la forma del foco láser. Con el aumento de la distancia al foco láser, la temperatura de una solución acuosa está disminuyendo debido a la conductividad térmica. El límite inferior de la temperatura puede fijarse por la temperatura del material de la cámara circundante. Este material puede enfriarse, por ejemplo, hasta 0 °C. De esta manera, es posible generar una distribución de temperatura que contenga todas las temperaturas entre 100 °C (con alta potencia láser) en el foco láser y 0 °C a mayores distancias con respecto al punto de calor.

Con el procedimiento de la presente invención, es posible calentar y analizar soluciones, en particular soluciones acuosas de una manera termo-óptica. No hay necesidad de materiales conductores de calor como transductores de calor de un elemento de calentamiento (alambre de cobre, Peltiers, etc.). La propia solución se calienta directamente mediante la luz LÁSER. Debido a que el enfoque por láser sólo está limitado por difracción, se pueden observar simultáneamente distribuciones de temperatura que abarquen todas las temperaturas entre 0 °C y 100 °C (la fase líquida completa del agua) en una escala de longitud de unos pocos cientos de micrómetros.

Con el procedimiento de la presente invención, las mediciones son 3000-10000 veces más rápidas que los sistemas de medición disponibles más rápidos conocidos en la técnica. El procedimiento de la presente invención permite obtener todas las temperaturas entre 0 °C y 100 °C al mismo tiempo ya que se utiliza una distribución de temperatura espacial. La temperatura no se crea por contacto con un elemento de calentamiento, sino dentro de la propia muestra. Mediante el uso de la óptica de exploración infrarroja, se pueden crear patrones de temperatura bidimensionales arbitrarios en solución. De esta manera, cualquier estructuración de la superficie está obsoleta. Además, todos los materiales transparentes para la radiación en el infrarrojo se pueden utilizar para construir una cámara de medición de microfluidos (vidrio, zafiro, plástico, silicio, cristales).

Además, el procedimiento de la presente invención también se puede usar para crear distribuciones de temperatura en la solución acuosa cerca de una superficie. Debido a la continuidad de la temperatura, la superficie también adopta una distribución de temperatura. Por lo tanto, es posible calentar tanto la superficie, como la solución. Una posible aplicación es el análisis de micromatrices de ADN. Se pueden usar gradientes de temperatura cercanos a una superficie para mover moléculas hacia una superficie o lejos de una superficie. Estos cambios de concentración locales pueden medirse precisamente por el sistema de fluorescencia de reflexión interna total (TIRF) mostrado en las figuras adjuntas, particularmente las figuras 24 y 36, o cualquier sistema óptico (1) con capacidad para realizar una TIRF. Este movimiento termóforo en la dirección de la luz láser incidente puede usarse para dirigir moléculas a una estructura de microfluído para capturarlas y/o concentrarlas. Por lo tanto, los gradientes de temperatura generados de acuerdo con la presente invención también pueden usarse para capturar y/o concentrar moléculas/partículas. La captura y concentración de moléculas/partículas depende de sus propiedades termo-ópticas (por ejemplo, el signo del efecto termóforo).

Una manera de suprimir los efectos secundarios relacionados con las temperaturas no homogéneas en solución puede suprimirse eligiendo la geometría de la cámara de microfluidos correcta. Por ejemplo, la convección se aborda utilizando sólo una fina lámina de líquido. Esto también significa que es ventajoso para mediciones reproducibles y precisas que la altura de la lámina delgada de líquido no varíe de una medición a otra. La velocidad del flujo convectivo, que va acompañada de la distribución espacial de la temperatura, depende cuadráticamente de la altura de la lámina líquida. Esta no linealidad significa que cambios ligeros en la altura de la cámara conducen a cambios comparativamente fuertes en la velocidad del flujo convectivo, que a su vez efectúa el perfil de concentración y de temperatura de una manera muy complicada. Por lo tanto, los experimentos se realizan preferiblemente en cámaras de medición de microfluído de altura definida (por ejemplo, capilares). Puesto que, de acuerdo con los medios y procedimientos de esta invención, la temperatura se genera en el presente documento por la generación de calor debido al proceso de absorción, la altura constante también es ventajosa para obtener distribuciones de temperatura reproducibles. Las diferencias de altura conducirán a desviaciones debidas a las diferencias en la cantidad de energía absorbida y a las diferencias en la relación volumen/superficie. Esta relación determina la velocidad de transferencia de calor al entorno y, por lo tanto, también la distribución de temperatura en solución. La reproducibilidad del perfil de temperatura determina la máxima precisión de medición posible.

Otra manera es medir aún más rápido para evitar perturbaciones por convección abriendo la posibilidad de medir en gotas únicas o placas de micro-pocillos (lámina de líquido más gruesa). Dado que el láser IR se absorbe en una escala de longitud de 300 μm (1/e) de muestras delgadas, por ejemplo, se calientan las cámaras finas homogéneamente en la dirección z (altura).

Por consiguiente, la presente invención proporciona un procedimiento mejorado para medir interacciones inter y/o intramoleculares de partículas/moléculas en una solución, como se define en la reivindicación 1 adjunta, con las etapas de (a) proporcionar una sonda de muestra con partículas/moléculas marcadas en una solución; (b) excitar con fluorescencia dichas partículas marcadas y, en primer lugar, detectar la fluorescencia de dichas partículas/moléculas excitadas; (c) irradiar un haz de luz láser en la solución para obtener una distribución de temperatura espacial en la solución alrededor del haz de luz láser irradiado; (d) detectar en segundo lugar una fluorescencia de las partículas/moléculas en la solución en un tiempo predeterminado después de que se ha iniciado la irradiación del láser en la solución, y caracterizar las interacciones inter y/o intramoleculares de partículas/moléculas en base a dichas dos detecciones, en las que la irradiación del láser y la detección de la fluorescencia se realiza desde el mismo lado con respecto a la sonda de muestra.

En una realización ejemplar, el tiempo predeterminado está dentro del intervalo de 1 ms a 250 ms. Preferiblemente, el tiempo de detección está en el intervalo de 1 ms a 50 ms. En una realización particular, el haz láser está desenfocado de tal forma que un gradiente de temperatura en la distribución de temperatura está en el intervalo de 0,0 a 2 K/ μm , preferiblemente de 0,0 a 5 K/ μm . Preferiblemente, el haz láser se irradia a través de un elemento óptico en la solución. En una realización particular, el elemento óptico es una única lente. En una realización particular de la invención, el procedimiento comprende además la etapa de medir la distribución de temperatura en la solución en torno al haz irradiado con un colorante sensible a la temperatura. La distribución de temperatura se puede determinar basándose en la fluorescencia detectada del colorante sensible a la temperatura, en el que la solución que comprende dicho colorante sensible a la temperatura se calienta por el haz de rayos láser irradiado y la intensidad de fluorescencia espacial de fluorescencia se mide sustancialmente perpendicular alrededor del haz láser. En un modo de realización ejemplar adicional, el tiempo predeterminado está dentro del intervalo de 0,5 s a 250 s. Preferiblemente, en dicho cambio o cambios de concentración de tiempo predeterminado en la distribución de temperatura espacial en la solución debido a efectos termóforos y tal cambio o cambios de concentración se detectan por un cambio en la distribución de fluorescencia. En algunos modos de realización, el haz láser se enfoca de tal manera que se consigue un gradiente de temperatura dentro de la distribución de temperatura en el intervalo de 0,001 a 10 K/ μm . En un modo de realización ejemplar adicional de la invención, se detecta fluorescencia con una cámara CCD. En algunas realizaciones ejemplares, el brillo de dicha fluorescencia se detecta con un fotodiodo o un único píxel con el CCD en el centro del haz láser. En otros modos de realización ejemplares adicionales, las partículas son biomoléculas y/o nanopartículas y/o micropérlas y/o combinaciones de las mismas. En realizaciones particulares, la luz láser está dentro del intervalo de 1200 nm a 2000 nm. Preferiblemente, el láser es un láser de alta potencia dentro del intervalo de 0,1 W a 10 W, más preferiblemente de 0,1 W a 10 W, aún más preferiblemente de 4 W a 6 W. En algunos modos de realización ejemplares, la solución es una solución acuosa con una concentración de partícula dentro del intervalo de 1 atto Molar (micropérlas de partículas individuales) a 1 M, preferiblemente de 1 atto Molar a 100 μM olar. Particularmente, la solución es una solución salina con concentraciones en el intervalo de 0 a 1 M. Preferiblemente, la distribución espacial de la temperatura está entre 0,1 $^{\circ}\text{C}$ y 100 $^{\circ}\text{C}$. En modos de realización preferidos, el gradiente de temperatura se crea dentro de 0,1 μm a 500 μm de diámetro alrededor del haz láser. La irradiación del láser y la detección de la fluorescencia se realiza según la invención desde el mismo lado con respecto a la sonda de muestra. Preferiblemente, la solución se proporciona con un espesor en la dirección del haz de luz láser de 1 μm a 500 μm . En modos de realización particulares, se detecta la fluorescencia dentro de un intervalo de 1 μm a 500 μm , en particular de 50 nm a 500 μm en la dirección del haz láser. Preferiblemente, la fluorescencia se detecta sustancialmente perpendicular con respecto al haz de luz láser con una cámara CCD. Mas preferiblemente, la segunda detección de fluorescencia es la medición espacial de la fluorescencia en función de la distribución de la temperatura sustancialmente perpendicular con respecto al haz de luz láser. En modos de realización preferidos, la solución de muestra se encuentra en un capilar.

La presente invención también proporciona un dispositivo para medir las interacciones inter y/o intramoleculares de partículas en una solución como se define en la reivindicación 26 adjunta y como se describe en cualquiera de los modos de realización anteriores, en el que el dispositivo comprende: un medio de recepción para recibir partículas marcadas dentro de una solución; medios para excitar con fluorescencia las partículas marcadas; medios para detectar la fluorescencia excitada en dicha solución; un láser para irradiar un haz de luz láser en la solución para obtener una distribución de temperatura espacial en la solución alrededor del haz de luz láser irradiado, en el que el láser y los medios para detectar la fluorescencia excitada se disponen en el mismo lado con respecto a los medios de recepción.

En algunas realizaciones ejemplares, los medios para excitar con fluorescencia las partículas marcadas son un LED. Preferiblemente, el láser es un láser de alta potencia dentro del intervalo de 0,1 W a 10 W, preferiblemente de 1 W a 10 W, más preferiblemente de 4 W a 6 W. En un modo de realización más preferido, el dispositivo comprende además una óptica para enfocar o desenfocar el haz láser. Preferiblemente, la óptica es una lente única. En realizaciones preferidas, el medio de detección es una cámara CCD. En algún modo de realización preferido, la cámara CCD es una cámara CCD de línea. En realizaciones particulares, la detección es unidimensional a lo largo de la longitud de un capilar. En otro modo de realización particular, el medio de detección es un fotodiodo.

La presente invención también se refiere al uso de los procedimientos y los dispositivos descritos en cualquiera de los modos de realización realizaciones anteriores para detectar y/o medir las características de partículas y/o moléculas en solución. Las moléculas a detectar, medir o caracterizar de acuerdo con esta invención también pueden ser candidatos a fármacos.

En realizaciones particulares de la invención, las características a detectar o medir de acuerdo con esta invención se seleccionan del grupo de estabilidad, longitud, tamaño, conformación, carga, interacción, formación de complejos y modificación química de partículas. En los modos de realización preferidos, las partículas a medir se seleccionan del grupo que consiste en una molécula, biomolécula(s), nanopartículas, pérlas, micropérlas, una sustancia(s) orgánica(s), una sustancia(s) inorgánica(s) y/o combinaciones de éstos. Preferiblemente, dicha partícula se selecciona del grupo que consiste en una (bio)molécula(s), nanopartículas, micropartículas, micropérlas, una sustancia(s) orgánica(s), una sustancia(s) inorgánica(s) y/o combinaciones de estos. Más preferiblemente, la (bio)molécula se selecciona del grupo que consiste en una proteína(s), un péptido(s), un ácido(s) nucleico(s) (es decir, ARN (por ejemplo ARNm, ARNt, ARNr, snRNA, siRNA, miRNA), ADN), uno o más aptámeros de ARN, un

anticuerpo/anticuerpos (o fragmentos o derivados de los mismos), una o más moléculas de fusión de ácido nucleico a proteína, PNA, uno o más ADN bloqueados (LNA) y un biopolímero(s) (polímero de azúcar, ácidos hialurónicos, alginato, etc.). Además, las interacciones intra o intermoleculares, por ejemplo, plegado de proteínas/desplegado, están dentro del alcance de la invención.

5 Un ejemplo se refiere a un procedimiento para medir termo-ópticamente las características físicas, químicas o biológicas de partículas/moléculas en una solución con las etapas de (a) proporcionar una sonda de muestra con partículas/moléculas marcadas en una solución en un capilar; (b) excitar con fluorescencia dichas partículas/moléculas marcadas y detectar en primer lugar la fluorescencia de dichas partículas/moléculas excitadas unidimensionalmente a lo largo de la longitud del capilar; (c) irradiar un haz de luz láser en la solución para obtener una distribución de temperatura lineal en la solución alrededor del haz de luz láser irradiado a lo largo de la longitud del capilar; y (d) detectar en segundo lugar una fluorescencia de las partículas/moléculas en la solución en un tiempo predeterminado después de que se ha iniciado la irradiación del láser en la solución, y caracterizar las partículas basándose en dichas dos detecciones.

15 Un ejemplo proporciona un dispositivo particular para medir termo-ópticamente las características físicas, químicas o biológicas de partículas/moléculas en una solución como se describe en cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que el dispositivo comprende: un capilar para recibir partículas/moléculas marcadas dentro de una solución; medios para excitar con fluorescencia las partículas/moléculas marcadas; medios para detectar la fluorescencia excitada en dicha solución de manera unidimensional a lo largo de la longitud de dicho capilar; un láser para irradiar un haz de luz láser en la solución para obtener una distribución de temperatura lineal en la solución alrededor del haz de luz láser irradiado.

20 El dispositivo de acuerdo con la presente invención con un microscopio de fluorescencia y calentamiento láser infrarrojo local también se puede usar para medir el efecto de los gradientes de temperatura (es decir, temperatura en homogeneidades) en moléculas disueltas (véase el segundo modo de realización de la presente invención). Casi todas las moléculas disueltas comienzan a moverse en un gradiente de temperatura, ya sea a regiones calientes o frías. Este efecto se denomina termoforesis o efecto Soret y se conoce desde hace 150 años. Pero el mecanismo del movimiento de las moléculas en los líquidos permaneció incierto. Recientemente se ha dado un importante paso hacia una comprensión teórica de la termoforesis en líquidos.

25 Con el procedimiento y el dispositivo según la invención, la estabilidad, la conformación, el tamaño y/o la longitud de las moléculas, en particular las biomoléculas, se pueden caracterizar y/o determinar. La interacción de (bio)moléculas con otras moléculas o partículas, por ejemplo, (bio)moléculas, nanopartículas o perlas adicionales, por ejemplo, microperlas, se caracteriza en realizaciones particulares de la invención. Las moléculas a analizar también pueden estar unidas (por ejemplo covalentemente o no covalentemente) a perlas o partículas, por ejemplo, las perlas o partículas pueden recubrirse con moléculas (por ejemplo, biomoléculas) a analizar, caracterizadas de acuerdo con esta invención.

30 A continuación, se analizarán dos procedimientos ilustrativos de acuerdo con la presente invención que se basan en un protocolo de medición muy similar pero analizan parámetros de moléculas muy diferentes. Sólo en el procedimiento de la segunda realización ilustrativa de la presente invención se utiliza el movimiento termóforo de las partículas. En el procedimiento de la primera realización ilustrativa, este efecto debe excluirse. Además, se explicarán en detalle realizaciones particulares de la presente invención con referencia a las figuras y con referencia a los ejemplos detallados adjuntos. Dichas referencias a las figuras y ejemplos no se consideran limitantes.

Primer modo de realización ilustrativo de la invención

35 El procedimiento de acuerdo con una primera realización ilustrativa es, en particular, útil en una medición de la estabilidad de la temperatura de las moléculas, en particular, las biomoléculas. Sin embargo, ha de apreciarse de nuevo que los medios y procedimientos proporcionados en el presente documento no se limitan a la detección, verificación y/o medición de biomoléculas. El procedimiento descrito e ilustrado como un ejemplo no limitante, a continuación permite, por ejemplo, la medición de las temperaturas de fusión (figura 3) (estabilidad, parámetros termodinámicos como dS (cambio de entropía), dH (cambio de entalpía) y dG (cambio en la energía libre de Gibbs)) de biomoléculas (las proteínas, (ds)RNA bicatenario, dsDNA que era una cadena de ácido nucleico también pueden estar unidos a una (nano)partícula, microperlas, superficie, etc.). Con dicho procedimiento se han realizado mediciones de curvas de fusión de dsDNA y horquillas de ADN. Los resultados son muy bien comparables con los respectivos valores bibliográficos. Como se ha mencionado anteriormente, la presente invención es particularmente útil en la medición de biomoléculas en general. De forma ilustrativa, se muestra en la presente que, por ejemplo, los SNP (polimorfismos de un único nucleótido) en las cadenas de ADN (cortas) pueden detectarse fácilmente (véase también la figura 4).

40 A continuación se explicará una realización particular del primera procedimiento ilustrativo. Los ácidos nucleicos con una etiqueta de fluorescencia se dan en una cámara de microfluidos fina (es decir, por ejemplo, 40 μm , 20 μm , 10 μm , o 5 μm , preferiblemente 20 μm). La modificación de ácidos nucleicos con etiquetas, como marcadores fluorescentes es una técnica bien establecida que se usa ampliamente. Antes de que comience el calentamiento, se observa la fluorescencia para determinar el nivel de fluorescencia del 100 % de moléculas no fundidas. Es

importante que la etiqueta de fluorescencia usada reaccione sobre la fusión de las dos cadenas de ADN (o las cadenas de ARN o la estructura proteica, o la fluorescencia de una nanopartícula reaccione si el ssDNA/ARN o dsDNA/ARN se unen a esta). Esto puede realizarse utilizando, por ejemplo, un par fluoróforo/supresor (par donante/supresor, particularmente par donante/ceptor: Transferencia de energía (ET), por ejemplo, transferencia de energía de resonancia (RET), particularmente transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET)) o por la disociación de una tinción de ácido nucleico intercalante (por ejemplo, SYBR verde/POPO/YOYO) o una tinción de proteína (por ejemplo, SYPRO naranja (Invitrogen)). En el caso de, por ejemplo, nanopartículas de oro, la fluorescencia cambia cambiando el índice de difracción por unión al ADN. El láser acoplado al microscopio se desenfoca y se ajusta de tal manera que los gradientes de temperatura son lo suficientemente bajos para disminuir la deriva de partículas termóforas a valores despreciables. Al mismo tiempo, el enfoque debe ser lo suficientemente ajustado para alcanzar la temperatura lo suficientemente alta como para fundir las moléculas. Las mediciones se realizan en algunos modos de realización particulares realizadas con alta resolución temporal en el rango de microsegundos, ya que la medición tiene que realizarse en un lapso de tiempo en el que el movimiento termóforo sigue siendo insignificante pero se completa el proceso de calentamiento de la cámara de microfluidos. La medición depende en gran medida de las condiciones experimentales. Los datos necesarios para determinar la temperatura de fusión se obtienen típicamente en 200 ms, en 150 ms, en 100 ms o en 50 ms, preferiblemente en 150 ms. Esto es muy sorprendente y apoya la esencia de esta invención. Incluso son posibles períodos de tiempo más cortos. En el contexto de esta invención, por ejemplo, para una discriminación cualitativa de diferentes especies o ácidos nucleicos. Se toma una primera imagen antes de encender el láser IR para obtener el nivel de fluorescencia del 100 % en moléculas no fundidas. Una segunda imagen se toma 100 ms, preferiblemente 50 ms, más preferiblemente 40 ms después de que el láser se encienda (si la cámara ha alcanzado su temperatura de estado estacionario). Estas dos imágenes contienen toda la información necesaria. La primera imagen contiene la fluorescencia de la molécula no fundida. La imagen tomada mientras el láser está encendido permite observar el porcentaje de moléculas fundidas a diferentes temperaturas simultáneamente, que varían del 0 % lejos del punto de calor (frío) hasta el 100 % en el centro del punto de calor (caliente). A partir de una medición independiente, se conocen las temperaturas de todos los píxeles en el experimento de fusión. Trazar el porcentaje de, es decir, las cadenas de ADN fundidas frente a la temperatura, permite determinar la estabilidad de la molécula (es decir, la temperatura de fusión) y derivar los parámetros termodinámicos.

En resumen, la primera realización ilustrativa de la presente invención conecta la medición de una distribución de temperatura espacial en la escala micrométrica con la medición de las reacciones químicas/bioquímicas dependientes de la temperatura y las interacciones dependientes de la temperatura entre moléculas/biomoléculas/nanocristales/micropérlas. Para las mediciones, son importantes las temperaturas absolutas, no los gradientes de temperatura. Se puede considerar cada volumen de detección (mapeado en un CCD-cámara-píxel) como un microrreactor. Para la medición es muy importante que cada molécula permanezca en este microrreactor durante el tiempo de medición. Por lo tanto, la medición debe ser tan rápida como para evitar que la termoforesis y la convección muevan la partícula fuera del área tratada como microrreactor. Este requisito se cumple con un tiempo de medición de 150 ms.

Con el procedimiento y el dispositivo de acuerdo con la primera realización ilustrativa, se puede discriminar entre moléculas dsDNA con un único desajuste de nucleótidos (SNP, polimorfismo de un único nucleótido), así como diferencias dependientes de la sal y dependientes de la longitud en la estabilidad. Las diferencias en las estabilidades también se pueden medir para las horquillas de dsRNA, ADN y ARN (emparejamiento de bases de ssDNA/ARN consigo mismos) y proteínas. También se puede medir la influencia de diferentes sistemas de tapones acuosos en la estabilidad (pH, concentración de sales, valencia de iones). Las biomoléculas también pueden acoplarse a (nano)partículas, (micro)perlas. La fluorescencia de estas partículas modificadas cambia dependiendo de si, por ejemplo, ssDNA/RNA o dsDNA/RNA (u otras biomoléculas) están unidos a ésta. El calentamiento de tales soluciones conduce al mismo resultado sin la necesidad de marcadores fluorescentes específicos unidos a la biomolécula. Además de una discriminación cualitativa, también es posible un análisis termodinámico cuantitativo. Dado que los tiempos de medición están, en algunos casos, por debajo de los tiempos de relajación de las reacciones intermoleculares, no es posible determinar directamente en todos los casos los parámetros termodinámicos como dS (cambio de entropía), dH (cambio de entalpía) y dG (cambio de energía libre de Gibbs). Sin embargo, al utilizar la termodinámica de no equilibrio, estos pueden calcularse fácilmente. Para la discriminación cualitativa de (es decir) polimorfismos de un único nucleótido, trabajar en condiciones de no equilibrio puede aumentar las diferencias medidas en la estabilidad de las moléculas comparadas. La medición de los desajustes en las secuencias de nucleótidos es de gran importancia en el diagnóstico médico. El procedimiento permite identificar enfermedades hereditarias. También puede usarse en detecciones farmacéuticas de alto rendimiento para la unión de compuestos de bajo peso molecular a ácidos nucleicos. Además, la fusión de ácidos nucleicos bicatenarios (ds) permite determinar su longitud.

Las curvas de fusión medidas de la presente invención reproducen los resultados medidos por técnicas establecidas, pero hasta 3000 veces más rápido que los procedimientos basados en el baño Peltier o de calentamiento, como los procedimientos de ciclador de PCR o fluorímetro. El procedimiento de la invención es mucho más rápido, ya que no es necesario calentar el volumen por contacto directo, y la reacción de las moléculas a una temperatura específica entre 0 °C y 100 °C se observa al mismo tiempo. De nuevo, la esencia de esta realización es que las temperaturas se generan y se miden con resolución espacial en lugar de temporal. No hay

retrasos debido a los tiempos de calentamiento y enfriamiento, lo que hace que el procedimiento de la presente invención sea muy rápido. Al mismo tiempo, sólo se utilizan láminas delgadas de líquidos que disminuyen el volumen de muestra necesario. Además la manipulación y el análisis de las moléculas se produce ópticamente sin el riesgo de contaminación. Esto es esencial si el análisis se combina con reacciones de PCR en las que cualquier contaminación con, por ejemplo, ADN humano, hace imposible un análisis.

Mediante la realización de la desnaturalización térmica en, por ejemplo, 100 ms, preferiblemente 50 ms, es posible medir el efecto de las sustancias sobre la estabilidad de ADN/proteína que son sensibles a temperaturas elevadas (por ejemplo, proteínas de unión a ADN, sustancias como monofosfato de adenosina cíclico (cAMP)). Estas sustancias se dañarán o se degradarán en un experimento con técnicas de la técnica anterior y no es detectable un efecto sobre la estabilidad térmica con tales técnicas de la técnica anterior.

Dentro de la distribución espacial de la temperatura hay gradientes de temperatura. Si el tiempo de medición es más largo de 150 ms (para el espesor de cámara aquí propuesto de, por ejemplo, 20 μm), se puede medir el movimiento termóforo de las biomoléculas (moléculas, nanopartículas, microperlas). A partir de estas mediciones se puede recopilar información adicional.

Segundo modo de realización ilustrativo de la invención

El procedimiento de acuerdo con un segundo modo de realización ilustrativo (es decir, el procedimiento que se ha mencionado anteriormente relativo a mediciones en el que el tiempo predeterminado en dicha segunda detección del procedimiento de la invención está dentro de un intervalo de 0,5 segundos a 250 segundos, preferiblemente dentro de un intervalo de 0,5 s a 50 s, más preferiblemente dentro de un intervalo de 0,5 s a 40 s) es particularmente útil para medir la movilidad de las moléculas en un gradiente de temperatura y su uso para la caracterización de biomoléculas. El procedimiento del primer modo de realización que se ha descrito anteriormente analiza moléculas en una distribución de temperatura en una corta escala de tiempo de milisegundos. Los efectos dinámicos, como la termoforesis, pueden insignificantes en este corto intervalo de tiempo. Si se observan las moléculas durante un período de tiempo en el orden de segundos, la termoforesis se establece y las moléculas comienzan a moverse en el gradiente de temperatura. Este efecto conduce las moléculas análogas a la electroforesis a lo largo de un gradiente a temperaturas más bajas (en algunos casos también se observa lo contrario). La velocidad de las moléculas es directamente proporcional al gradiente de temperatura con un coeficiente específico para la molécula D_T (movilidad termófora): $v = -D_T \nabla T$.

Inesperadamente, las movilidades termóforas de los biopolímeros varían fuertemente con la longitud de la cadena/molécula.

La movilidad termófora de estas moléculas varía fuertemente con los parámetros de moléculas que cambian la entropía de solvatación, tamaño, carga, tipo de superficie, el tamaño de la superficie, radio hidrodinámico etc. Esto abre la posibilidad de discriminar biomoléculas y detectar una interacción entre ellas (también entre nanopartículas/microperlas y biomoléculas) (como se ilustra en las figuras adjuntas, particularmente la Figura 4).

Dado que la termoforesis acumula gradientes de concentración, el efecto se contrarresta por una difusión ordinaria. La interacción entre estos dos efectos conduce a un perfil de concentración de estado estacionario

$$\frac{c}{c_0} = \exp[-S_T \times \Delta T]$$

que se expresa mediante la siguiente ecuación $\frac{c}{c_0}$. La concentración en cualquier punto dado en una distribución de temperatura depende únicamente de la diferencia de temperatura y no del gradiente de temperatura. El cociente de la movilidad termófora D_T y la constante de difusión ordinaria D se denomina coeficiente de Soret S_T y describe la magnitud de la termoforesis en estado estacionario. Depende exponencialmente de la diferencia de temperatura. Por lo tanto, la precisión de la medición depende en gran medida de la reproducibilidad del perfil de temperatura.

Un procedimiento de medición típico de acuerdo con el segundo modo de realización se describirá a continuación. Al principio se toma una imagen sin calentamiento LÁSER IR para determinar la intensidad de fluorescencia del nivel de concentración relativa del 100 %. A continuación, se enciende el LÁSER. En esta configuración experimental, es posible enfocar el láser firmemente con una anchura media por debajo de 6 μm para crear gradientes de temperatura fuertes o usarlo desenfocado (como se ha descrito anteriormente con una anchura media de perfil de temperatura de, por ejemplo, 200 μm). Esto influye en la velocidad de las moléculas y la rapidez con la que se alcanza el estado estacionario. El aumento de temperatura necesario varía entre 0,1 °C y 80 °C por encima de la temperatura ambiente (20 °C). Si la cámara se enfría, por ejemplo, a 0 °C, puede realizarse un intervalo de temperatura entre 0,1 °C y 100 °C, dependiendo de la estabilidad térmica de la muestra y de la magnitud del efecto termóforo. En general, no es necesaria una alta resolución temporal del registro de la imagen para determinar el efecto termóforo de las (bio)moléculas, (nano)partículas, o (micro)perlas. La señal medida está en el estado estacionario o cerca de la concentración de estado estacionario, que en la mayoría de los casos se alcanza después de algunos segundos. Las señales de la mayoría de las moléculas difieren suficientemente entre sí antes de alcanzar el estado estable para identificarlas sin ninguna duda. Para el análisis de los datos junto a la concentración

inicial, es necesaria la concentración en un momento determinado después de encender el calentamiento por LÁSER (también se pueden realizar transcurros de tiempo). Es suficiente con determinar la concentración de un único píxel (es decir, el punto de temperatura máxima).

5 Antes de encender el láser, hay una distribución homogénea de las biomoléculas. Por lo tanto, la intensidad de fluorescencia (o lo que sea la señal de medición), que es directamente proporcional a la concentración, tiene la misma magnitud en cada punto. Cuando el LÁSER se enciende, la distribución de la concentración cambia. Las moléculas se alejan del foco láser caliente. Por lo tanto, la magnitud de la intensidad de la fluorescencia disminuye hasta que se alcanza el estado estacionario. Esta disminución puede medirse y, por lo tanto, las características de las moléculas pueden obtenerse por la teoría de la termoforesis, y diferentes moléculas pueden ser discriminadas por comparación.

10 Con los procedimientos como se divulgan en el presente documento, en particular en relación con el segundo modo de realización, los medios y procedimientos se proporcionan para detectar, medir y/o verificar una gran diversidad de interacciones. Por ejemplo, pueden medirse las interacciones ADN/ADN, ARN/ARN, proteína/proteína, proteína/ADN, proteína/ARN, pero también la interacción de proteína, ADN, ARN con otros materiales como nanopartículas/microperlas. El único requisito es una etiqueta, en particular una etiqueta fluorescente, unida a una de las moléculas. Una excepción es, por ejemplo, el caso de las microperlas grandes, donde se puede utilizar la dispersión de la luz (directamente) para la detección. Si se usan microperlas modificadas de una manera que, por ejemplo, las cadenas individuales de ADN pueden unir a estas modificaciones, la movilidad de esta perla cambia debido a la unión. Por lo tanto, el procedimiento de la segunda realización permite detectar esta unión. Debido a que estas perlas modificadas se usan en configuraciones de secuenciación, el procedimiento de la presente invención puede aplicarse aquí. Con el presente procedimiento es posible detectar todo lo que cambia el tamaño, la carga o la superficie de una molécula. Se ha demostrado que el procedimiento de la presente invención es también capaz de medir la unión específica de ADN a nanopartículas y microperlas de poliestireno a través de estreptavidina/biotina (véase la Fig. 35). También son detectables las interacciones entre el anticuerpo y un epítipo. También es detectable la unión de una proteína a una cadena de ADN, por ejemplo de una polimerasa.

15 Puesto que no se necesita una alta resolución temporal y espacial, el procedimiento de la segunda realización es rentable y fácil de realizar. Por ejemplo, en lugar de una cámara CCD, se puede utilizar un fotodiodo de avalancha (sólo se necesita información de un único píxel). Si la cámara de microfluidos es un capilar (es decir, una cámara de microfluidos con una elevada relación de aspecto (Longitud/Ancho)), no se necesita una resolución espacial en la dirección de la anchura, y para la detección de la distribución de fluorescencia sólo se necesita una cámara CCD de línea. Esta alternativa entre la cámara CCD y fotodiodos de avalancha/fotomultiplicador es muy rentable y ahorra tiempo para la evaluación de datos ya que la integración de la fluorescencia se realiza por el hardware. Los sistemas medidos pueden mostrar concentración tan sólo nanomolar sin ninguna restricción a mayores concentraciones. También se tolera un alto grado de contaminación comparable por los procedimientos de la presente invención. Las mediciones también son posibles en extracto in bruto de células o en sangre. Además de la tolerancia a las contaminaciones, el procedimiento también sostiene fuertes variaciones en la viscosidad de la solución. La medición puede realizarse por ejemplo en agua o glicerol o en solución acuosa con una consistencia tipo gel. Dado que las mediciones se realizan en cámaras de microfluidos, el volumen necesario para un experimento es, por ejemplo, de sólo 0,5 µl, 1 µl, 2 µl, 5 µl, 10 µl, preferiblemente 2 µl, y puede reducirse adicionalmente. Debido a su fácil calibración, el procedimiento tiene una gran ventaja en comparación con la FCS (espectroscopía de correlación de fluorescencia) y puede automatizarse fácilmente. El procedimiento se distingue más rápidamente que cualquier otro procedimiento en el mercado para determinar interacciones entre biomoléculas/nanopartículas/microperlas (es decir, Biacore). La longitud de las moléculas cortas de ADN se determina en cuestión de segundos en comparación con una hora que se necesita por electroforesis en gel, un procedimiento establecido en este campo. Otra ventaja adicional es que las mediciones se realizan en solución acuosa. No es necesario cambiar la fase en la que se disuelve la molécula (gel en electroforesis en gel o columnas C18, HIC en HPLC). La posibilidad de diferenciar entre el ADN monocatenario y bicatenario abre rápidamente nuevas posibilidades en el diagnóstico, así como en la investigación científica. Un ejemplo es, por ejemplo, el diagnóstico de enfermedades infecciosas, como enfermedades víricas o infecciones bacterianas.

20 En resumen, el procedimiento de la invención de la segunda realización manipula concentraciones de biomoléculas/nanopartículas/microperlas en soluciones acuosas por gradientes de temperatura (hasta 10 K/m, en algunas realizaciones hasta 5 K/m, en particular de hasta 2 K/m) establecidas con un LÁSER IR. En el ejemplo adjunto se describe una teoría general para la termoforesis en líquidos.

25 Las características y ventajas más importantes de la presente invención se resumirán a continuación. El procedimiento y el dispositivo de la presente invención funcionan de manera óptica, es decir, la manipulación y la detección se realiza por medios ópticos. Con la presente invención, es posible manipular ópticamente moléculas hasta del tamaño de un único colorante fluorescente que no es posible por trampas ópticas, que están limitadas a partículas esféricas de 500 nm. El procedimiento está libre de contaminaciones y es fácil de miniaturizar y paralelizar. Esto hace posible integrar el sistema en instrumentos establecidos como robots de pipeteado, etc. El calentamiento de soluciones acuosas en la escala de micrómetros permite crear distribuciones de temperatura, que hacen innecesarios los largos periodos de calentamiento y enfriamiento. Los criterios para materiales que se pueden usar para construir cámaras de medición son muy inespecíficos. Otra ventaja es que el LÁSER IR se está volviendo

5 cada vez más común en la industria de las telecomunicaciones y se producen en grandes cantidades. Además, la técnica de acoplamiento de colorantes fluorescentes a las biomoléculas se ha convertido en una tecnología estándar rentable. Por lo tanto, con la presente invención, es posible medir la estabilidad de las moléculas, así como cualquier tipo de interacción (entre sí, el sistema tampón, otros solutos, etc.). Por lo tanto, la invención no sólo se utiliza en la medición, detección y/o verificación de biomoléculas o procesos biológicos, biomédicos, biofísicos y/o farmacológicos (in vitro).

10 Con los medios y procedimientos de la primera realización de la presente invención, pueden medirse y determinarse curvas de fusión sobre una amplia gama de temperaturas. De acuerdo con esta realización, se debe evitar la termoforesis. La temperatura alcanza un cambio en la estructura, que es detectable a través del comportamiento de la fluorescencia. Las características se pueden detectar y/o medir en un amplio intervalo de temperaturas al mismo tiempo. Ninguno de los documentos conocidos de la técnica anterior divulga una reacción inter y/o intramolecular inducida a través de la temperatura. De acuerdo con la primera realización, el láser puede irradiarse en la solución a través de fibras ópticas. La luz puede salir de las fibras ópticas divergentes. De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, el sistema óptico para enfocar el láser puede ser una única lente.

15 Los medios y procedimientos del segundo modo de realización ilustrativo de la presente invención proporcionan las ventajas de que el efecto de la termoforesis se utiliza de una manera controlada. En particular, los cambios de concentración, inducidos por el efecto o efectos de la termoforesis se miden mediante un cambio en el comportamiento de la fluorescencia. Por lo tanto, la señal de fluorescencia registrada en la segunda realización es primaria en base a los cambios de concentración y no a los cambios en la estructura de las partículas o biomoléculas ensayadas. La segunda realización ilustrativa incluye que los cambios en la concentración son sensibles a los cambios en la estructura de una partícula o molécula. En el estado de la técnica conocido sólo se divulga una diferencia de temperatura máxima de sólo 2,5 K. Además, en la técnica anterior se describen sólo mediciones con un láser de baja potencia (320 mW). En particular, se puede usar una cámara CCD para detectar o medir la fluorescencia de la muestra. De acuerdo con otra realización, sólo se ha de utilizar un píxel de la cámara CCD para la medición o la detección de la luz de fluorescencia, por ejemplo, sólo se ha de utilizar un píxel central de 1 x 1 µm. Esto tiene la ventaja de que la información espacial adicional puede ser insignificante de acuerdo con ciertos modos de realización de la presente invención.

20 De acuerdo con otro modo de realización preferido de la presente invención, se miden las distribuciones de temperatura alrededor del haz de luz láser irradiado con mediciones independientes. Estas mediciones se basan típicamente en el comportamiento conocido de la fluorescencia dependiente de la temperatura de los colorantes.

25 Por consiguiente, como también se ilustra en los ejemplos adjuntos, los modos de realización particulares de la presente invención, que se definen por las reivindicaciones adjuntas, se refieren a la detección de termodifusión o termoforesis de (bio)moléculas o partículas, la determinación de (bio)moléculas o partículas de radios hidrodinámicos, la detección de la unión de o entre (bio)moléculas o partículas, la detección de interacciones entre (bio)moléculas o partículas, la detección de cambios conformacionales en (bio)moléculas, la detección de desnaturalización de proteínas o la fusión de ácidos nucleicos y con el atrapamiento optotérmico de (bio)moléculas o partículas.

Breve descripción de los dibujos

30 La invención se describe con referencia a las figuras, en las que las Fig. 1a, 1b muestran un microscopio de barrido IR de fluorescencia de acuerdo con un ejemplo.

La Fig. 2 muestra un modo de realización ejemplar de un microscopio de barrido IR de acuerdo con la invención.

La Fig. 3a-3d muestran cómo se pueden tomar las curvas de fusión con una radiación de 150 ms.

La Fig. 4 muestra una detección de SNP rápida.

La Fig. 5a-5b muestra la movilidad en un gradiente de temperatura.

45 La Fig. 6 es un ejemplo para un colorante de fluorescencia que se usará en los procedimientos de la presente invención.

Las Figuras 7-14 muestran información adicional con respecto a un ejemplo detallado de acuerdo con la presente invención.

50 La Fig. 15 muestra la dependencia de la temperatura de un colorante fluorescente medida por un fluorímetro con control de temperatura (elemento Peltier).

Las Figuras 16-23 muestran modos de realización particulares del dispositivo de acuerdo con la presente invención.

La Figura 24 muestra un ejemplo.

Fig. 25: muestra la cuantificación de la interacción entre biomoléculas.

Fig. 26: muestra una única molécula que se une a nanopartículas.

Fig. 27: muestra un ejemplo particular del dispositivo

Fig. 28: muestra la caracterización de la conformación de proteínas

Figuras 29-30: muestran mediciones con una muestra de albúmina sérica bovina marcada con fluorescencia (BSA).

5 Fig. 31: muestra la medición de las propiedades termo-ópticas de dos muestras con/de la proteína verde fluorescente (GFP).

Fig. 32: muestra una medición de una partícula que está atrapada en un pocillo potencial creado por una distribución de temperatura espacial

Fig. 33: muestra una serie temporal del movimiento termóforo de las perlas de sílice en una cámara de microfluidos.

10 Fig. 34: muestra otro ejemplo de la "Trampa Optotérmica".

Fig. 35: muestra la determinación del coeficiente de Soret de complejos de nanocristales (= punto cuántico QD) y biomoléculas.

Figuras 36-37: muestran modos de realización particulares del dispositivo de acuerdo con la presente invención.

Fig. 38: muestra un ejemplo de un sistema bicapa lipídico.

15 Fig. 39: muestra termoforesis y atrapamiento termóforo de vesículas lipídicas

Descripción detallada de dibujos:

En la siguiente descripción de ejemplos de modos de realización preferidos de la invención, los elementos que tienen el efecto técnico o físico comparable tienen los mismos números de referencia.

20 La Fig. 1a muestra un microscopio de barrido de fluorescencia IR de acuerdo con un ejemplo. El microscopio de barrido IR se basa en una configuración de microscopía de fluorescencia estándar (por ejemplo Zeiss AxioTech, Vario). Dicho dispositivo comprende: una o más fuentes de luz 32, preferiblemente un LED de alta potencia (por ejemplo, V-Star, Luxeon) para excitar las partículas. La señal de las partículas puede recogerse con un sistema óptico 1, preferiblemente un objetivo de aceite 40x y se separa de la luz de la fuente de luz por uno o más elementos de separación de luz 4, preferiblemente un espejo dicróico. Dicha señal se registra con uno o más detectores 31, preferiblemente una cámara CCD (por ejemplo, SensiCam QE, PCO). El haz de un LÁSER IR 30 (por ejemplo, IPG, de fibra Raman RLD-5-1455) se acopla a la cámara de microfluidos 45 (por ejemplo, una placa multipocillo). El sistema puede comprender otros componentes como se encontrarán habitualmente en microscopios de fluorescencia y campo amplio. Pueden encontrarse ejemplos de medios de excitación y detección de fluorescencia en: Lakowicz, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, Kluwer Academic / Plenum Publishers (1999).

30 La Fig. 1b muestra un ejemplo adicional de un microscopio de barrido IR de fluorescencia similar al ejemplo mostrado en la Fig. 1a. Sin embargo, la fuente de luz 32 está orientada de una manera diferente con respecto al espejo dicróico 4. La muestra de ensayo 50 está intercalada entre dos piezas de vidrio 51, preferiblemente cubreobjetos.

35 La Fig. 2 muestra un modo de realización ejemplar de un microscopio de barrido IR de acuerdo con la invención. De acuerdo con este ejemplo de modo de realización de la presente invención, la muestra de ensayo 50 se proporciona en forma de una única gota con las partículas marcadas. El volumen (preferiblemente de algunos nanolitros hasta algunos microlitros) de tal gota puede ajustarse fácilmente de modo que también sean predecibles las dimensiones, es decir, el grosor de la gota que se irradia con el haz de láser. En este modo de realización ejemplar, el haz láser, la luz de excitación fluorescente de la fuente de luz 32, preferiblemente un LED, así como la luz fluorescente medida, están todos enfocados por un sistema óptico común 1, preferiblemente un objetivo de microscopio con alta apertura numérica y, más preferiblemente, un objetivo con alta apertura numérica y alta transmisión IR. Por lo tanto, el LED, el LÁSER 30 y el detector 31, preferiblemente un CCD, pueden disponerse a un lado común con respecto a la muestra. La luz de excitación se separa de la luz fluorescente mediante un elemento de separación de luz 5, preferiblemente un espejo dicróico, que separa preferiblemente diferentes partes del espectro de luz que el elemento de separación de luz 4.

45 Las Fig. 3a-d muestran cómo se pueden tomar las curvas de fusión con una radiación de 150 ms, (a) mediante la medición de la fluorescencia de un colorante sensible a la temperatura, la distribución de temperatura se puede medir en la cámara de microfluidos, (b) muestra el promedio radial de las temperaturas medidas por fluorescencia, (c) aprox. 150 ms después de que el LÁSER IR se encienda, se toma una imagen del ADN marcado con fluorescencia. La alta intensidad muestra ADN ds fundido. A partir de (a) y (c), la curva de fusión se puede determinar muy rápidamente (d).

La Fig. 4 muestra una detección de SNP rápida. Un 16mer de dsDNA con un único desajuste de nucleótidos en el centro (azul) se compara con el tipo silvestre (negro). En 150 ms, ambas especies pueden discriminarse claramente. La ordenada describe la fracción de dsDNA disociado. El punto de fusión se define por moléculas disociadas al 50 %. Se desplaza en 15 °C por un único desajuste.

5 La Fig. 5a-5b muestra la movilidad en un gradiente de temperatura. Las figuras muestran el cambio de concentración en el píxel central de un punto de calor a lo largo del tiempo. Unos segundos después del inicio de la medición, el láser se enciende y la concentración disminuye hasta alcanzar un estado estacionario. La señal permite distinguir entre un dsDNA de 20 mer y 50 mer (a), así como entre ssDNA de 20 bases y dsDNA de 20 pares de bases (b).

10 La Fig. 6 es un ejemplo de un colorante de fluorescencia que se usará en los procedimientos de la presente invención (6-carboxi-2',4',4',5',7,7'-hexaclorofluoresceína (HEX, SE; C20091) de Invitrogen).

Las Figuras 7-14 muestran información adicional con respecto a un ejemplo detallado de acuerdo con la presente invención. Estas figuras muestran en particular:

15 Fig. 7: muestra cómo la termodifusión manipula la concentración de ADN mediante pequeñas diferencias de temperatura dentro de la solución a granel. Una fina película de agua se calienta en 2 K a lo largo de las letras "ADN" con un láser infrarrojo. Para una cámara enfriada a 3 °C, el ADN marcado con fluorescencia se acumula en las letras cálidas. Sin embargo, a temperatura ambiente, el ADN se mueve hacia el frío, mostrando una fluorescencia reducida. La cámara es de 60 μm de espesor, que contiene ADN 50 nM en tampón TRIS 1 mM. Cada 50 par de bases está etiquetado con TOTO-1.

20 La Fig. 8 ilustra la dependencia de la sal, (a) la termodifusión en el agua está dominada por el blindaje iónico y la hidratación con agua, (b) coeficiente de Soret ST frente a la longitud de Debye para perlas de poliestireno modificadas con carboxilo de diámetro 1,1, 0,5 y 0,2 μm. Representación lineal (izquierda) y representación logarítmica (derecha). Los coeficientes de Soret se describen mediante la ecuación (2) con una carga superficial eficaz de $\sigma_{eff} = 4500 \text{ e}/\mu\text{m}^2$ conocida a partir de la electroforesis. La intersección $S_T(\lambda_{DH} = 0)$ se ajusta con una entropía de hidratación por superficie de partícula de Shyd = -1400 J/(molKμm²).

La Fig. 9 muestra una dependencia de la temperatura, (a) La dependencia de la temperatura está dominada por el cambio lineal en la entropía de hidratación Shyd. Cambia la termodifusión dependiente de la sal ST(λDH) a valores inferiores. El tamaño de partícula es de 1,1 μm. (b) El coeficiente de Soret ST aumenta linealmente con la temperatura según se espera para una entropía de hidratación Shyd(T). Depende de la especie de la molécula, no de su tamaño, como se observa a partir de los coeficientes de Soret redimensionados para el ADN con diferentes longitudes.

La Fig. 10 muestra una dependencia de tamaño, (a) Para las cuentas perlas de poliestireno, el coeficiente de Soret se escala con la superficie de partícula en cuatro órdenes de magnitud. Las mediciones se describen por la ecuación (2) con una densidad de carga superficial eficaz de $\sigma_{eff} = 4500 \text{ e}/\mu\text{m}^2$ y una entropía de hidratación insignificante. La desviación para la perla con un diámetro de 20 nm se puede entender a partir de un aumento de la carga eficaz debido al inicio de la normalización de la carga para un $\lambda \leq \lambda_{DH}$. (b) Por consiguiente, el coeficiente de termodifusión DT se escala linealmente con el diámetro de la perla, (c) El coeficiente de Soret del ADN se escala según $S_T \propto \sqrt{L}$ con la longitud L del ADN en base a la ecuación (2) con una carga eficaz por par de bases de 0,12 e. (d) El coeficiente de termodifusión DT disminuye a lo largo de la longitud del ADN con $D_T \propto L^{-0.25}$, causado por el escalamiento del coeficiente de difusión $D \propto L^{-0.75}$.

La Fig. 11: muestra una carga eficaz de la termodifusión. Se deduce la carga eficaz de la termodifusión usando la ecuación (3). Se miden perlas de poliestireno (20.000 nm) (a) y ADN (50 - 50.000 pb) (b) en un intervalo de gran tamaño, imposible con electroforesis. Como era de esperar, la carga eficaz de las perlas se escala con la superficie de las partículas y linealmente con la longitud del ADN.

45 La Fig. 12: muestra la dependencia de la termodifusión de la concentración en el tiempo, (a) El coeficiente de difusión D se obtuvo a partir de la difusión posterior después de apagar la fuente de calor, (b) D se varía hasta que la simulación de elementos finitos coincida con el experimento, (c) El agotamiento radial del ADN de un punto de calor a 2 K enfocado se controla en el tiempo, (d) La comparación con la simulación con D conocido produce DT y ST.

La fig. 13 muestra una escala de coeficientes de difusión de ADN. Los coeficientes de difusión se miden en este estudio a temperatura ambiente. La escala sobre la longitud del ADN coincide con los valores de la bibliografía con dos regímenes de escala con exponente -1 para el DNA33 corto y -0,6 para el largo. Como aproximación, la difusión a través de los dos regímenes de escala se describe bien con un exponente general de -0,75.

La Fig. 14: muestra una simulación de calentamiento de microfluído, (a) Una película de agua delgada de 10 μm se encierra entre paredes PS. La baja conducción térmica de las paredes de la cámara permite un perfil de temperatura independiente del espesor, confirmado por el cálculo de elementos finitos mostrado, (b) La convección es lenta a velocidades máximas de 5 nm/s debido a la cámara delgada y el enfoque de calentamiento amplio comparable.

La Fig. 15 muestra la dependencia de la temperatura de un colorante fluorescente medida por un fluorímetro con control de temperatura (elemento Peltier).

La figura 16 ilustra un modo de realización particular de un dispositivo de acuerdo con la presente invención. El dispositivo puede tener una orientación sustancialmente arbitraria con respecto a la dirección de la gravitación, preferiblemente el dispositivo está orientado perpendicular con respecto a la dirección de gravitación, más preferiblemente el dispositivo está orientado sustancialmente paralelo o antiparalelo con respecto a la dirección de gravitación. Preferiblemente, la orientación del dispositivo con respecto a la muestra de ensayo o la cámara puede ajustarse como se muestra en la Fig. 1a, Fig. 1b y la Fig. 2. El dispositivo comprende: 1: Objetivo (por ejemplo, 40x, NA 1.3, de inmersión en aceite, ZEISS "Fluar"); 20: Módulo de exploración, puede ser un espejo de exploración galvánico o puede ser un deflector óptico acústico (AOD); 3: espejo frío, preferiblemente alta transmisión IR y preferiblemente >90 % de reflexión 350 nm - 650 nm; 11: módulo de conformación de haz para determinar el diámetro del haz láser y el enfoque, puede ser un sistema de lentes que puede comprender una, dos o más lentes; 16: Acoplador de fibra láser sin colimador; 15: Fibra láser (monomodo o multimodo); 30: Láser IR (por ejemplo 1455 nm, 1480 nm, 0,1 W - 10 W); 4: Espejo dicróico/divisor de haz que refleja la longitud de onda corta ($R > 80\%$), que transmite una longitud de onda larga ($T > 80\%$); 7: Filtro de emisión (paso de banda/paso largo); 31: detector, puede ser una cámara CCD, cámara de línea, tubo fotomultiplicador (PMT), fotodiodo de avalancha (APD), cámara CMOS; 6: Filtro de excitación (por ejemplo, paso de banda/paso largo); 10: sistema de lentes para determinar las propiedades del haz de la fuente de luz de excitación, puede comprender una, dos o más lentes; 32: La fuente de luz de la excitación, puede ser láser, fibra láser, diodo-láser, LED, HXP, halógeno, matriz de LED, HBO. Preferiblemente, las partes enumeradas están alojadas en una carcasa; un espejo frío es un espejo dieléctrico especializado, un filtro de interferencia dicromático que funciona sobre un intervalo de temperatura muy amplio para reflejar todo el espectro de luz visible mientras transmite muy eficazmente longitudes de onda infrarrojas.

La Fig. 17 muestra un modo de realización ejemplar de la invención de acuerdo con la Fig. 16, en el que el módulo de exploración 20 está sustituido por un espejo fijo 21, preferiblemente un espejo de plata.

La Fig. 18 muestra un modo de realización ejemplar de la invención de acuerdo con la Fig. 16, en el que el módulo de exploración 20 está sustituido por un espejo fijo 21, preferiblemente un espejo de plata, y en el que se añade un obturador 33 para controlar la radiación LÁSER IR, y en el que se añade un módulo de formación de líneas 12, puede ser un sistema de lentes cilíndricas o preferiblemente un lente Powell.

La Fig. 19 muestra un modo de realización ejemplar del dispositivo de acuerdo con la presente invención, en particular una configuración confocal. El dispositivo puede tener una orientación arbitraria con respecto a la dirección de la gravitación, preferiblemente el dispositivo está orientado sustancialmente perpendicular con respecto a la dirección de gravitación, más preferiblemente el dispositivo está orientado sustancialmente paralelo o antiparalelo con respecto a la dirección de gravitación. Preferiblemente, la orientación del dispositivo con respecto a la muestra de ensayo o la cámara puede ajustarse como se muestra en la Fig. 1a, Fig. 1b y la Fig. 2. El dispositivo comprende: 1: Objetivo (por ejemplo, 40x, NA 1.3, de inmersión en aceite, ZEISS "Fluar"); 2: espejo caliente, alta reflexión IR, transmisión de luz visible > 80 %; 4: Espejo dicróico que refleja la longitud de onda corta ($R > 80\%$), que transmite una longitud de onda larga ($T > 80\%$); 7: Filtro de emisión (paso de banda/paso largo); 31: Detector, puede ser un tubo fotomultiplicador (PMT), un fotodiodo de avalancha (APD); 13: Apertura de orificio; 10: sistema de lentes para determinar las propiedades del haz de la fuente de luz de excitación, puede comprender una, dos o más lentes; 32: fuente de luz de excitación, preferiblemente un láser, láser más preferiblemente un láser acoplado a fibra, 11: módulo de conformación del haz láser para determinar el diámetro del haz y el enfoque, preferiblemente sistema de lentes que puede comprender una, dos o más lentes; 16: Acoplador de fibra láser sin colimador; 15: Fibra láser (monomodo o multimodo); 30: Láser IR (por ejemplo 1455 nm, 1480 nm, 0,1 W - 10 W); 33: Obturador; 14: apertura del orificio en la posición confocal con respecto al orificio láser 13 o al acoplador de fibra láser 17, mientras que el orificio 13 puede no ser necesario, preferiblemente si se usa un láser acoplado a fibra como fuente de luz de excitación 32; 18: La fibra láser puede ser de modo único o puede ser el multimodo.

La Fig. 20 muestra un modo de realización ejemplar del dispositivo de acuerdo con la presente invención. El dispositivo puede tener una orientación arbitraria con respecto a la dirección de la gravitación, preferiblemente el dispositivo está orientado sustancialmente perpendicular con respecto a la dirección de gravitación, más preferiblemente el dispositivo está orientado sustancialmente paralelo o antiparalelo con respecto a la dirección de gravitación. Preferiblemente, la orientación del dispositivo con respecto a la muestra de ensayo o la cámara puede ajustarse como se muestra en la Fig. 1a, Fig. 1b y la Fig. 2. El dispositivo comprende: 1: Objetivo (por ejemplo, 40x, NA 1.3, de inmersión en aceite, ZEISS "Fluar"); 2: espejo caliente, alta reflexión IR, transmisión de luz visible > 80 %; 4: Espejo dicróico que refleja la longitud de onda corta ($R > 80\%$), que transmite una longitud de onda larga ($T > 80\%$); 6: Filtro de excitación (por ejemplo, paso de banda/paso largo); 7: Filtro de emisión (paso de banda/paso largo); 10: sistema de lentes para determinar las propiedades del haz de la fuente de luz de excitación; 31: Detector, puede ser un tubo fotomultiplicador (PMT), un fotodiodo de avalancha (APD); 32: fuente de luz de excitación; 16: Acoplador de fibra láser sin colimador; 15: Fibra láser (monomodo o multimodo); 30: Láser IR (por ejemplo 1455 nm, 1480 nm, 0,1 W - 10 W); un espejo caliente es un espejo dieléctrico especializado, se emplea a menudo un filtro de interferencia dicromático para proteger los sistemas ópticos mediante la reflexión del calor de nuevo en la fuente de luz. Los espejos calientes pueden estar diseñados para insertarse en el sistema óptico a un ángulo de incidencia que varía entre cero y 45 grados, y son útiles en una diversidad de aplicaciones donde la acumulación de calor

puede dañar los componentes o afectar negativamente a las características espectrales de la fuente de iluminación. Mediante la transmisión de longitudes de onda de luz visible mientras refleja el infrarrojo, los espejos calientes también pueden servir como divisores de haz dicromáticos para aplicaciones especializadas en microscopía de fluorescencia.

- 5 La Fig. 21 muestra un modo de realización ejemplar de la invención de acuerdo con la Fig. 20, en el que se añade un obturador 33 para controlar la radiación láser IR.

La Fig. 22 muestra un modo de realización ejemplar de la invención de acuerdo con la Fig. 20, en el que un obturador 33 y un módulo de formación de línea 12, preferiblemente un sistema de lente que comprende una, dos o más lentes, o más preferiblemente una lente Powell, se añaden para controlar la radiación láser IR.

- 10 La Fig. 23 muestra un modo de realización ejemplar de la invención de acuerdo con la Fig. 16, en el que el módulo de exploración 20 se reemplaza por un espejo fijo 21, preferiblemente un espejo de plata, y en el que se añade un elemento adicional de separación de luz 5, preferiblemente un espejo dicróico que separa preferiblemente partes del espectro de luz diferentes que el elemento de separación de luz 4, y en el que se añade un filtro de emisión 8, que transmite preferiblemente otro intervalo de longitud de onda que el filtro de emisión 7 y en el que se añade un
15 segundo detector 31 que detecta la señal que pasa a través del filtro 8.

- Fig. 24 muestra un ejemplo de un dispositivo; 31: cámara CCD; 7: Filtro de emisión (por ejemplo, paso de banda o paso largo); 4: elemento de separación de luz, preferiblemente un espejo dicróico para dividir la trayectoria de la luz de excitación y la trayectoria de la emisión de luz; 1: Objetivo; 45: Cámara; 10: Sistema de lentes para enfocar el láser IR en la muestra; 20: módulo de exploración, puede ser espejos galvanométricos o un deflector óptico acústico; 20
20 16: Acoplador de fibra láser con óptima de colimación; 15: Fibra láser; 30: Láser IR; 6: Filtro de excitación; 10: sistema óptico para la excitación, puede ser un sistema de lentes que comprende una, dos o más lentes; 32: Fuente de luz (HXP, LED); 46: Fase de traducción de xyz para el posicionamiento del láser, puede ser automatizada, preferiblemente puede ser automatizada para la exploración de la cámara. 47: sistema óptico de conformación del haz del láser IR, puede ser un sistema de lentes que comprende una, dos o más lentes, o puede ser un objetivo,
25 preferiblemente con alta transmisión de IR.

- Fig. 25: muestra una cuantificación de la interacción entre biomoléculas. Se titulan 100 nM de un anticuerpo marcado con fluorescencia (anti-interleucina 4) con varias cantidades de interleuquina, (izquierda) Se mide la distribución espacial de fluorescencia en estado estacionario. Se muestran de forma ejemplar tres curvas con 5 nM, 80 nM y 300 nM. La señal cambia drásticamente desde la disminución de fluorescencia hasta un aumento de
30 fluorescencia. La integración del perfil de fluorescencia hasta 80 μm (distancia desde el centro calentado) permite determinar el número de complejos en solución. (derecha) La concentración de interleuquina 4 libre se puede calcular gráficamente frente al complejo formado por la concentración. Estos datos se pueden ajustar para determinar el K_D .

- La Fig. 26 muestra una única molécula que se une a nanopartículas. El coeficiente de Soret de nanocrisales en complejo con moléculas de PEG se mide mediante la evaluación del perfil de concentración en estado estacionario. El coeficiente de Soret aumenta linealmente con el número de moléculas de PEG unidas covalentemente a la partícula. Las moléculas de PEG con un peso molecular más alto muestran un aumento más pronunciado en el coeficiente de Soret. Las moléculas de PEG mostradas aquí son comparables en tamaño a proteínas o moléculas de ADN cortas, que pueden detectarse de la misma manera.

- 40 La Fig. 27 muestra un ejemplo de un dispositivo. Los medios de recepción para recibir la sonda de muestreo 50 son un capilar 40 con un diámetro interior de 5 μm a 500 μm , de manera que el espesor de la sonda de muestra es pequeño en la dirección perpendicular al haz láser. La primera válvula 41 y la segunda válvula 42 se proporcionan para la entrada/salida controlada de la sonda de muestra 50 en/desde el capilar 40. El capilar está montado sobre un soporte sólido 43, preferiblemente un material con buena conductividad térmica, por ejemplo, aluminio, cobre. El
45 elemento Peltier 44 está montado sobre el soporte sólido 43 de manera que el capilar 40 puede enfriarse.

- La Fig. 28 muestra la caracterización de la conformación de proteínas. La caracterización termo-óptica proporciona los medios para caracterizar la conformación de una proteína en solución. La temperatura de una solución que contiene albúmina de suero bovino (BSA) se enfría a 0 °C. A partir de esta temperatura, el coeficiente de Soret se mide a diferentes temperaturas que se aumentan gradualmente hasta 60 °C. El coeficiente de Soret es negativo, hasta valores cercanos a la desnaturalización térmica, donde se observa un salto repentino a los coeficientes de Soret positivos. A temperaturas fisiológicas (30-40 °C), el coeficiente de Soret no cambia mucho. En este intervalo de temperatura la proteína tiene que tener propiedades similares para realizar sus tareas. Debido a la estrecha relación entre la estructura y la función, la conformación se conserva en este intervalo de temperatura. Los resultados se confirman por el experimento mostrado a la derecha, que comienza a altas temperaturas. Los
50 coeficientes de Soret siguen siendo positivos por debajo de 50 °C, ya que las mediciones son más rápidas que el tiempo que la proteína necesita para replegarse. Después de un cierto intervalo de tiempo (es decir, 20 minutos), los valores alcanzan los coeficientes de Soret negativos obtenidos en las mediciones iniciadas a bajas temperaturas. Un posterior aumento de temperatura reproduce el coeficiente de Soret negativo medido en el experimento comenzando a bajas temperaturas.

La Fig. 29 muestra mediciones con una muestra de albúmina sérica bovina marcada con fluorescencia (BSA). Una muestra de albúmina de suero bovino (BSA) marcada con fluorescencia se ha dividido en dos partes. Una sólo se expone a temperaturas ambientales, mientras que la otra mitad se calienta hasta 100 °C durante varios minutos. Las propiedades termo-ópticas de ambas muestras (nativa y desnaturalizada) se miden a diferente potencia del láser infrarrojo (es decir, aumento máximo de temperatura de 5 ° o 10 °C). Como puede observarse en la figura, la fluorescencia de la proteína desnaturalizada es menor que la fluorescencia de la proteína nativa. Esto se explica como se indica a continuación. El colorante de fluorescencia de ambas muestras muestra la misma disminución en la fluorescencia debido al aumento de la temperatura (es decir, la sensibilidad a la temperatura de la fluorescencia). Sin embargo, la proteína desnaturalizada muestra una movilidad termófora positiva (es decir, se mueve al frío), mientras que la proteína nativa tiene una movilidad termófora negativa (es decir, se mueve al calor). La acumulación a temperaturas elevadas es la razón por la que la disminución de la fluorescencia es menor para la proteína nativa, mientras que la proteína desnaturalizada, además de dependiente de la temperatura, está empobrecida de la región de temperatura elevada. Las diferencias entre ambas muestras se aumentan adicionalmente elevando la temperatura (es decir, una temperatura máxima de 10°C), puesto que se mejora la termoforesis positiva y negativa.

La Fig. 30 muestra mediciones con una muestra de albúmina sérica bovina marcada con fluorescencia (BSA). Una muestra de albúmina de suero bovino (BSA) marcada con fluorescencia se ha dividido en dos partes. Una sólo se expone a temperaturas ambientales, mientras que la otra mitad se calienta hasta 100 °C durante varios minutos (es decir, irreversiblemente desnaturalizada). Las propiedades termo-ópticas de ambas muestras (nativa y desnaturalizada) se miden a una potencia de 800 mA del láser infrarrojo (es decir, un aumento máximo de temperatura de 20 °C). Como puede observarse en la figura, la fluorescencia de la proteína desnaturalizada es menor que la fluorescencia de la proteína nativa. Esto se explica como se indica a continuación. El colorante de fluorescencia de ambas muestras muestra la misma disminución en la fluorescencia debido al aumento de la temperatura (es decir, la sensibilidad a la temperatura de la fluorescencia). Sin embargo, la proteína desnaturalizada muestra una movilidad termófora positiva (es decir, se mueve al frío), mientras que la proteína nativa tiene una movilidad termófora negativa (es decir, se mueve al calor). La acumulación a temperaturas elevadas es la razón por la que la disminución de la fluorescencia es menor para la proteína nativa, mientras que la proteína desnaturalizada, además de dependiente de la temperatura, está empobrecida de la región de temperatura elevada. Curiosamente, al aproximarse a la temperatura de desnaturalización (es decir, 50 °C) de la proteína, las amplitudes de la proteína nativa y desnaturalizada se aproximan entre sí y son esencialmente iguales. Esto significa que midiendo la amplitud del cambio de fluorescencia, una comparación con la muestra de referencia permite detectar la temperatura de fusión de una proteína y discriminar entre la forma nativa y desnaturalizada de una proteína. Y detectar un cambio en la temperatura de fusión debido a interacciones de la proteína con otras biomoléculas o moléculas pequeñas (por ejemplo, fármacos candidatos).

La Fig. 31 muestra la medición de las propiedades termo-ópticas de dos muestras con/de la proteína verde fluorescente (GFP). Se miden las propiedades termo-ópticas de dos muestras de proteína verde fluorescente (GFP). En la primera muestra, sólo está presente GFP, mientras que en la segunda muestra, la GFP se mezcla con un exceso de 2 veces un fragmento de anticuerpo, que se une específicamente a GFP. En ambos casos, en primer lugar se registra la fluorescencia sin calentamiento por láser. A continuación, la excitación de fluorescencia se apaga y la radiación láser IR se enciende. El láser se apaga después de unos segundos de calentamiento y la excitación de fluorescencia se enciende al mismo tiempo. La relajación de la distribución de fluorescencia espacial (es decir, la distribución de concentración) con respecto a un estado homogéneo se registra durante unos segundos. Como puede observarse a partir de la figura, en la muestra con las dos especies que interactúan (es decir, GFP y el fragmento de anticuerpo), el perfil de fluorescencia necesita más tiempo para relajarse. Esto se explica por la difusión más lenta del complejo más grande. La evolución temporal del perfil de fluorescencia se analiza a través de una herramienta de software para determinar la constante de difusión. Utilizando la relación Stokes-Einstein, se atribuye un radio hidrodinámico a la constante de difusión. En el caso de la GFP libre, éste es de 5 nm y el complejo tiene un radio de 10 nm.

La Fig. 32 muestra una medición de una partícula que está atrapada en un pocillo potencial creado por una distribución de temperatura espacial, (a) Una partícula está atrapada en un pocillo potencial creado por una distribución de temperatura espacial. Para las partículas de sílice, el pocillo es más profundo a altas temperaturas. Las fluctuaciones se registran a través de una cámara CCD (en $t = 1$ s, 2 s, 3 s, 4 s, 5 s, 6 s, 7 s) y (b) las posiciones se rastrean por Software con resolución nanométrica, (c) Se calcula un histograma a partir de la información de posición. La anchura de la distribución es muy sensible a las propiedades termo-ópticas de la partícula. Si las moléculas se unen a la superficie de la partícula, el potencial eficaz para la perla cambia y la amplitud de las fluctuaciones aumenta o disminuye. Observando el cambio de amplitud a lo largo del tiempo, se puede medir una curva de unión cinética.

La Fig. 33 muestra una serie temporal del movimiento termóforo de las perlas de sílice en una cámara de microfluidos. Serie temporal del movimiento termóforo de las perlas de sílice en una cámara de microfluidos. Al principio (imagen 1), sin calentamiento por láser, las perlas están distribuidas casi equitativamente. El círculo negro muestra la posición del foco láser. Las siguientes imágenes muestran el desarrollo de la distribución de partículas en los siguientes tres segundos después de encender el láser de calentamiento. Las partículas son atraídas por la fuente de calor y se acumulan en el punto de temperatura más alto. La acumulación se observa porque estas partículas tienen una movilidad termófora negativa. Una partícula con movilidad termófora positiva puede quedar

atrapada por calentamiento, por ejemplo, un círculo alrededor de ella.

La Fig. 34 muestra otro ejemplo de la "Trampa Optotérmica". Otro ejemplo de la "Trampa Optothermal": Varias perlas de 1 μm están atrapadas en el punto brillante en el centro de la imagen. La cámara se mueve mientras que el foco láser se mantiene fijo. La imagen es una adición de aproximadamente 30 imágenes individuales. Como se puede observar, todas las perlas se movieron con la cámara, por lo que la adición de las imágenes individuales como resultado líneas para las partículas individuales. Las cuentas atrapadas se mantuvieron en una posición. No se detectó ningún movimiento de las perlas atrapadas. El halo y la alta intensidad de las perlas atrapadas es el resultado de la adición de las imágenes individuales.

La Fig. 35 muestra la determinación del coeficiente de Soret de complejos de nanocrisales (= punto cuántico QD) y biomoléculas. El Coeficiente de Soret de complejos de nanocrisales (= punto cuántico QD) y biomoléculas se determina relacionando la distribución de concentración espacial con una distribución de temperatura espacial. Se han analizado tres muestras diferentes. Primero se mide un nanocrisal sin modificación de proteínas (QD), seguido de una muestra de nanocrisales modificados con la proteína estreptavidina (QD + Strep.) (aproximadamente 5 proteínas por nanocrisal). Al unir la proteína al nanocrisal, el coeficiente de Soret aumenta fuertemente. Mediante la adición de un ADN monocatenario a la muestra (un ADN por Partícula), el coeficiente de Soret se aumenta adicionalmente (QD + Strep. + ADN).

La Fig. 36 muestra otro modo de realización ejemplar de la invención de acuerdo con la Fig. 20, en el que una fase 43 que lleva un elemento de control de temperatura 44 y la cámara 45 se conecta al sistema óptico a través de conectores 48. El sistema óptico 1 también puede comprender un objetivo TIRF (fluorescencia de reflexión interna total) de manera que se pueda medir la termoforesis en la dirección del haz láser.

La Fig. 37 muestra otro modo de realización ejemplar de la invención de acuerdo con la Fig. 20, en el que se añaden un obturador 33 y un módulo de formación de línea 12, preferiblemente un sistema de lentes que comprende una, dos o más lentes, o más preferiblemente una lente Powell, para controlar la radiación láser IR, y en el que el filtro de emisión 7 se reemplaza por un instrumento óptico 22 que puede ser un espectrógrafo, policromador o monocromador o combinaciones de uno o más de éstos, por ejemplo, un instrumento óptico que transforma diferentes intervalos de longitud de onda/frecuencia de luz en diferentes intervalos de ángulos/distancias o lugares diferentes, por ejemplo, en un CCD.

La Fig. 38 muestra un ejemplo de un sistema modelo de bicapa lipídica. Una fracción de la capa que constituye los lípidos se acopla a una superficie (por ejemplo, a través de un péptido sulfhidrilo a una superficie de oro). Las proteínas transmembrana o proteínas asociadas a la membrana se insertan en la bicapa lipídica. Además, también pueden estar presentes proteínas solubles en la solución acuosa en la parte superior de la membrana. Mediante absorción por láser infrarrojo de la solución acuosa puede establecerse un gradiente de temperatura dentro de la membrana. De esta manera, las propiedades termo-ópticas como la estabilidad, la interacción y la conformación pueden medirse para un compuesto marcado con fluorescencia (es decir, un lípido, proteína de membrana o proteína soluble).

La Fig. 39 muestra termoforesis y atrapamiento termóforo de vesículas lipídicas. Las imágenes (200 x 200 μm) muestran una solución de vesículas unilamelares, sin (a) y después de 10 segundos de calentamiento por láser infrarrojo, (a) muestra una distribución uniforme de las vesículas. El láser infrarrojo calienta la solución localmente a una temperatura máxima de 15 $^{\circ}\text{C}$ por encima de la temperatura ambiente de 20 $^{\circ}\text{C}$, ya que (b) muestra que el aumento de la temperatura local atrae a las vesículas (es decir, termoforesis negativa) y confina su posición a una región cercana al centro del punto de calor. La región alrededor del punto de calor está agotada de vesículas. Las vesículas más cercanas al borde del campo de visión experimentan sólo un pequeño gradiente y no son atraídas dentro del lapso de tiempo de 10 segundos. La ampliación del perfil de temperatura también atraerá estas partículas mucho más rápidamente.

Ejemplos

El siguiente ejemplo detallado ilustra la invención, que se define por las reivindicaciones adjuntas, sin ser limitante.

Ejemplo 1: Termodifusión

Las moléculas se desplazan a lo largo de los gradientes de temperatura, un efecto denominado termoforesis, efecto de Soret o termodifusión. En los líquidos, su fundamento teórico es objeto de un debate entablado desde hace tiempo. Mediante el uso de un nuevo procedimiento de fluorescencia de microfluidos totalmente óptica, se presentan resultados experimentales para ADN y perlas de poliestireno sobre una amplia gama de tamaños de partícula, concentración de sal y temperatura. Los datos apoyan una teoría unificadora basada en la entropía de la solvatación. Expresado en términos generales, el coeficiente de Soret viene dado por la entropía negativa de la solvatación, dividida por kT . La teoría predice la termodifusión de perlas de poliestireno y ADN sin parámetros libres. Se asume un equilibrio termodinámico local de las moléculas de disolvente alrededor de la molécula. Este supuesto se cumple para gradientes de temperatura moderados por debajo del criterio de fluctuación. Por encima de este criterio, la termodifusión se vuelve no lineal. Tanto para el ADN como para las perlas de poliestireno, el movimiento termóforo cambia de signo a temperaturas inferiores. Esta termofilicidad hacia temperaturas más bajas se atribuye a

una creciente entropía positiva de hidratación, mientras que la termofobicidad generalmente dominante se explica por la entropía negativa del blindaje iónico. La comprensión de la termodifusión establece el escenario para el sondeo detallado de las propiedades de solvatación de coloides y biomoléculas. Por ejemplo, se determina con éxito la carga eficaz de ADN y perlas en un intervalo de tamaño que no es accesible con electroforesis.

5 *Introducción.* La termodifusión se conoce desde hace mucho tiempo, pero su explicación teórica para las moléculas en líquidos todavía está en discusión. La búsqueda de la comprensión teórica está motivada por el hecho de que la termodifusión en el agua podría conducir a poderosos procedimientos de selección totalmente ópticos para biomoléculas y coloides. Igualmente bien, la termodifusión maneja y mueve las moléculas ópticamente por completo y, por lo tanto, puede complementar procedimientos bien establecidos, como por ejemplo electroforesis o pinzas ópticas. Para esto último, las fuerzas de las pinzas ópticas se escalan con un volumen de partículas y limitan este procedimiento a las partículas sólo mayores de 500 nm. La electroforesis no sufre limitaciones de fuerza, pero es difícil de miniaturizar debido a las reacciones electroquímicas en los electrodos.

10 Por otro lado, la termodifusión permite la manipulación a microescala incluso de pequeñas partículas y moléculas. Por ejemplo, el ADN de 1000 pb se puede modelar arbitrariamente en agua a granel (Figura 7). El "ADN" del patrón de temperatura, calentado en 2 K, se escribió en una película de agua con un microscopio de exploración de láser infrarrojo. La concentración de ADN de 1000 pb se formó en imagen usando una etiqueta de ADN fluorescente. En una cámara enfriada en su totalidad a 3 °C, el ADN se acumula hacia las letras calientes "ADN" (efecto Soret negativo), mientras que a temperatura ambiente, el ADN es termóforo (efecto Soret positivo) como se observa por las letras oscuras.

20 En el pasado, la aparente complejidad de la termodifusión impedía una descripción teórica completa. Como se observa para el ADN en la Figura 13, las moléculas se agotan característicamente de regiones con un aumento de temperatura, pero también pueden mostrar el efecto inverso y acumularse³. Además, la escala de tamaño de la termodifusión registrada por fraccionamiento de flujo de campo térmico (ThFFF) mostró leyes de potencia fraccional con una diversidad de exponentes que son difíciles de interpretar⁴. Este último efecto se resolvió recientemente mediante la revelación de la deriva termófora no lineal para los fuertes gradientes térmicos utilizados en ThFFF.

25 Se utilizaron una diversidad de procedimientos para medir la termodifusión, principalmente en el régimen no acuoso. Varían desde la desviación del haz^{3,7}, dispersión holográfica^{8,9}, calentamiento eléctrico a lentes térmicas. Recientemente, se ha desarrollado una técnica de formación de imágenes de microfluidos de fluorescencia^{13,14} que permite la medición de la termodifusión en un amplio intervalo de tamaños de molécula sin artefactos inducidos por la convección térmica. Las suspensiones altamente diluidas pueden medirse y, por lo tanto, las interacciones partícula-partícula no tienen influencia. Sólo se aplican gradientes moderados de temperatura. A continuación, se usó este procedimiento para confirmar una explicación teórica directa de la termodifusión.

30 *Enfoque teórico.* Para concentraciones diluidas, se asume generalmente que la velocidad de deriva termodifusiva \bar{v} depende linealmente del gradiente de temperatura ∇T con una constante de proporcionalidad que equivale al coeficiente de termodifusión D_T : $\bar{v} = -D_T \nabla T$. En estado estacionario, la termodifusión se equilibra mediante difusión ordinaria. Los coeficientes difusión y termodifusión constante conducen a una ley de agotamiento exponencial¹⁶ $c/c_0 = \exp[-(D_T/D)(T-T_0)]$, dependiendo la concentración c únicamente de la diferencia de temperatura $T-T_0$. La concentración c se normaliza por la condición límite de la concentración C_0 con la temperatura T_0 . El coeficiente de Soret se define como la relación $S_T = D_T/D$, que determina la magnitud de la termodifusión en el estado estacionario. Si bien la distribución exponencial anterior podría motivar un enfoque basado en las estadísticas de equilibrio de Boltzmann, se argumenta comúnmente que la termodifusión, sin excepción, es un efecto local de no equilibrio que requiere dinámica de fluidos, campos de fuerza o potenciales de disolventes de partículas¹⁷⁻²⁰. Sin embargo, en dos documentos anteriores¹⁶ se demostró que para los gradientes moderados de temperatura, las fluctuaciones térmicas de la partícula son la base para un equilibrio local. Esto permite la descripción del estado estacionario termodifusor por una sucesión de leyes locales de Boltzmann, produciendo $c/c_0 = \exp[(G(T_0)-G(T))/kT]$ con G la entalpía libre de Gibbs del sistema de disolvente de partícula única. Tal enfoque sólo es válido si el gradiente de temperatura ∇T está por debajo de un umbral $\nabla T < (aS_T)^{-1}$ que se da por las fluctuaciones de las partículas con el radio hidrodinámico a y el coeficiente de Soret S_T , como se muestra recientemente. Para gradientes de temperatura más grandes, la deriva termodifusiva no depende linealmente del gradiente de temperatura. En el presente estudio, los gradientes de temperatura por debajo de este límite se utilizaron para que la termodifusión se midiera en condiciones de equilibrio termodinámico local.

45 El equilibrio termodinámico local permite la derivación de una base termodinámica del coeficiente de Soret. La distribución local de Boltzmann relaciona pequeños cambios de concentración δc con pequeñas diferencias de energía libre de Gibbs: $\delta c/c = -\delta G/kT$. Se compara esta relación con un estado estacionario de termodifusión localmente linealizado dado por $\delta c/c = -S_T \delta T$, y así se encuentra el coeficiente de Soret por la derivada de temperatura de G .

$$S_T = D_T / D = (kT)^{-1} \times \partial G / \partial T \quad (1)$$

Mientras que la relación anterior es suficiente para la siguiente derivación, puede generalizarse aplicando localmente la relación termodinámica $dG = -SdT + Vdp + \mu dN$. Para las partículas individuales a presión constante, se cuenta que el coeficiente de Soret es igual a la entropía negativa del sistema de disolvente de partículas S de acuerdo con $S_T = -\Delta S/kT$. Esta relación no es sorprendente, ya que la entropía está por definición relacionada con la temperatura derivada de la entalpía libre.

El tratamiento energético general anterior es inherente a los enfoques descritos anteriormente sobre la base de equilibrio local²², incluyendo la interpretación exitosa de voltajes termoeléctricos de electrolitos diluidas^{24,25} que se describen por energías de transferencia. Recientemente, se aplicó el procedimiento de no equilibrio por Ruckenstein a los coloides²⁷ con la longitud característica 1 asignado a la longitud de Debye λ_{DH} . Si por el contrario sería asignado la longitud característica de acuerdo con $1 = 2a/3$ con la partícula radio a, el enfoque Ruckenstein en realidad confirmar la relación de equilibrio local de más arriba (1) para el coeficiente de Soret. Las mediciones en micelas de SDS²⁷ parecen confirmar este enfoque no está en equilibrio, pero para los elegidos partículas de las opciones de los parámetros de la competencia $1 = 2a/3$ y $1 = \lambda_{DH}$ dieron valores comparables. Así, los experimentos no podían distinguir entre las teorías de la competencia.

A continuación, vamos a utilizar las relaciones de equilibrio locales anteriores para obtener el coeficiente de Soret para las partículas más grandes que la longitud de Debye en soluciones acuosas y poner los resultados a las pruebas experimentales rigurosos. Dos contribuciones dominan la entropía S de partículas en el agua (Figura 8a): la entropía de blindaje iónica y la entropía sensible a la temperatura del agua de hidratación. La contribución de la entropía de blindaje iónico se calcula con la derivada de la temperatura de la entalpía libre de Gibbs-G^{27,28} $S_T^{(ionic)} = Q_{eff}^2 \lambda_{DH} / [2A\epsilon\epsilon_0]$ con la carga efectiva Q_{eff} y superficie de la partícula A. Alternativamente, esta entalpía se puede interpretar como una energía de campo eléctrico $G_{ionica} = Q_{eff}^2 / [2C]$ en el condensador C. blindaje iónica Descuidamos las interacciones partícula-partícula ya que el enfoque de fluorescencia permite la medición de sistemas diluidas. Para obtener el coeficiente de Soret, derivados de temperatura consideran la longitud de Debye $\lambda_{DH}(T) = \sqrt{\epsilon(T)\epsilon_0 kT / (2e^2 c_s)}$ y los ϵ constantes dieléctricas (T). Ambos derivados de temperatura dan lugar a un factor $\beta = 1 - (T/\epsilon) \partial\epsilon/\partial T$. El Q_{eff} efectiva la carga Q es en gran medida insensible a la temperatura que se confirmó mediante electroforesis de forma independiente²⁹. una dependencia de este tipo sería inesperado que los iones fuertemente adsorbido dominan el valor de la carga efectiva. Experimentalmente, nos ocupamos de los coloides que presentan superficies planas, es decir, el radio de la partícula es mayor que λ_{DH} . En este caso renormalización carga no juega un papel y que puede introducir una carga superficial $\sigma =$ densidad efectiva Q_{eff}/A por molécula de área A. A partir de la derivación de temperatura de acuerdo con la ecuación (1), la contribución iónica para el coeficiente de Soret es $S_T^{(ionic)} = (A\beta\sigma_{eff}^2 \lambda_{DH}) / (4\epsilon\epsilon_0 kT^2)$. Una relación similar se deriva de micelas cargadas recientemente²³, sin embargo, sin tener en cuenta la dependencia de la temperatura del coeficiente ϵ dieléctrico. A continuación, la contribución al coeficiente de Soret de la entropía de hidratación de agua puede deducirse directamente de la sala de partículas de hidratación de entropía específica $s = S_{hyd} / A$, es decir, $S_T^{(hyd)} = -As_{hyd}(T) / kT$. Por último, la contribución del movimiento browniano se deriva como $S_T = 1/T$ mediante la inserción de la energía cinética de la partícula $G = kT$ en la ecuación (1). Sin embargo, esta contribución es muy pequeña ($S_T = 0,0034/K$) y puede ser descuidado por las moléculas en estudio. Las contribuciones de blindaje iónica y la entropía de hidratación se suman a:

$$S_T = \frac{A}{kT} \left(-s_{hyd} + \frac{\beta\sigma_{eff}^2}{4\epsilon\epsilon_0 T} \times \lambda_{DH} \right) \quad (2)$$

El coeficiente de Soret S_T escala de forma lineal con la superficie de la partícula A y Debye λ_{DH} longitud λ . Probamos la ecuación (2) mediante la medición de S_T frente a la concentración de sal, temperatura y tamaño de la molécula. En todos los casos thermodiffusion se predice cuantitativamente sin ningún tipo de parámetros libres. Se utilizó la fluorescencia de seguimiento sola partícula de seguir perlas de poliestireno modificado (PS) carboxilo (Molecular Probes F-8888) de 1,1 micrómetros y 0,5 micrómetros de diámetro a 25 attomolar concentración, se dializa en 0,5 mM Tris-HCl a pH 7,6. Termodifusión de partículas $\leq 0,2\mu m$ se mide por la disminución de la fluorescencia que refleja el agotamiento mayor parte de las partículas de¹³. El espesor de la cámara de 20 micrómetros amortiguar el convección térmica a velocidades insignificantes¹⁶. El diseño experimental también excluye el efecto de lente térmica y captura óptica¹⁶. Longitud de Debye λ_{DH} se titularon con KC1 (ver material complementario).

La dependencia de la sal. La figura 8b muestra los coeficientes de Soret de perlas de poliestireno de diferentes tamaños en comparación con λ_{DH} . Los coeficientes de Soret escala linealmente con una pequeña intersección en $\lambda_{DH} = 0$ y confirman la -dependencia λ_{DH} de la ecuación (2). Para diámetros más pequeños de las cuentas de los coeficientes Soret escala con el área de superficie de la partícula A (Figura 8), como se espera de la ecuación (2). Para comprobar si la ecuación (2) también explica cuantitativamente los coeficientes de Soret medidos, inferimos la carga efectiva de las perlas por electroforesis (ver material complementario). El uso de perlas de 40 nm con modificaciones superficiales carboxilo idéntica a $\lambda_{DH} = 9,6nm$, hemos observado con fluorescencia electroforesis de flujo libre y corregido por electroósmosis, la búsqueda de una densidad de carga superficial efectiva de $\sigma_{eff} = 4500 \pm$

2000e/m². Este valor es prácticamente independiente de las concentraciones de sal utilizadas²⁹. Usando esta carga efectiva inferido, la ecuación (2) se ajusta el coeficiente de Soret para diferentes tamaños de grano y las concentraciones de sal así (Figura 8b, líneas continuas).

5 La intersección S_T ($\lambda_{DH} = 0$), donde las contribuciones iónicas son cero, también se escala con la superficie de las partículas y se describe mediante una hidratación entropía por unidad de superficie de las partículas de $s = s_{hyd} - 1400J/(molK\mu m^2)$. El valor coincide con los valores de la bibliografía para superficies similares razonablemente bien^{30,31}. Por ejemplo, dansilo-alanina, una molécula con grupos superficiales comparables con perlas de poliestireno, se midió para tener una entropía de hidratación³⁰ de $-0,13 J/(molK)$ a una temperatura comparable. Escala lineal con su área de superficie mediante el uso de un radio de $a = 2$ resultados nm en un valor de $S_{hyd} = -2500 J/(molK\mu m^2)$, de acuerdo con nuestro resultado cualitativo. La entropía de hidratación es un parámetro molécula altamente informativo que es notoriamente difícil de medir, produciendo una aplicación interesante para termodifusión.

15 *Dependencia de la temperatura.* Entropías de hidratación S_{hyd} en agua se sabe que aumenta linealmente con la disminución de las temperaturas^{de 30-32}. Como la pendiente de la contribución iónica de S_T frente λ_{DH} es con la temperatura de alta precisión insensible para el agua ($\beta(T)/(\epsilon T^2) \cong const$), se espera que sólo el intercepto a disminuir a medida que la temperatura global de la cámara se reduce. Este es de hecho el caso, como se ve desde la dependencia de la temperatura de los granos con 1,1 m de diámetro (Figura 9a, $T = 6 \dots 29$ °C) Inferimos de la intersección S_T ($\lambda = 0_{DH}$) que la entropía de hidratación cambia de signo a aproximadamente 20 °C. Como se observa para el ADN en la Figura 7, la entropía de hidratación puede dominar termodifusión a bajas temperaturas y mover moléculas a la caliente ($D < 0_T$).

20 Las propiedades de hidratación plomo entropía a un aumento lineal de S_T sobre las temperaturas en la concentración de sal fija como midieron para 1.1 micrómetros perlas y ADN (Figura 9b). Normalizamos S_T dividiendo con S_T (30 °C) para compensar la superficie molécula. Las pendientes de S_T más de temperatura difieren entre los talones y el ADN. Sin embargo, la pendiente no se diferencia entre el ADN de diferente tamaño (50 pares de bases frente a 10000 pares de bases). Sobre la base de la ecuación (2), esto es de esperar ya que la dependencia de la temperatura de la entropía de hidratación solo depende del tipo de superficie de la molécula, no su tamaño. Medimos los coeficientes de difusión de las especies de ADN a la temperatura respectiva de forma independiente. Dentro del error experimental, los cambios en el partido D coeficiente de difusión con el cambio de la viscosidad del agua sin la necesidad de asumir cambios conformacionales de ADN sobre el rango de temperatura. Tenga en cuenta que el cambio del signo del coeficiente de ADN Soret está situado cerca del punto de máxima densidad del agua sólo por casualidad. Allí, el balance de dos contribuciones entrópicas. Para perlas de poliestireno en $\lambda_{DH} = 2$ nm, por ejemplo, el cambio de signo se observa a 15 °C (Fig. 9a). Un aumento del coeficiente de Soret sobre temperatura se informó de soluciones acuosas antes de³, sin embargo, con una no linealidad distinta que atribuimos al remanente interacciones partícula-partícula.

35 *Tamaño dependencia de las perlas.* El coeficiente de Soret se midió para modificado carboxilo perlas de poliestireno de diámetro que van de 20 nm a 2 micrómetros (Molecular Probes, F-8888, M-8795, M-8823, M-8827). Las gotas de un diámetro de 0,2 m, 0,1 m, 0,04 m y 0,02 m se diluyeron a concentraciones de 10 pM, 15 pM, 250 pM y 2 nM, y su fluorescencia mayor fue fotografiada con el tiempo para derivar D_T y $D^{13,16}$ de la el agotamiento y posterior retrodifusión. Los granos más grandes con un diámetro de 1,9 m, 1,1 m y 0,5 m se diluyeron a concentraciones de 3,3 aM, 25 aM y las 24:02, y se midió con el seguimiento de⁶ sola partícula. Las soluciones fueron amortiguadas en 40 1 mM Tris pH 7,6 con $\lambda = \lambda_{DH} = 9.6$ nm. En todos los casos las interacciones entre las partículas pueden ser excluidas. Se tuvo cuidado de mantener el gradiente de temperatura en el régimen de equilibrio local.

Nos encontramos con que el coeficiente de Soret con las escalas de superficie de las partículas de más de cuatro órdenes de magnitud (Figura 10a). Los datos se describe bien con la ecuación (2) con una densidad de carga de superficie efectiva de m² y la contribución hidratación entropía $\sigma_{eff} = 4,500$ e/descuidado. El 5 veces demasiado baja predicción para la partícula más pequeño (20 nm de diámetro) se puede explicar por la renormalización de carga desde su radio es más pequeño que λ_{DH} .

50 El coeficiente de difusión D para las esferas está dada por la relación de Einstein y escala inversamente con el radio $D \propto 1/a$. Inserción de la ecuación (2) en $S_T = D_T/D$, se espera que el coeficiente de termodifusión D_T a escala con un radio de la partícula. Esto se confirma experimentalmente más de dos órdenes de magnitud (Figura 10b). Estos hallazgos contradicen la nuestra de varios estudios teóricos que declaran que la D_T debe ser independiente del tamaño de partícula^{17-20,27}, basado en resultados experimentales ambiguas de fraccionamiento campo térmico de flujo (ThFFF)⁴ que fueron probablemente sesgada por termodifusión no lineal en grandes gradientes térmicos.

55 *Dependencia del tamaño del ADN.* Mientras que las perlas de poliestireno comparten una distribución de tamaño muy estrecha como una característica común con las moléculas de ADN, las perlas son un sistema modelo mucho menos complicado. Las perlas son esferas rígidas que interactúan con el disolvente únicamente en su superficie. Además, las cargas residen en la superficie donde la proyección tiene lugar. Por lo tanto, el hallazgo de que la termodifusión de ADN flexible y cargado homogéneamente se describe igualmente bien descrito con la ecuación (2) no se espera fácilmente y es bastante interesante (figura 10c, d).

Se mide el tamaño del ADN con 50 pares de bases con respecto a 48502 pares de bases en tampón TRIS 1 mM

($\lambda_{DH} = 9-6$ nm) a bajas concentraciones de moléculas entre 1 μ M (50 pb) y 1 nM (48502 pb). Únicamente una de cada 50 pares de bases se tiñó con el colorante fluorescente TOTO-1. El coeficiente de difusión se midió por retrodifusión después de que el láser se apagara y depende de la longitud L del ADN de una forma no trivial. Los datos se ajustan bien con una escala de radio hidrodinámico una $\propto L^{0.75}$. Esta escala representa un medio efectivo de más de dos regímenes de ADN de longitud. Para las moléculas de ADN más largo que aproximadamente 1000 pares de bases, una escalada de 0,6 se encontró mientras que ³³ más corta de ADN se escala con un exponente de $\cong 1$ (ver material complementario).

Podemos describir el coeficiente de Soret medido más de tres órdenes de magnitud de ADN con longitudes de la ecuación (2) si se supone que la carga efectiva de la DNA está protegido en la superficie de una esfera con el radio hidrodinámico a. Debido a la concentración de sal baja ($\lambda_{DH} = 9,6$ nm), tal blindaje globular es razonable. No sólo es la escala observada experimentalmente el coeficiente de Soret con la raíz cuadrada de su longitud predijo correctamente basa en la ecuación (2) ($S_T \propto Q_{eff}^2/a^2 \propto L^2/L^{1.5} \propto L^{0.5}$), También el coeficiente de Soret se describe completamente en una manera cuantitativa (Figura 10C, línea continua), con una carga efectiva de 0,12 E por base, a juego bien con la bibliografía valores ³⁴ que van desde 0,05 e/pb a 0,3 e/pb.

Como se muestra en la Figura 10d, el coeficiente de termodifusión para el ADN cae con la longitud de ADN de acuerdo con $D_T = T DS \propto Q_{ef}^2/un^3 \propto L^2/L^{2.25} \propto LT^{-0.25}$. Por lo tanto, el ADN más corto en realidad se desplaza más rápido en un gradiente de temperatura de ADN más larga. Es importante señalar que este resultado está en contradicción con los resultados experimentales de un D_T constante en toda la longitud del polímero en entornos no acuosos ⁹. De acuerdo con la ecuación (1), el parámetro relevante termodinámico es el coeficiente de Soret, determinado por la energética de solvatación. El argumento de que los polímeros tienen que desacoplar en monómeros para mostrar una constante D_T simplemente se convierte en el caso especial en que la energética de solvatación determinan tanto S_T y D con igual pero invertida escala de tamaño. De acuerdo con nuestro argumento local de energía de equilibrio, S_T y D no domina thermodiffusion también para polímeros no acuosos cerca de una transición vítrea ³⁵. Aquí, S_T es constante, mientras que la escala D_T y D de acuerdo con un aumento de la fricción. Sin embargo, para un sistema de ADN en solución, donde van a largo blindaje parejas los monómeros, un D constante T sobre la longitud de polímero no se puede suponer a priori (Figura 10d).

Carga efectiva. El FEP efectiva la carga Q es un parámetro de gran importancia para la ciencia de coloides, la biología y la biotecnología. Hasta ahora sólo se podía deducir de la electroforesis, restringido a partículas más pequeñas que la longitud de Debye ($a \leq 3\lambda_{DH}$) ³⁶. Por desgracia, muchos coloides están fuera de este régimen. Como se muestra antes, una restricción de tamaño similar no se cumple para thermodiffusion. En muchos casos, $_{hyd}$ la entropía de hidratación s aporta menos del 15% (Figura 8) y se puede despreciar a niveles moderados de sal. Así, podemos invertir la ecuación (2) para obtener la carga Q_{eff} eficaz para moléculas esféricas de

$$Q_{eff} = \frac{2T^2}{3\eta D} \sqrt{\frac{\epsilon\epsilon_0 k^3 S_T}{\beta\pi\lambda_{DH}}} \quad (3)$$

La carga efectiva derivada de las mediciones thermodiffision de perlas de poliestireno y el ADN se representa en la figura 11 sobre varios órdenes de magnitud en tamaño. La carga efectiva de perlas de escala de forma lineal con la superficie de la partícula con una pendiente de confirmar la densidad de carga superficial efectiva de $\sigma_{ef} = 4500$ e/m² que se infiere de la electroforesis sólo para partículas pequeñas. Promedio de las desviaciones de la escala lineal están por debajo del 8% (Figura 11a). La carga efectiva inferido a partir de mediciones thermodiffision de ADN utilizando la ecuación (3) escalas linealmente con la longitud de ADN con una carga efectiva de 0,12 e por par de bases. La escala de longitud se confirmó más de cuatro órdenes de magnitud con un error promedio de 12% (Figura 11b). Por lo tanto thermodiffision puede utilizarse para inferir la carga efectiva con errores bajas para una amplia gama de tamaños de partículas. Esto es aún más interesante para la caracterización de biomoléculas ya que las mediciones de thermodiffision se pueden realizar todo de forma óptica en volúmenes picolitros.

Conclusión. Describimos thermodiffision, la deriva a lo largo de gradientes de temperatura molécula, en líquidos con una teoría general, microscópico. Aplicado a soluciones acuosas, esta teoría predice thermodiffision de perlas de ADN y de poliestireno con una precisión media de 20%. Experimentalmente validar dependencias principales parámetros de la teoría: la linealidad y la longitud de detección λ_{DH} y el área hidrodinámico molécula A , la dependencia cuadrática en la carga y la linealidad efectiva frente a la temperatura. Las mediciones de thermodiffision pueden ser miniaturizados a escala del micrón con la técnica de fluorescencia totalmente óptico utilizado y permite diferencias de temperatura microscópicas para manipular moléculas en base a sus propiedades de superficie (Figura 7). La descripción teórica permite extraer la entropía de solvatación y la carga eficaz de las moléculas y partículas en un amplio rango de tamaño.

Control de la temperatura por infrarrojos. Los gradientes de temperatura utilizadas para inducir movimientos thermodiffusive fueron creados por la absorción acuosa de un láser infrarrojo de longitud de onda a 1480 nm y 25 mW de potencia (Furukawa). El agua absorbe fuertemente a esta longitud de onda con una longitud de atenuación de $k = 320$ micrómetros. El rayo láser se centró moderadamente con una lente de 8 mm de distancia focal.

Típicamente, la temperatura en la solución se elevó por 1 - 2 K en el centro del haz con un diámetro $1/e^2$ de 25 micrómetros, medido con la señal de fluorescencia dependiente de la temperatura de la BCECF colorante¹³. Alturas cámara delgada de 10 micrómetros a 20 micrómetros y moderada centrándose eliminan posibles artefactos de captura óptica, el efecto de lente térmica y convección térmica¹³. Para las mediciones dependientes de la temperatura tanto en el objetivo y el chip de microfluidos se templaron con un baño termal. Imaging se proporciona desde un microscopio de fluorescencia Axiotech Vario (Zeiss), sistema de iluminación con un LED de alta potencia (Luxeon) y grabado con la cámara CCD Senciscam QE (PCO).

Moléculas. Altamente monodisperso y el ADN de 50 pb, 100 pb, 1000 pb, 4000 pb, pb 10000 y 48502 pb libre de proteínas (Regla rápida, fragmentos y λ -DNA, Fermentas) se diluyeron a la concentración de 50 mM par de base, es decir, la concentración de la molécula fue entre 1 M (50 pb) y 1 nM (48502 pb). ADN fue marcado con fluorescencia por el tinte fluorescente intercalante TOTO-1 (Molecular Probes, Oregon) con una baja relación de tinte/pares de bases de 1/50. modificado carboxilo perlas de poliestireno de diámetro 2 μ m, 1 μ m, 0,5 μ m, 0,2 μ m, 0,1 μ m, 0,04 μ m y 0,02 μ m (F- 8888, F-8823, M-8827, M-8888, M-8795, M-8823, F-8827, Molecular Probes) fueron dializados (mini Eluta tubo, Fermentas) en solución acuosa. dest. y se diluyeron en 1 mM Tris pH 7,6 a concentraciones entre 3,3 μ M (2 μ m) y 2 nM (0,02 μ m).

formación de imágenes de concentración con el tiempo. O bien el procedimiento de formación de imágenes de concentración¹³ o rastreo de partículas solo se utilizaron para medir termodifusión a bajas concentraciones, es decir, por debajo de 0,03 g/l de ADN y 10^{-5} g/l para los granos. En concentraciones más altas, encontramos profundos cambios en los coeficientes de termodifusión. ADN y perlas de poliestireno más pequeñas que la concentración de 0,5 μ m de diámetro se obtuvieron imágenes con el tiempo¹³ por fluorescencia de campo claro con un objetivo de inmersión en aceite 40x. Las concentraciones inferidas después de corregir para el blanqueo, la iluminación no homogénea y fluorescencia dependiente de la temperatura¹³ fueron equipados con una teoría de elementos finitos. El modelo captura todos los detalles tanto el agotamiento termodifusivo y backdiffusion para medir D_T y D de forma independiente (ver material complementario). Las mediciones se realizaron en chips microfluídicos 10 μ m de altura con PDMS en ambos lados¹³.

rastreo de partículas única. partículas de poliestireno mayor que 0,5 μ m de diámetro se midieron por rastreo de partículas único debido al tiempo de equilibrado lento y el riesgo de que el agotamiento de estado estacionario es perturbado por convección térmica. La deriva termodifusiva Se obtuvieron imágenes con un objetivo de aire 32 x 4 en Hz en una etapa inicial de agotamiento en una cámara de espesor 20 micrómetros. Un promedio de más de la posición z de las partículas de los efectos de la convección térmica eliminado. La velocidad de deriva frente a un gradiente térmico de 400 pistas fueron linealmente instalado por $v = -D_T \nabla T$ para inferir D_T . El coeficiente de difusión D de las partículas se evaluaron en función de su desplazamiento al cuadrado, a juego dentro del 10% de la relación de Einstein.

La presente invención no está limitada por lo que se ha mostrado y descrito particularmente anteriormente en este documento. Más bien, el alcance de la presente invención definida por las reivindicaciones adjuntas, incluye ambas combinaciones y sub-combinaciones de las características descritas anteriormente en este documento, así como modificaciones y variaciones de la misma que se le ocurrirían a un experto en la técnica al leer la descripción anterior y que son no en la técnica anterior.

Calefacción por infrarrojos. Los gradientes de temperatura utilizadas para inducir movimientos termóforo son creados por absorción acuosa de una fibra acoplado láser de estado sólido de infrarrojos (Furukawa FOL1405- RTV-317), con una longitud de onda de 1.480 nm y una potencia máxima de 320 mW se usa típicamente a 25 mW. El agua absorbe fuertemente a esta longitud de onda con una longitud de atenuación de $k = 320$ micrómetros. La luz infrarroja se acopla a cabo de la fibra para formar un haz paralelo con un diámetro $1/e^2$ de 1 mm. La posición del haz en el plano X/Y se puede ajustar por dos espejos infrarrojos galvanométricamente controladas (Cambridge Technology 6200-XY escáner con controlador 67120). El rayo láser se enfoca desde abajo de la etapa de objeto por una lente esférica corregido de infrarrojos con 8 mm de distancia focal (Thorlabs, C240TM-C). Típicamente, la temperatura se aumentó en solamente 2 K en el foco caliente.

Medición de la temperatura. El gradiente de temperatura se midió a través de la señal de fluorescencia dependiente de la temperatura de la BCECF colorante, se diluye a 50 mM en tampón de TRIS 10 mM. Los detalles de la corrección de blanqueo y la extracción de temperatura fueron descritos anteriormente¹³. A partir de la dependencia de la temperatura total de BCECF de -2,8%/K, sólo el -1,3%/K se debe a la deriva de pH del tampón TRIS utilizado. El -1,5% restante/K son el resultado de termodifusión del colorante en sí, medido a ser $S_T = 0,015/K$ con la concentración sobre el procedimiento descrito a continuación.

"ADN" de la imagen. Medición del perfil de "ADN" en la Figura 7 se llevó a cabo en una cámara de espesor 60 micrómetros entre portaobjetos de vidrio, fotografiada con un 10 x objetivo y se calienta a 2 K a lo largo de las letras "ADN" con barrido láser. La cámara se llenó con una solución 50 nM de 1000 bp de ADN se tiñeron con el colorante fluorescente intercalante TOTO-1 (Molecular Probes) Para cambiar de agotamiento a la acumulación, el experimento se llevó a cabo a temperatura ambiente o con la cámara se enfrió a 3 °C, respectivamente.

enfoques de fluorescencia. Históricamente, los procedimientos utilizados para medir termodifusión en líquidos se

basan en los cambios en el índice de refracción en el cambio en la concentración de soluto²⁷. Inherentemente, esta señal es pequeña para bajas concentraciones de soluto cerca del límite de las moléculas que no interactúan, incluso para los procedimientos de detección intrincados como el efecto de lente térmica o interferencia holográfica³⁸. Aunque opera a volumen mucho más pequeño, el enfoque de microfluidos fluorescente usada¹³ permite concentraciones de 0,03 g/l para el ADN y alcanza 10⁻⁵ g/l para el seguimiento de una sola partícula. Esto es necesario, ya que por ejemplo en termodifusión de ADN, vemos cambios profundos en concentraciones más altas.

Termodifusión de la concentración con el tiempo. Ambas orugas de ADN y de poliestireno menor que 0,5 m de diámetro se mide por la formación de imágenes concentración de la molécula con el tiempo por la fluorescencia de campo brillante. Un procedimiento más básico de estado estacionario fue descrito previamente¹³. Aquí, hemos refinado con una teoría numéricos para inferir coeficiente de difusión D y coeficiente de Soret S_T independiente.

ADN altamente monodisperso y libre de proteínas de 50 pb, 100 pb, 1000 pb, 4000 pb, 10.000 pb y 48.502 pb (Regla Fast, fragmentos y λ-DNA, Fermentas) se utilizaron para las mediciones dependientes de la longitud. El ADN fue marcado con fluorescencia por el tinte fluorescente intercalante TOTO-1 (Molecular Probes, Oregon) que muestra 1000 x aumento de la fluorescencia cuando se une a ADN. La relación tinte/pares de bases fue baja (1/50) para evitar los artefactos estructurales o de carga del colorante unido. La fluorescencia se observó con un objetivo de aceite 40 x. soluciones madre de ADN se diluyeron a la concentración de 50 mM par base, que corresponde a la molécula concentraciones entre 1 M (50 pb) y 1 nM (48 502 pb), respectivamente. perlas de poliestireno de diámetro 0,2 m, 0,1 m, 0,04 m y 0,02 m (Molecular Probes, Oregon, F-8888, M-8795, M-8823, M-8827) se dializó (Fermentas, Eluta tubo mini) en HCl ac. dest., y se diluyeron en 1 mM Tris pH 7,6 a concentraciones de 10 pM, 15 pM, 250 pM y 2 nM, respectivamente. Mediciones de termodifusión de ADN se realizaron en chips microfluidicos 10 m de altura con PDMS en ambos lados¹³. Permiten la medición de pequeños volúmenes en geometrías definidas delgadas. perlas de poliestireno se intercalaron entre una espesa deslizante 1,25 mm de poliestireno (el humo, Roth) en la parte inferior y una corredera de plástico (170 micrómetros de espesor, 1 cm x 1 cm, ibidi, Munich) en la parte superior y sellados con esmalte de uñas. Para las mediciones dependientes de la temperatura, tanto de aceite 40 x chip de microfluidos objetiva y se temple desde abajo con un baño termal. Tenga en cuenta que las temperaturas muy por debajo de 0 °C se pueden lograr como la geometría de microfluidos reduce la probabilidad de agua se congele.

La concentración de ADN se dedujo a partir de imágenes de fluorescencia, que se midieron con un objetivo x 40 aceite (NA = 1,3) en un microscopio de fluorescencia Axiotech Vario (Zeiss), sistema de iluminación con un LED de alta potencia (Luxeon) y fotografiado con la cámara CCD Sensicam QE (PCO). La serie de tiempo permite corregir para la iluminación no homogénea y blanquear¹³. Un photobleaching dependiente de series de tiempo significa que un factor de blanqueo individuo se determina para cada imagen. Esta corrección es una ventaja para mediciones de alta precisión para termoforesis proteína. Si las moléculas individuales eran visibles en la fluorescencia, se utilizó un promedio de tiempo de un promedio de más posiciones de las partículas.

Se tomaron perfiles radiales con el tiempo y combinar una imagen del espacio-tiempo tanto del agotamiento termóforo y difusión de nuevo a (Figura 12a, c). La fluorescencia se ajustó para la dependencia de la temperatura del colorante TOTO-1 determinado de forma independiente con un espectrómetro de fluorescencia como -0,5%/K. Por lo general, la temperatura de la solución se elevó por 1 - 2 K en el centro del haz con un diámetro de 1/e² de 25 micrómetros.

El coeficiente de Soret S_T se puede obtener a partir del perfil de estado estacionario. Teniendo en cuenta la temperatura en el radio r obtenido de la fluorescencia dependiente de la temperatura, la concentración de c(r) puede ser equipado con el perfil termóforo estado estacionario¹³ propuesta por

$$c(r) = c_0 e^{-S_T(T(r)-T_0)} \quad (4)$$

con temperatura de la cámara T₀ y la concentración mayor c₀.

También podemos obtener D y D_T independientemente mediante el análisis de la acumulación y el aplanamiento del perfil de concentración con el tiempo después de apagar el rayo láser infrarrojo encendido o apagado, respectivamente. Teoría fue proporcionada a partir del modelo de elementos finitos en coordenadas radiales (FEMLAB, Comsol) con el tiempo con condiciones de contorno de concentración obtenidos del experimento. Comparación con el experimento del transcurso del tiempo de agotamiento termóforo revela D_T (Figura 12c, d) y de la evolución en el tiempo después de apagar la fuente de calor se obtiene el coeficiente de difusión D (Figura 12a, b). Resultados para coeficientes de difusión obtenidos para las moléculas de ADN se muestran en la Figura 13. El escalado de D para el ADN más grande de 1000 pb de acuerdo bien con valores de la bibliografía y las expectativas teóricas³³. Sin embargo, para las moléculas de ADN en el orden de la longitud de persistencia (aproximadamente 150 bp) es necesario el exponente de ley de potencia de -0,6 no se ajusta con precisión los valores medidos y una escala diferente con un exponente de -1. Una buena descripción de los coeficientes de difusión de ADN en el rango de tamaño analizados a lo largo de este trabajo se logra con un exponente intermedio de -0.75.

longitud de cribado. Longitud de Debye-Hückel se valoró mediante la adición de C_s = 0 mM, 2 mM y 20 mM de

KCl a $C_T = 1$ mM de tampón Tris a pH 7,6 y calcula a partir de

$$\lambda_{DH} = \sqrt{\frac{\epsilon\epsilon_0 kT}{2e^2(c_S + c_T)}} \quad (5)$$

Los cambios en la carga efectiva de las moléculas pueden ser excluidos en estas concentraciones de sal monovalentes. Para valores mayores $\lambda_{DH} = 13.6$ nm, se utilizó exclusivamente Tris-HCl 0,5 mM pH 7,6.

5 **Thermodiffusion mediante el seguimiento de una sola partícula.** Para las partículas fluorescentes de poliestireno de gran tamaño (2 micrómetros, 1 μ , 0,5 μ , Molecular Probes, Oregon, F-8888, F-8823 y F-8827) un procedimiento diferente tuvo que ser utilizado debido a la creciente visibilidad de las partículas individuales, tiempo de equilibrado lento y el riesgo de que el agotamiento de estado estacionario es perturbado por convección térmica. Las perlas se sometieron a diálisis (Fermentas, Eluta mini tubo) en solución acuosa. dest., y se diluye en 1 mM Tris pH 7,6 a
10 concentraciones de 3,3 μ M, 25 μ M y 24:02, respectivamente. Termodifusión se midió en 20 micrómetros cámaras delgadas. Una diapositiva 1,25 mm de espesor de poliestireno (plato Petri, Roth, Karlsruhe) fue elegido como para el fondo de la cámara, mientras que un deslizamiento de plástico (170 micrómetros de espesor, 1 cm x 1 cm, ibidi, Munich) se tomó como hoja de la cubierta. La baja conductividad térmica garantiza una temperatura constante a través de la cámara. paredes de la cámara se hicieron hidrófilo en un limpiador de plasma (Harrick) durante 10 min a
15 10 W de potencia eléctrica. Como resultado de ello, la adsorción de partículas de poliestireno para el plástico es baja incluso a altas concentraciones de sal. Además de la solución de bolas 2 l entre las láminas de plástico, seguido por el sellado de la cámara de secado rápido con esmalte de uñas lleva a alturas de cámara reproducibles de 20 micrómetros.

20 Imaging estaba provisto de un microscopio de fluorescencia Axiotech Vario (Zeiss), sistema de iluminación con un LED de alta potencia (Luxeon) y fotografiado con la cámara CCD SensiCamQE (PCO). El centro de la llanura de vista se calentó 8 K por encima de la temperatura ambiente con gradiente de temperatura máxima de 0,2 K/my $1/e^2$ radio de mancha de 50 Temperatura fue fotografiada con BCECF como se ha descrito antes en una cámara separada. En la Fig. 14a simulación de elementos finitos de la situación experimental se muestra usando el software disponible Femlab comercial (Comsol). Una cámara de 20 micrómetros se calienta a 8 K en el centro. Debido a la
25 baja conductividad térmica de las paredes PS el perfil de temperatura es homogénea en toda la altura de la cámara (Fig. 14a). Debido a la cámara delgada la velocidad de convección se suprime a velocidades insignificantes de 5 nm/s como máximo (Fig. 14b). El movimiento de las partículas termóforo Se obtuvieron imágenes con un objetivo de aire 32 x y grabado en 4 Hz. Las partículas de todo el cámara de 20 micrómetros pueden ser rastreados por igual con un programa LabView encargo por escrito. Artefactos de convección térmica toroidal se promedian en un alto grado de interés como convectiva cerca de la pared de la cámara baja cancela con repulsión opuesta convectiva cerca de la parte superior de la cámara. Normalmente, la velocidad de 400 pistas se representó frente radio y
30 equipado con la velocidad de desplazamiento esperado de termodifusión de acuerdo a la deriva termóforo $v = -D_T \nabla T$ para encontrar la movilidad D termóforo T . fluctuaciones térmicas de las pistas fueron evaluados en función de su desplazamiento al cuadrado para obtener el coeficiente de difusión D de las partículas, que igualó en el 10% de la relación de Einstein $D = kT/(6\pi\eta a)$. Esto se espera ya que incluso para el peor de los casos, la cámara es 20 veces más grueso que el diámetro de las partículas medidas.

Electroforesis. Se midió la densidad de carga superficial eficaz para perlas de 40 nm de diámetro por la deriva electroforética en 400 micrómetros cámaras delgadas y 5 cm de largo (ibidi, Alemania). El perfil de velocidad en toda la altura de la cámara a 5 V fue tomado de rastreo de partículas única de 2 micrómetros perlas. A 80 μ m de altura el
40 flujo electroosmótico en una cámara herméticamente cerrado es cero ³⁹. Como era de esperar la velocidad de las partículas en este plano satura para partículas mayores de 100 nm y no está relacionado con carga efectiva ³⁶. Un alto objetivo aceite apertura numérica se ha usado para analizar la velocidad de 40 partículas de NM en la superficie de la cámara en las mismas condiciones. La diferencia de velocidad constante entre la superficie de la cámara y el plano de cero flujo electroosmótico medido antes se ha utilizado para calcular la velocidad puramente electroforética.

45 Referencias adicionales que se hace referencia en el presente documento anteriormente en el Ejemplo 1:

3. S.J. Jeon, M.E. Schimpf and A. Nyborg, Anal. Chem. 69, 3442-3450 (1997)
4. P.M. Shiundu, G. Liu, and J.C. Giddings, Anal. Chem. 67, 2705-2713 (1995)6
7. B.-J. de Gans, R. Kita, B. Müller and S. Wiegand, J. Chem. Phys. 118, 8073 (2003).
8. J. Rauch and W. Kohler, Phys. Rev. Lett. 88, 185901 (2002)
- 50 9. S. Wiegand and W. Kohler, in *Thermal Nonequilibrium Phenomena in Fluid Mixtures*, Springer, Berlin, 189 (2002)
13. D. Braun and A. Libchaber, Physical Review Letters 89, 188103 (2002)
14. S.R. de Groot, P. Mazur, *Non Equilibrium Thermodynamics* (North-Holland, Amsterdam, 1969)

16. A.H.Jr. Emery and H.G. Drickhammer, J. Chem. Phys. 23, 2252 (1955)
17. J.S. Ham, J. Applied Physics, 31, 1853 (1960)
18. K.I. Morozov, J. Experim. and Theor. Phys. 88, 944 (1999)
19. M.E. Schimpf and S.N. Semenov, J. Phys. Chem. B 104, 9935 (2000)
- 5 20. A. Voit, A. Krekhov, W. Enge, L. Kramer, and W. Kohler, Phys. Rev. Lett. 92, 214501 (2005)
22. S. Fayolle, T. Bickel, S. Le Boiteux and A. Würger, Phys. Rev. Lett. 95, 208301 (2005)
24. P.N. Snowdon, J.C.R. Turner, Trans. Faraday Soc. 56, 1409 (1960)
25. E. Ruckenstein, J. Colloid Interface Sci. 83, 77 (1981)
27. J. Israelachvili, Intermolecular & Surface Forces, 2nd edition, Academic Press, 1992
- 10 28. W. Lin, P. Galletto and M. Borkovec, Langmuir 20, 7465-7473 (2004)
29. D. Haidacher, A. Vailaya and C. Horváth, Proc. Natl. Acad. Sci. 93, 2290-2295 (1996)
30. NSP Southall, K.A. Dill and A.D.J. Haymet, J. Phys. Chem B 106, 521-533 (2002)
31. B. Kronberg, M. Costas and R. Silveston, Pure & Applied Chemistry 67, 897-902 (1995)

Ejemplo 2: Determinación del radio hidrodinámico y la interacción entre las proteínas

- 15 El procedimiento de caracterización termo-óptico de la presente invención permite también cuantificar el radio hidrodinámico de las proteínas y aún más importante de complejos de biomoléculas que no están conectadas covalentemente entre sí. Termoforesis proporciona una forma robusta y precisa comparable para medir el radio hidrodinámico de las moléculas de menos de un nanómetro hasta unas pocas micrómetros. En comparación con los otros procedimientos de caracterización termo-óptico de la precisión de este procedimiento no es demasiado sensible de la geometría de medición (por ejemplo, altura de la capa de líquido) como es el caso para las interacciones moleculares.
- 20

Data acquisition: Una medición típico puede describirse como sigue:

Etapa 1:

- 25 Una solución de moléculas marcadas con fluorescencia se pone en una cámara de medición de microfluidos (por ejemplo capilar, chip microfluídico). La fluorescencia se excita y se registra con una resolución espacial de menos de 5 segundos en un dispositivo CCD con una velocidad entre 40 Hz a 0,2 Hz (es decir, para la difusión de moléculas rápida, se elige una alta velocidad de cuadro). Estos imagen (s) proporciona la información necesaria sobre el nivel de fluorescencia a una concentración de 100%. A continuación, la excitación de fluorescencia se apaga.

Etapa 2:

- 30 El calentamiento por láser de infrarrojos está activada. La distribución de la temperatura espacial local establecido inmediatamente provoca la deriva molécula para bajar o temperaturas más altas, dependiendo de la molécula particular a analizar. El láser se enfoca de una manera que se consiguen los gradientes de temperatura entre 0,0 y 5 K/m. El gradiente de temperatura se ha calibrado una vez y no es necesario repetir esta calibración cada vez que se realiza un experimento. La elevación máxima de temperatura es inferior a la temperatura que se sabe que causa daño a las moléculas o desintegrarse su interacción. Dependiendo de las propiedades termóforo de las moléculas en la solución (es decir, si se mueven rápido en un gradiente térmico o lento) el láser infrarroja calienta la solución durante 5 segundos hasta 100 segundos. Después de este período de tiempo que el láser infrarrojo se apaga
- 35

Etapa 3:

- 40 Después de la distribución de temperatura espacial ha desaparecido (típicamente 2-50 ms) la excitación de fluorescencia se enciende y la fluorescencia se registra con la misma velocidad de trama utilizado en la primera etapa de formación de imágenes de fluorescencia. Esta vez la redistribución de las moléculas se forma la imagen durante 5 segundos hasta 50 segundos. El tiempo exacto depende de la velocidad con la que las moléculas se difunden (es decir, el tiempo que tardan en igualar el 90% del gradiente de concentración establecido por termoforesis).

- 45 **Procesamiento de datos - Photobleaching:** Las imágenes de fluorescencia tienen que ser corregidos para photobleaching. Puesto que no hay perfil de temperatura espacial en la solución mientras se toman imágenes de fluorescencia, la corrección de blanqueo es posible con alta precisión (es decir, de alta precisión es posible ya que la tasa de photobleaching es dependiente de la temperatura).

Por lo tanto, la fluorescencia en un borde de la cámara de medición (es decir, un lugar lo más lejos del centro de la calefacción como sea posible), fueron termoforesis durante la etapa 3 fue insignificante (es decir, para una persona experta en la técnica, esto es, donde el gradiente de temperatura durante el calentamiento de láser fue menor que 0,001 K/m), se evalúa para determinar la photobleaching de la serie de imagen tomada en el paso 3. Si photobleaching está presente, la fluorescencia se reducirá de imagen a imagen. El factor individual para cada imagen se utiliza para corregir todas las imágenes para blanqueo. Otra posibilidad es calcular el blanqueo para cada píxel de las imágenes tomadas en el paso 1. La tasa de blanqueo por píxel se puede utilizar para corregir cada píxel de la etapa 3 imágenes por el efecto photobleaching.

Procesamiento de datos - corrección de la iluminación no homogénea y la normalización de la concentración del 100%: Todas las imágenes tomadas en el paso 4 se dividen por una sola o todas las imágenes tomadas en el paso 2 y se multiplican por 100. De esta manera una corrección para la iluminación no homogénea se consigue y la fluorescencia se normaliza a 100% de concentración.

Procesamiento de datos - Determinación del radio hidrodinámico: Desde las primeras imágenes de la serie de imágenes paso 4 se extrae la distribución de concentración. Una herramienta de software evalúa el coeficiente de difusión (o varios coeficientes de difusión en caso de una mezcla) que describe la relajación medida experimentalmente de la gradiente de concentración. Utilizando la relación de Stokes-Einstein el radio hidrodinámico se infiere a partir del coeficiente de difusión.

En particular, el experimento descrito anteriormente se llevó a cabo en una muestra de GFP como sigue:

Las propiedades termo-ópticas de dos muestras de proteína verde fluorescente (GFP) se miden con los dispositivos de la presente invención. 2 l de GFP (5 mM, tampón 1 x PBS) se pipetearon en una diapositiva objeto. La muestra se intercala al enfrentar a un cubreobjetos (12 mm de diámetro y vuelta) en la parte superior. El líquido se extiende de manera uniforme entre las superficies de vidrio de una la cámara está sellada mediante el uso de esmalte de uñas. Esto evita que el líquido de evaporación rápida, que a su vez conduciría a un fuerte flujo comparable de líquido en la cámara. Esta muestra se palaced en un dispositivo que se muestra en la figura la. Los pasos de medición y los pasos de procesamiento de datos se llevan a cabo como se describe anteriormente. El mismo experimento se realiza con una segunda muestra que contiene 5 GFP μ M y 10 M de un fragmento de anticuerpo de unión a GFP, unirle específicamente a GFP. En ambos casos, en primer lugar se registra la fluorescencia sin calentamiento por láser. A continuación, la excitación de fluorescencia se apaga y la radiación láser IR se enciende (la temperatura máxima se mantiene por debajo de 35 °C (es decir, aproximadamente 15 °C por encima de la temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) para evitar la desnaturalización o daño a la proteína). El láser se apaga después de unos segundos de calentamiento y la excitación de fluorescencia se enciende al mismo tiempo. La relajación de la distribución de fluorescencia espacial (es decir, la distribución de concentración) con respecto a un estado homogéneo se registra durante unos segundos. Como puede observarse a partir de la figura 31, en la muestra con las dos especies que interactúan (es decir, GFP y el fragmento de anticuerpo), el perfil de fluorescencia necesita más tiempo para relajarse. Esto se explica por la difusión más lenta del complejo más grande. La evolución temporal del perfil de fluorescencia se analiza a través de una herramienta de software (Software propio, Labview™ National Instruments) para determinar la constante de difusión. Utilizando la relación Stokes-Einstein, se atribuye un radio hidrodinámico a la constante de difusión. En el caso de la GFP libre, éste es de 5 nm y el complejo tiene un radio de 10 nm.

Ejemplo 3: La detección de interacciones entre biomoléculas y la discriminación de los ácidos nucleicos por tamaño

La caracterización termo-óptico de la presente invención proporciona los medios para todos los análisis rápido biomolécula óptica. Los presentes procedimientos para la detección y cuantificación de interacciones biomoleculares tardan mucho tiempo, lo que significa que el tiempo necesario para un análisis es del orden de 30 minutos hasta horas. La presente invención puede detectar y cuantificar las interacciones biomoleculares dentro de 1 segundo hasta 50 segundos. El término interacción comprende la interacción entre biomoléculas (por ejemplo, proteína, ADN, ARN, ácidos hialurónicos, etc.), pero también entre nanopartículas/microperlas modificadas y biomoléculas. Un experimento típico para detectar/cuantificar las interacciones puede ser descrito como sigue:

Etapas 1a, medición de fondo:

El tampón de muestra sin moléculas/partículas de muestra marcadas con fluorescencia se carga en la cámara de microfluidos y se mide la fluorescencia, mientras se enciende la fuente de luz de excitación.

Etapas 1b, Determinación del nivel de fluorescencia antes del calentamiento láser:

Una solución acuosa de una muestra marcada con fluorescencia (por ejemplo, biomoléculas, nanopartículas, microperlas, mientras que todas tienen una afinidad específica a otras biomoléculas) a una concentración dada se carga en una cámara de microfluidos (preferiblemente un capilar) que garantiza preferiblemente una altura definida de la cámara. La fluorescencia se excita y se registra con (cámara CCD) o sin (tubo fotomultiplicador, fotodiodo de avalancha) resolución espacial durante menos de 10 segundos en un dispositivo CCD o fotomultiplicador con tiempos de exposición de 25 milisegundos hasta 0,5 segundos. A continuación, la excitación de fluorescencia se desactiva.

Etapas 2, partiendo del calentamiento láser infrarrojo:

5 A continuación, el láser de calentamiento por infrarrojos se activa y la distribución de temperatura espacial se establece dentro de unos pocos milisegundos en la solución. El gradiente de temperatura se ha calibrado una vez y no es necesario repetir esta calibración cada vez que se realiza un experimento. En particular, una configuración en la que el calentamiento por infrarrojos y la formación de imágenes de fluorescencia se realizan a través del mismo elemento óptico desde un lado es ventajoso para la estabilidad de los focos óptico e infrarrojo.

Es de ventaja de que en el experimento de la disminución de la fluorescencia debido a photobleaching es menor que 5%.

10 La elevación de temperatura máxima está por debajo de la temperatura que se sabe que causa daño a las moléculas en la solución o altera su interacción (por ejemplo, temperaturas entre 1 y 5 °C por encima de la temperatura ambiente).

Dependiendo de las propiedades termóforas de las moléculas en la solución (es decir, si se mueven rápidamente en un gradiente térmico o lento), el láser infrarrojo calienta la solución durante 5 segundos hasta 100 segundos.

Etapas 3, registro del perfil de fluorescencia espacial (es decir, concentración):

15 Después de este periodo de tiempo, la excitación de fluorescencia se activa y las imágenes se registran con la misma velocidad de fotogramas y longitud que se describe en la etapa 1b. La etapa 3 es la última etapa de adquisición necesaria para la evaluación de propiedades termo-ópticas.

20 Para la detección y cuantificación de interacciones son necesarias más mediciones siguiendo el protocolo que se ha descrito anteriormente. La etapa 1a se repite con un tampón de muestra y en la etapa 1b la solución acuosa de una muestra marcada con fluorescencia se mezcla con una cantidad de la biomolécula con la que se debe detectar o cuantificar la interacción. Para la detección de una interacción que es necesario mezclar la muestra marcada con fluorescencia con una cantidad suficiente de pareja de unión de manera que una cantidad sustancial de la molécula marcada con fluorescencia está en el complejo con la pareja de unión. Si la fuerza de la interacción debe cuantificarse en términos de una disociación o asociación constante (K_a , K_d), que el procedimiento descrito anteriormente tiene que ser llevado a cabo con concentraciones variables de pareja de unión (por ejemplo 0,1x - 10x la concentración de la etiqueta fluorescente pareja de unión). Esto significa que debe realizarse una titulación de pareja de unión.

30 **Procesamiento de los datos en bruto:** Para una corrección de blanqueo lineal es necesario esperar a que la retrodifusión de todas las moléculas a partir del final de la etapa 3. Esto aumenta el consumo de tiempo del análisis drásticamente. Para mediciones precisas y rápidas es ventajoso determinar la fuerza de blanqueo de una imagen a otra y corregir cada imagen individual con su propio factor de blanqueo. Para una corrección de blanqueo precisa, es importante que el gradiente de temperatura a distancia del punto de calor sea bajo (por ejemplo, por debajo de 0,001 K/ μm). Las imágenes tomadas en la etapa 1b se utilizan para corregir todas las imágenes para la iluminación no homogénea. En caso de que la fluorescencia se registre sin resolución espacial (por ejemplo, fotodiodo de avalancha o fotomultiplicador), el fotoblanqueo se corrige mejor determinando una vez la característica de blanqueo de un cierto colorante sin calentamiento láser en un experimento de control.

40 **Evaluación de los datos:** Detección *cualitativa* de la interacción: A partir de la serie de imágenes se extrae la distribución de fluorescencia espacial del experimento de referencia (es decir, molécula/partícula marcada con fluorescencia sin pareja de unión) y el segundo experimento (es decir, si la pareja de unión está presente). La fluorescencia se representa en función de la distancia desde el punto de calor. Un promedio sólo es posible para píxeles con la misma temperatura y la misma distancia. La distribución espacial de la concentración se obtiene corrigiendo las intensidades de fluorescencia para la respectiva dependencia de la temperatura del colorante. Con el conocimiento de la dependencia de la temperatura del colorante fluorescente y la distribución de temperatura espacial, el efecto de una fluorescencia decreciente debido al aumento de la temperatura se puede corregir. Para la detección cualitativa de interacción, así como su cuantificación una corrección para dependencia de la temperatura no es necesario, y la distribución de fluorescencia espacial es suficiente. Esto nos permite usar cualquier tinte fluorescente en el mercado sin caracterización de su dependencia de la temperatura.

50 Los valores del perfil de fluorescencia se integran hasta la distancia en la que la temperatura está por debajo del 10 % de la temperatura máxima (por ejemplo 70 μm). Los valores integrados se comparan y un cambio da una indicación precisa si existe una afinidad entre las sustancias a las concentraciones utilizadas, ya que la interacción cambia las propiedades termo-ópticas (por ejemplo, movilidad termófora, tamaño superficial y grupos químicos en la superficie). En la mayoría de los casos, la interacción conduce a una mayor fluorescencia (concentración) a temperaturas más altas.

55 En el caso de que toda la sección transversal de un capilar se caliente (es decir, usando lentes cilíndricas para dar al haz láser IR una forma elipsoidal, que calienta una sección transversal de un capilar homogéneamente), la intensidad de muchos más píxeles del punto de calor centrado puede promediarse, ya que todos los píxeles a la misma distancia de la línea caliente tienen la misma temperatura. Esto es ventajoso para mediciones de alta

precisión. En caso de que la fluorescencia se registre sin resolución espacial, se mide el cambio de fluorescencia en el centro del punto/línea de calor, mientras que se ventajoso de nuevo calentar toda la sección transversal. En general, si se registra más de una única trama en la etapa 1b y 3 es posible una integración de tramas múltiples.

5 Para una *cuantificación* de afinidades, se realiza el mismo procedimiento para todos los experimentos a diversas concenciones de pareja de unión no fluorescente. El resultado de la integración para el experimento de referencia (es decir, sin pareja de unión) se resta de los valores integrados obtenidos para las diferentes concentraciones de parejas de unión. A partir de esta evaluación, se consigue la cantidad de complejos que interactúan en unidades arbitrarias. Dividiendo los valores por el valor fuera vinculante se satura la cantidad relativa de los complejos a una cierta concentración de aglutinante se obtiene. A partir de estos datos también la concentración de pareja libre
10 fluorescente unión no puede ser determinado y la fuerza de la interacción puede ser cuantificada en términos de asociación o constante de disociación (ver Fig. 25).

Ejemplo 3a: Interacción de proteínas

15 La Figura 25 muestra una cuantificación de la interacción entre biomoléculas. 100 nM de un anticuerpo marcado con fluorescencia en tampón 1 x PBS (anti-interleucina 4, Sigma-Aldrich) se valora con diversas cantidades de interleuquina 4 tampón 1 x PBS (0 a 300 nM IL4 Sigma-Aldrich). (izquierda). Aproximadamente 200 nl de la mezcla de la muestra se sumergen en un capilar de 40 nm de diámetro interior (World Precision Instruments). El capilar está situado en un dispositivo tal como se muestra en la figura 27. deriva de fluido se impide mediante el cierre de las válvulas en ambos lados de la capilaridad. La medición se realiza con el dispositivo mostrado en la figura 20. La distribución espacial en la fluorescencia en estado estacionario se mide utilizando el protocolo descrito previamente.
20 Se muestran de forma ejemplar tres resultados para 5 nM, 80 nM y 300 nM. Después de cada medición el capilar se lava con aproximadamente 5 l de tampón 1 x PBS. La unión de IL 4 al anticuerpo cambia la señal dramáticamente de disminución de la fluorescencia a un aumento de fluorescencia. La integración del perfil de fluorescencia hasta 80 μm (distancia desde el centro caliente, véase el procedimiento que se ha descrito en este ejemplo en el presente documento anteriormente) permite determinar el número de complejos en solución. (derecha) La concentración de interleuquina 4 libre se puede calcular gráficamente frente al complejo formado por la concentración. Estos datos se
25 pueden ajustar para determinar el K_D .

Ejemplo 3b: Discriminación de ADN por tamaño y la interacción de las cadenas de ADN

30 Detección cualitativa de la interacción, usando un protocolo modificado de acuerdo con este ejemplo 3, se muestra en la figura 5. Aquí, los perfiles de concentración de 20 base de has ADN par sido comparado con ADN par 50 de base en un aumento de temperatura máxima de 10 °C (a temperatura ambiente de 20 °C). En un segundo experimento de 20 bases de ADN de cadena única se compara con 20 pares de bases de ADN de doble cadena. Todos los cuatro experimentos se realizaron en tampón 1 x SSC de la siguiente manera: Se añadieron mediante una pipeta 2 μl de muestra en un portaobjetos (Roth, 1 mm de espesor) y se intercalaron entre un cubreobjetos de 12 mm de diámetro. La solución acuosa se propaga de manera uniforme entre las dos superficies de vidrio produciendo
35 una lámina delgada de agua con una altura de aproximadamente 20 micrómetros. La lámina líquida se sella mediante el uso de esmalte de uñas. Esto evita la rápida evaporación de la muestra. La cámara de microfluidos se coloca en el escenario objeto de la configuración termo-óptica (por ejemplo, Figura 1a) y se forman imágenes a través de un objetivo de aceite 40x (NA 1.3, Zeiss). El foco láser se coloca de manera que esté aproximadamente en el centro del campo de visión y tenga una anchura media de aproximadamente 20 micrómetros. Sólo se usó un único píxel de una cámara CCD para la detección de la fluorescencia. Este píxel mide la fluorescencia en el centro del punto de calor. La fluorescencia se registra durante aprox. 1 segundo sin calentamiento por láser, el láser IR se enciende, mientras que la fluorescencia aún se registra Después de 20 segundos de calentamiento por láser, se detiene la medición. Como puede verse en la figura 5, el ADN monocatenario puede discriminarse del ADN
40 bicatenario y el DNA de diferente longitud se puede discriminar dentro de un lapso de tiempo de unos pocos segundos. La corrección de blanqueamiento no se realiza en esta medición, y se observa un cambio fuerte en la concentración.

Ejemplo 4: Detección de la unión de moléculas de PEG a nanopartículas

50 Como se ha mencionó previamente, también es posible detectar la unión de moléculas a partículas inorgánicas o nanocristales más grandes utilizando el procedimiento que se ha descrito anteriormente. Las partículas CdSe inorgánicas (diámetro del núcleo de aproximadamente 12 nm) se han modificado con un número variable (1 hasta 3) de poli-etilenglicol (PEG) de peso molecular diferente. Se añadieron mediante una pipeta 2 μl de muestra en un portaobjetos (Roth, 1 mm de espesor) y se intercalaron entre un cubreobjetos de 12 mm de diámetro. La solución acuosa se propaga de manera uniforme entre las dos superficies de vidrio produciendo una lámina delgada de agua con una altura de aproximadamente 20 micrómetros. La lámina líquida se sella mediante el uso de esmalte de uñas.
55 Esto evita la rápida evaporación de la muestra. La cámara de microfluidos se coloca en el escenario objeto de la configuración termo-óptica (por ejemplo, Figura 1a) y se forman imágenes a través de un objetivo de aceite 40x (NA 1,3, Zeiss). El foco láser se coloca de manera que esté aproximadamente en el centro del campo de visión y tenga una anchura media de aproximadamente 100 micrómetros. El aumento máximo de temperatura se determinó a 5 °C por encima de la temperatura ambiente. El perfil de fluorescencia espacial se registra como se ha descrito previamente para la detección de interacciones biomoleculares. Además, los datos sin procesar se procesan como
60

se ha descrito previamente. Para medir el número o tamaño de las moléculas de PEG unidas a los nanocristales, es suficiente con comparar los perfiles de fluorescencia espacial obtenidos con el protocolo que se ha descrito anteriormente. Sin embargo, una corrección para la disminución dependiente de la temperatura de la fluorescencia permite una cuantificación en cuando al coeficiente de Soret. La Fig. 26 muestra que el coeficiente de Soret aumenta linealmente con el número de moléculas de PEG unidas covalentemente a los nanocristales. La pendiente del aumento depende del peso molecular del PEG. La Fig. 26 muestra que la unión de las moléculas individuales del tamaño de una proteína es detectable.

Ejemplo 5: Termoforesis de proteínas

Un ejemplo de cómo la conformación, la estructura y la superficie de un efecto de molécula de la característica óptica termoplástico de dichas moléculas y cómo se pueden medir estas características, detectan o caracterizan se da en lo siguiente:

Una muestra de BSA marcada con fluorescencia (albúmina de suero bovino, Fermentas) se transfiere en una cámara de microfluidos (por ejemplo, capilar). La temperatura de todo el volumen de la muestra se ajusta por un elemento de Peltier en contacto térmico a la solución (la cámara de microfluidos se coloca en un dispositivo que se muestra en la figura 27). El elemento Peltier se utiliza para regular la "temperatura ambiente" de la solución. No crea una distribución de temperatura espacial. El ajuste de la temperatura es importante porque las propiedades termofísicas óptica (propiedades por ejemplo, de superficie, de conformación) a temperaturas ambiente variables (es decir, conformaciones de proteína) se deben medir. Las propiedades termo-ópticas se miden siguiendo el protocolo descrito anteriormente para las interacciones de biomoléculas (paso 1 al paso 3, sin adición de parejas de unión, ya que sólo las propiedades intramoleculares son medidos). También el procesamiento de los datos en bruto sigue el procedimiento descrito para la detección de interacciones moleculares. Las propiedades termo-ópticas se evaluó determinando el perfil de concentración en estado estacionario. Las propiedades termo-ópticas se representan como coeficiente de Soret ST como se muestra en la Figura 28. El Coeficiente de Soret se obtiene correlacionando el perfil de concentración de una manera exponencial ($c = c_0 e^{-S_T (T-T_0)}$) para la distribución de temperatura. El Soret coeficiente es sensible a los cambios en la interacción entre los aminoácidos de la proteína y las moléculas de agua. A bajas temperaturas las moléculas se acumulan en una región de temperatura elevada, lo que corresponde a un coeficiente de Soret negativo. Al aumento de la temperatura de la acumulación de las moléculas de cambios (es decir, aumenta el coeficiente de Soret). Esto puede explicarse fácilmente por los cambios en la conformación de la molécula (por ejemplo, grupos hidrófobos o bucles reordenan). Como se puede ver en la Fig. 28 el signo de termoforesis cambios con respecto a los valores negativos a temperaturas más bajas a valores positivos (es decir, agotamiento) a temperaturas más altas. El salto repentino a los coeficientes de Soret positivos se correlaciona muy bien con la temperatura se produce eran desnaturalización térmica (es decir, 50 °C). En el rango de la temperatura corporal (ie30 °C - 40 °C) la señal de termo-óptico no cambia significativamente. Una explicación para este comportamiento inesperado es que la proteína está diseñado evolutiva para ser funcional dentro de este rango de temperatura. Dado que existe una relación estructura-función de apretado en la naturaleza, la estructura se conserva en este intervalo de temperatura. Los valores mostrados en la Figura 28 se corrigen para la dependencia de la temperatura del colorante de fluorescencia.

El aumento de la temperatura local en el sistema provoca un cambio en la fluorescencia que no es puramente causada por cambios en la concentración debido a la termoforesis. Puesto que la temperatura de transición de valores negativos a positivos es importante para las mediciones de la estabilidad de proteínas absoluta, una corrección para la dependencia de la temperatura de la fluorescencia es ventajoso. En la solicitud se diferencias en la estabilidad deben ser detectadas (por ejemplo, pequeña molécula de unión a una proteína) la corrección de la dependencia de temperatura de la fluorescencia no es necesario. El argumento de que la estructura de proteínas/conformación se mide con el soporte de la Figura 28b donde se inicia el experimento a altas temperaturas. Incluso a temperaturas inferiores a la temperatura de desnaturalización térmica del coeficiente de Soret es positivo. Esto se basa en el tiempo de replegamiento lento en comparación con la velocidad de medición, que es más rápido de 50 segundos. Después de un cierto lapso de tiempo los valores de ST termo-óptico mostrado en la Fig. 28a también se obtienen de nuevo en la medición se muestra en la Fig. 28b. Como control de la temperatura del sistema se aumenta de nuevo, y los valores negativos ST se obtienen como se esperaba a temperaturas de aproximadamente 40 °C.

Ejemplo 6: La detección de los cambios conformacionales, como la desnaturalización de las proteínas

a) un ejemplo donde la forma desnaturalizada de una proteína se distingue de la forma nativa sin ninguna corrección para la dependencia de la temperatura del colorante de fluorescencia, dada en la Figura 15. Una parte alícuota de una etiqueta fluorescente albúmina de suero bovino se calienta hasta 90 °C durante 10 minutos, que es muy superior a la temperatura de desnaturalización y la proteína no se puede replegar. También las características termo-óptico de una alícuota nativa (es decir, No se calienta a 90 °C) se mide. A partir de la muestra nativa, aproximadamente 200 nl de la muestra se sumergen en un capilar de 40 nm de diámetro interior (World Precision Instruments). El capilar está situado en un dispositivo tal como se muestra en la figura 27. deriva de fluido se impide mediante el cierre de las válvulas en ambos lados de la capilaridad. La medición se realiza con el dispositivo mostrado en la figura 20. La distribución espacial en la fluorescencia en estado estacionario se mide utilizando el protocolo descrito previamente. Después de cada muestra del capilar se lava con aproximadamente 5 l de tampón 1 x PBS. El

experimento se realizó como se describe para la medición de las interacciones biomoleculares (Paso 1 - paso 4). El experimento se lleva a cabo dos veces con diferentes potencias de láser infrarrojo (es decir, se emplean temperaturas máximas de 5 °C y 10 °C por encima de la temperatura ambiente). Después, la muestra con la proteína desnaturalizada se mide. De nuevo, se usan tres experimentos con diferentes potencias de láser. En la figura 29, la fluorescencia se representa en función de la distancia a la fuente de calor (es decir, foco láser) se muestra para la forma nativa y desnaturalizada en dos potencias de láser diferentes (es decir, temperaturas máximas de 5 °C y 10 °C). En ambos casos hay dos contribuciones al cambio de fluorescencia. En primer lugar hay un aumento o disminución de la concentración (para la forma nativa o desnaturalizada, respectivamente) y en segundo lugar hay una disminución de la fluorescencia debido a la dependencia de la temperatura del colorante de fluorescencia. Para una comparación cualitativa (es decir, para distinguir entre una forma nativa y desnaturalizada.) una corrección para la dependencia de la temperatura del colorante no es necesario. En todos los casos mostrados en la Fig. 29 la fluorescencia disminuye. Pero como era de esperar la disminución de la fluorescencia de la proteína nativa no es tan fuerte disminución observada de la forma desnaturalizada. Esto se explica fácilmente por el coeficiente de Soret negativa de la proteína nativa a 20 °C de temperatura ambiente (véase también la figura 28), lo que conduce a una acumulación de moléculas a temperaturas más altas. Esto contrarresta la disminución de la fluorescencia causada por la dependencia de la temperatura de la fluorescencia. En potencias de láser más altos (es decir, un aumento de temperatura máxima de 10 °C) la diferencia entre la forma nativa y desnaturalizada es aún más fuerte, ya que la acumulación termóforo y el agotamiento termóforo, de forma respectiva, se hacen más fuertes. También cambios conformacionales más pequeñas se pueden detectar sobre la base de diferente fuerza de termoforesis. Una dirección diferente del movimiento termóforo es ventajoso pero no necesario.

b) Una muestra de albúmina de suero bovino marcada con fluorescencia (BSA) se ha dividido en dos partes. Una sólo se expone a temperaturas ambientales, mientras que la otra mitad se calienta hasta 100 °C durante varios minutos (es decir, irreversiblemente desnaturalizada). Las propiedades termo-ópticas de ambas muestras (nativa y desnaturalizada) se miden a una potencia de 800 mA del láser infrarrojo (es decir, un aumento máximo de temperatura de 20 °C). Como puede observarse en la figura 30, la fluorescencia de la proteína desnaturalizada es menor que la fluorescencia de la proteína nativa. Esto se explica cómo se indica a continuación. El colorante de fluorescencia de ambas muestras muestra la misma disminución en la fluorescencia debido al aumento de la temperatura (es decir, la sensibilidad a la temperatura de la fluorescencia). Sin embargo, la proteína desnaturalizada muestra una movilidad termófora positiva (es decir, se mueve al frío), mientras que la proteína nativa tiene una movilidad termófora negativa (es decir, se mueve al calor). La acumulación a temperaturas elevadas es la razón por la que la disminución de la fluorescencia es menor para la proteína nativa, mientras que la proteína desnaturalizada, además de dependiente de la temperatura, está empobrecida de la región de temperatura elevada. Curiosamente, al aproximarse a la temperatura de desnaturalización (es decir, 50 °C) de la proteína, las amplitudes de la proteína nativa y desnaturalizada se aproximan entre sí y son esencialmente iguales. Esto significa que midiendo la amplitud del cambio de fluorescencia, una comparación con la muestra de referencia permite detectar la temperatura de fusión de una proteína y discriminar entre la forma nativa y desnaturalizada de una proteína. Y detectar un cambio en la temperatura de fusión debido a interacciones de la proteína con otras biomoléculas o moléculas pequeñas (por ejemplo, fármacos candidatos).

Ejemplo 7: Trampa optotérmica/Trampa termoóptica

A continuación, las partículas de sílice se emplean en forma de partículas/cuentas ilustrativos para ser termo ópticamente atrapados. Se entiende que el procedimiento descrito se puede emplear también para la captura de termo-óptico de otras moléculas, como las biomoléculas o vesículas de lípidos (como también se ilustra en un ejemplo adicional).

Las partículas de sílice (1 μm de diámetro, liso, Kisker Biotech) se diluyeron 1/100 en agua destilada. Se añadieron mediante una pipeta 2 μl en un portaobjetos (Roth, 1 mm de espesor) y se intercalaron entre un cubreobjetos de 12 mm de diámetro. En lo sucesivo, el término perla se usa como un sinónimo de partícula. La solución acuosa que contiene perlas se propaga de manera uniforme entre las dos superficies de vidrio produciendo una lámina delgada de agua con una altura de aproximadamente 20 micrómetros. La lámina líquida se sella mediante el uso de esmalte de uñas. Esto evita la rápida evaporación de la muestra. La cámara de microfluidos se coloca en el escenario objeto de la configuración termo-óptica (como se ilustra, por ejemplo, en la Figura 1a adjunta) y se forman imágenes a través de un objetivo de aceite 40x (NA 1,3, Zeiss). El foco láser se coloca de manera que esté aproximadamente en el centro del campo de visión y tenga una anchura media de aproximadamente 100 micrómetros. A continuación, el láser IR se enciende y se calienta la solución a 10 °C por encima de la temperatura ambiente (20 °C) al máximo de la distribución de temperatura espacial en el centro del foco láser IR. La serie de imágenes se muestra en la Figura 33 ilustra el proceso de partícula acumulación/atrapamiento. Al principio (primera imagen de la Fig. 33, parte superior de la página), sin calentamiento por láser, las perlas están distribuidas casi equitativamente. El círculo negro muestra la posición del foco láser. Las siguientes imágenes muestran el desarrollo de la distribución de partículas en los siguientes tres segundos después de encender el láser de calentamiento. Las partículas muestran un movimiento dirigido a la región de temperatura elevada en el foco del láser, que puede ser también denominado como negativo efecto Soret o termoforesis negativo. Sorprendentemente, las partículas de sílice muestran termoforesis negativa a temperatura ambiente. Las partículas son atrapadas en el centro de la distribución de la temperatura en el foco del láser. La partícula experimenta un pozo de potencial creado por la distribución espacial de temperatura. El movimiento dirigido a la región de temperatura más alta se explica por la tendencia de la partícula para minimizar su

energía de solvatación. La posición de la partícula no está exactamente en el centro de la mancha de calor, ya que las fluctuaciones térmicas empujan la partícula fuera de su posición. Anexa Figura 34 ilustra que las perlas están atrapadas dentro de la región de temperatura más alta, incluso cuando la etapa (es decir, de la muestra) se mueve con velocidades de milímetros/segundo en relación con el foco láser fijo. Mediante el uso de la trampa termo-óptica, de partículas se puede mover arbitrariamente y también puede ser concentrado. Después de confinar perlas modificado de anticuerpos para el punto de calor, una interacción entre las partículas debido a una unión de un único antígeno en la solución a más de un grano puede ser detectado.

Otro enfoque de una caracterización termo-óptica se muestra en la Figura 32. Las partículas de sílice (1 μm de diámetro, liso, Kisker Biotech) se diluyen en agua destilada 1/1000. El factor de dilución es empírica. La dilución es tal que sólo una única partícula se observó en una región de veces aproximadamente $400\mu\text{m}$ $400\mu\text{m}$. Se añadieron mediante una pipeta 2 μl en un portaobjetos (Roth, 1 mm de espesor) y se intercalaron entre un cubreobjetos de 12 mm de diámetro. La solución acuosa que contiene perlas se propaga de manera uniforme entre las dos superficies de vidrio produciendo una lámina delgada de agua con una altura de aproximadamente 20 micrómetros. La lámina líquida se sella mediante el uso de esmalte de uñas. Esto evita la rápida evaporación de la muestra. La cámara de microfluidos se coloca en el escenario objeto de la configuración termo-óptica (por ejemplo, la Figura 1a). El foco láser se coloca de manera que esté aproximadamente en el centro del campo de visión y tenga una anchura media de aproximadamente 100 micrómetros. A continuación, el láser IR se enciende y se calienta la solución a 10 °C por encima de la temperatura ambiente (20 °C) al máximo en el centro del foco láser IR. Debido a la alta dilución, una única partícula se atrapa en un pocillo potencial creado por una distribución de temperatura espacial (véase, la Fig. 32a). Como partículas de sílice muestran un termoforesis negativo el pozo es más profunda a altas temperaturas (es decir, las partículas de minimizar su energía de solvatación a altas temperaturas). La partícula de sílice sola fluctúa en el pozo de potencial ya que las fluctuaciones térmicas empujan la partícula fuera de su posición. Las fluctuaciones se registran a través de una cámara CCD (en $t = 1\text{S}, 2\text{S}, 3\text{S}, 4\text{S}, 5\text{S}, 6\text{S}, 7\text{S}$) y las posiciones son rastreados por Software (Software selfmade, LabVIEW™ de National Instruments, detectando el píxel con intensidad más alta) con resolución nanométrica (ver Fig. 32b). Un histograma se calcula a partir de la información de posición (ver Fig. 32c). La anchura de la distribución es muy sensible a las propiedades termo-ópticas de la partícula. Si las moléculas se unen a la superficie de la partícula, el potencial eficaz para la perla cambia y la amplitud de las fluctuaciones aumenta o disminuye. Observando el cambio de amplitud a lo largo del tiempo, se puede medir una curva de unión cinética. En un sistema microfluídico tal experimento se realiza como sigue: una solución que contiene una dilución 1/1000 (agua destilada) se enrojecida o empapada en un capilar (véase la figura 27). Las válvulas en el extremo del capilar están cerrados. Una sola partícula (modificado (por ejemplo, recubierto) con un anticuerpo específico para un determinado antígeno, por ejemplo, la interleucina 4) está atrapado y se detectan las fluctuaciones de la partícula durante 10 segundos a 100 segundos. Las perlas está rodeado por solución de tampón puro. En un siguiente paso, el tampón se intercambia con un tampón que contiene el antígeno respectivo. Mientras que se intercambia el tampón de la perla todavía está atrapado. Después del intercambio de tampón de la fluctuación de la misma del grano como antes se registran. El cambio en la amplitud de fluctuación se utiliza para detectar las interacciones entre anticuerpo y antígeno. Su evolución en el tiempo se utiliza para medir la cinética de unión.

Mediante el uso de un dispositivo como se ilustra en la figura adjunta 24, un gradiente de temperatura se puede generar en solución, por las líneas de exploración (por ejemplo, 10) perpendiculares entre sí en la solución. Donde se cruzan estas líneas, se observa una temperatura máxima. Los puntos de la línea de escaneo tienen una temperatura intermedia, mientras que los espacios entre las líneas representan los mínimos de temperatura (por ejemplo, si la temperatura ambiente en los espacios entre las líneas son suficientemente ancho). La partícula de sílice se ha descrito anteriormente se moverá hasta el equilibrio posiciones en los puntos de cruce de las líneas calientes. Moviendo la temperatura rejilla de todas las partículas se moverán simultáneamente. Además, la fluctuación de todas las perlas puede ser medido de forma simultánea.

Ejemplo 8: las curvas de fusión de ADN

Protocolo estándar para la medición de las curvas de fusión (utilizando el dispositivo mostrado en la Fig ejemplo 1a, 1b, 16 a 18, 20 a 24 o 37.):

1455nm Raman-láser; acoplado a galvanómetros de espejo a través de la fibra

Sin colimador después de fibra, con rayo láser golpea espejos de forma divergente; espejos reflejan el rayo láser sobre una lente; haz láser se enfoca a la cámara a través de la lente.

Láser de encendido/apagado se controla a través de mover el láser en un lugar fuera del campo de visión a través de los espejos.

Preparations:

- Los cubreobjetos (170 μm) de espesor, una con un diámetro de 12 mm los demás mm 24x24 cuadráticas enjuagados con agua desionizada, se aclaró con etanol, luego de nuevo se enjuagaron con agua desionizada.

- Dilución de soluciones:

ES 2 611 996 T3

+ 10µM Tamra en 1 x SSC

+ Horquilla de 100µM en MilliQ de agua diluida a 10µM, 1µM, 100 nM, o menos en SSC- Buffer (1x, 0,5x, 0,1x o menos).

+ Añadir el detergente TWEEN20 a un volumen final de 0,01% (sólo si no es la adsorción no específica).

5 Ajuste:

- Comprobar si todo está bien con el microscopio (aberturas, filtros)

- 10µM Tamra (tetrametilrodamina) en 1 x SSC (NaCl 150 mM, citrato de Na3-15 mM, pH 8,1), con 0,01% de Tween 20; volumen de 2µl en la cámara construida con 2 cubreobjetos (170µm de espesor), sellados con esmalte de uñas

- Esperar hasta que el esmalte de uñas se seque

10 - Añadir el aceite de inmersión en el cubreobjetos superior

- Ponga la cámara en el escenario de medición

- El enfoque se imagen de fluorescencia en casi cerrando la abertura

- Encontrarán in situ con láser

- Laser Focus

15 - Laser de desenfoque mediante el aumento de la distancia entre la lente y la cámara

- Ajustar foco láser de una manera que se establece una distribución amplia y adecuada de temperatura

- Mover punto láser con galvanómetros de espejo fuera del campo de visión de tal manera que la influencia del láser a la imagen de fluorescencia se forma mínima> Guardar la configuración en el programa de medición (evitar cruzar el punto cero de la escala de voltaje los espejos galvanométricos)

20 - Medir la temperatura ambiente

Medida

Utilice los pasos siguientes para la medición de temperatura, así como para la medición de las curvas de fusión:

Llevar a cabo la medición con el gatillo-programa.

25 ajustes: aceite de 40x de inmersión-objetivo, 8x8 Agrupación, el tiempo de exposición de 10 ms (-> 28 Hz tasa de lectura)

Para hacerlo de forma manual:

1. en laser

2. fuente de luz en (obturador abierto en caso de HXP), anote la configuración de la fuente de luz

3. Iniciar el programa activador

30 4. láser fuera

Fuente de luz de

La medición se basa en la detección de la fluorescencia y por lo tanto puede llevarse a cabo en un dispositivo de acuerdo con las figuras adjuntas 16-18 y/o 20-24. Como es preferible el tiempo exacto de las mediciones, los dispositivos utilizados como CCD, IR-láser y la fuente de luz se sincronizan por el uso de una señal de disparo electrónica. A medida que la cámara CCD utilizada (Andor Luca) tiene un puerto de salida del disparador, el elemento de control IR-láser y el elemento de control de fuente de luz están sincronizados con la señal de disparo de la CDD-cámara. En particular, el segundo nivel de la señal de salida del disparador CCD se toma como el punto de tiempo de la medición cero. En el siguiente el tiempo de exposición de la cámara CCD es de 10 ms y el intervalo de tiempo mínimo entre dos imágenes se determina por la velocidad de cuadros de la cámara CCD. Como cámara se intercala una solución 2µl de las moléculas de la muestra marcados con fluorescencia (por ejemplo, 10 tetrametilrodamina mu M (TAMRA) en NaCl 75 mM, 7,5 mM Na3-citrato, 0,01% de Tween 20, pH 8,1) entre dos 40 170µm cubreobjetos de vidrio de espesor con un diámetro de 12 mm y sellada con esmalte de uñas. Esto da como resultado un espesor de la cámara de alrededor de 20µm. A continuación, la cámara se mueve al dispositivo de medición y la óptica se centran a la cámara.

Breve descripción de la secuencia de la medición:

Antes de que comience la medición, la fluorescencia de fondo del dispositivo de medición se registra en el "Paso 0". Como este fondo es característica para el dispositivo utilizado y no puede cambiar durante un largo período de tiempo este paso se realiza preferiblemente sólo una vez para caracterizar el dispositivo utilizado.

- 5 Tiempo $t = 0$: Paso 1: Una imagen de primera fluorescencia de la distribución espacial de la fluorescencia en la cámara se registra.

El tiempo $t = 20$ ms Paso 2: IR-láser se enciende

Tiempo $t = 60$ ms Paso 3: una segunda imagen de fluorescencia de la distribución espacial de la fluorescencia en la cámara se registra.

- 10 Después de estos pasos de finalizar la medición y el procesamiento de datos en bruto y la evaluación de los datos se lleva a cabo.

Descripción detallada de la secuencia de la medición:

Etapas 0, medición de fondo:

- 15 Un tampón de muestra sin muestras moléculas/partículas de la etiqueta fluorescente se introduce en una cámara de microfluidos y la distribución de fluorescencia espacial en la cámara se mide con el CCD de la cámara, mientras que la fuente de luz de excitación está activado.

Paso 1, Determinación del nivel de fluorescencia a la temperatura ambiente antes de calentamiento por láser:

- 20 Una solución acuosa de un colorante sensible a la temperatura (por ejemplo TAMRA) a una concentración dada (por ejemplo, 10 mM) se llena en la cámara que proporciona preferiblemente una altura definida de la cámara. La fluorescencia se excita con la fuente de luz (LED) y grabado con resolución espacial con la cámara CCD a temperatura ambiente.

- 25 En primer lugar el CCD de la cámara se pone en marcha y la primera de alto nivel de la señal de salida del disparador de la cámara se utiliza para sincronizar el elemento de control IR-láser y el elemento de control del LED con la cámara CCD. Para la sincronización de una tarjeta de medición de National Instruments por ejemplo se puede utilizar.

- 30 Para una buena iluminación del LED se enciende con el uso del disparador de la cámara de la señal de un corto tiempo antes de que registra la cámara CCD una primera imagen de fluorescencia $I_0(x, y)$. Por lo tanto, durante el tiempo de exposición de la cámara CCD de 10 ms de la fuente de luz de excitación de fluorescencia ha alcanzado su nivel de estado estacionario de la salida de luz. Cuando la cámara comienza su grabación de la señal de disparo de salida de la cámara es la segunda vez en el estado de nivel alto. Este segundo estado de alto nivel de la señal de salida determina el punto de tiempo $t = 0$ cero.

Etapas 2, partiendo del calentamiento láser infrarrojo:

- 35 El láser de calentamiento por infrarrojos se activa en un tiempo $t = 20$ ms y la distribución de temperatura espacial se establece dentro de unos pocos milisegundos en la solución. La distribución de la temperatura ha sido calibrado una vez de una manera que por ejemplo todas las temperaturas entre 30 °C y 90 °C están presentes en la imagen grabada y no es necesario repetir esta calibración cada vez que se realiza un experimento.

Paso 3, la grabación del perfil de fluorescencia espacial con calefacción láser infrarrojo:

- 40 En $t = 60$ ms, 40 ms después del inicio irradiation IR-láser, una segunda imagen de la fluorescencia $I_1(x, y)$ se graba con la cámara CCD con un tiempo de exposición de 10 ms.

Después de que la cámara CCD ha tomado la segunda imagen, la primera y la segunda imagen se guardan en el disco duro de un PC para el procesamiento de los datos en bruto y para la evaluación de datos. A continuación, se termina el proceso de medición.

El procesamiento de los datos en bruto y evaluación de los datos:

- 45 Debido al corto tiempo de medición puede ser necesaria ninguna corrección para el blanqueo. Las imágenes I_0 y I_1 se corrigen contra el fondo de la cámara. A continuación, el cálculo de la relación $K(x, y) = I_1(x, y)/I_0(x, y)$ para cada píxel de las imágenes de fluorescencia (segunda imagen dividida por la primera imagen, tanto la corrección de fondo) asegura la eliminación de artefactos de iluminación no homogénea. una A medida que la dependencia de la temperatura $F(T)$ (Fig. 15) del colorante TAMRA es conocido a partir de un experimento de calibración en un fluorímetro, la distribución de temperatura espacial $T(x, y)$ (Fig. 3c) se puede derivar de la relación $K(x, y)$.
- 50

A medida que el momento de la medición es el mismo para la medición de la temperatura y para la medición de la curva de fusión, ambas mediciones se pueden realizar a la vez en una cámara si el espectro de emisión del colorante para la medición de la temperatura (por ejemplo TAMRA) puede ser también separada del espectro de emisión del marcador fluorescente de por ejemplo, la baliza molecular (por ejemplo, HEX como fluoróforo (véase la adjunta Fig. 6) y Dabcilo como un desactivador).

Ejemplo 9: Detección de modificaciones covalentes y no covalentes modificaciones de las nanopartículas

Se muestra un ejemplo para la detección de enlaces covalentes y no covalentes en la figura 35. Las nanopartículas (es decir, nanocristales o puntos cuánticos) se han obtenido en Invitrogen. Las partículas que se adquirieron tenían un revestimiento polimérico que será estable en solución acuosa (diámetro de 12 nm). Además, se adquirieron nanopartículas con estreptavidina acoplada covalentemente (diámetro de 21 nm), así como un ADN monocatenario de 40 bases biotinilado. Se han preparado las siguientes muestras: En primer lugar, nanopartículas no modificadas diluidas a una concentración de 1 mM en tampón 1 x SSC (solución salina-citrato sódico). En segundo lugar, nanopartículas recubiertas con estreptavidina diluidas en tampón 1 x SSC a una concentración de 1 μ M. En tercer lugar, las nanopartículas recubiertas con estreptavidina diluidas en 1 x tampón SSC a una concentración de 2 μ M se mezclaron con 2 μ M de ADN monocatenario biotinilado de 40 bases (IBA GmbH, Göttingen) en tampón 1 x SSC en una relación 1/1. Los tres experimentos se prepararon en tampón 1 x SSC de acuerdo con el siguiente protocolo: Se añadieron mediante una pipeta 2 μ l de muestra en un portaobjetos (Roth, 1 mm de espesor) y se intercalaron entre un cubreobjetos de 12 mm de diámetro. La solución acuosa se propaga de manera uniforme entre las dos superficies de vidrio que conducen a una lámina fina de agua con una altura de aproximadamente 20 micrómetros. La hoja de líquido se selló con esmalte de uñas para evitar la rápida evaporación de la muestra. La cámara de microfluidos se coloca en el escenario objeto de la configuración termo-óptica (por ejemplo, Figura 1a) y se forman imágenes a través de un objetivo de aceite 40x (NA 1.3, Zeiss). El foco láser se coloca de manera que esté aproximadamente en el centro del campo de visión y tenga una anchura media de aproximadamente 20 micrómetros. Los experimentos se realizaron como se describe aquí anteriormente para la detección de interacciones, con un aumento máximo de temperatura de 5 °C por encima de la temperatura ambiente. Una corrección de la fluorescencia dependiente de la temperatura se ha realizado para la medición precisa de la Soret Coeficiente de la distribución de la concentración espacial, (es decir, la dependencia de la temperatura de la fluorescencia de la nanocrystal se ha determinado en un experimento fluorímetro independiente). Como puede verse en la figura 35, el coeficiente de Soret es positivo y mayor para la nanopartícula recubiertas con estreptavidina que para la nanopartícula sin proteína. Además, la unión de una sola molécula de ADN de cadena simple a la partícula se detecta como un cambio en el coeficiente de Soret. Esto es interesante, ya que la molécula de ADN flexibles corto no contribuye sustancialmente al tamaño de la nanopartícula (como la estreptavidina hace). Desde termoforesis es sensible a cambios de las propiedades de la superficie tras la unión de la molécula de ADN, la unión de la comparativamente pequeña molécula de ADN a la partícula se puede detectar.

Ejemplo 10: Termoforesis y atrapamiento termóforo de vesículas lipídicas

Texas Red DHPE (1,2-dihexadecanoyl-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, sal de trietilamonio), un fosfolípido marcado con fluorescencia, se utiliza para la coloración de las vesículas. El lípido se añade al proceso de formación de vesículas con aproximadamente 1 por ciento en moles con respecto a los principales fosfolípidos constituyentes. Las siguientes soluciones madre se utilizaron para la preparación de las vesículas por hinchazón electro:

Lípidos solución madre:

- 2,5 mg/ml DPhPC (1,2 Diphytanoyl-sn-glicero-3-fosfocolina) en Cloroformo (CHCl₃)
- 1-2% estearilamina
- 1% de lípidos fluorescente (1,2-dihexadecanoyl-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, sal de trietilamonio (Mol. Sonda:

Sacarosa solución madre:

- La sacarosa 300 mM en agua destilada

Solución amortiguadora:

- 150 mM KC1, MES 20 mM, pH 5

La solución de vesículas final se diluyó 1/100 en agua destilada. 5 l de la dilución se pipeta en una diapositiva objeto. La gota se intercala entre la corredera objeto y un cubreobjetos ronda de 12 mm de diámetro y se coloca en el aparato de medición. La fluorescencia se observa a través de un objetivo de aceite con la instalación desde 1a, y, alternativamente, la configuración de la fig. 19. En este último caso, calefacción IR-láser se realiza a través de un mismo objetivo. El aumento de temperatura máxima era de aproximadamente 15 °C. El perfil de temperatura tenía una media anchura de 20 micrómetros. Se tomaron imágenes antes y después de calentar láser infrarrojo. Dos

imágenes representativas antes y 10 segundos después del calentamiento láser infrarrojo se muestran en la figura 39. Las vesículas son atraídas por un punto de calor debido a termoforesis negativa. Se acumulan en el centro del punto de calor. La zona de captación depende de la anchura del perfil de temperatura (es decir, es necesario un fuerte gradiente de temperatura suficiente es necesario para impulsar el movimiento de partículas dirigido hacia el centro caliente dentro de un tiempo finito). La captura de vesículas tiene varias aplicaciones importantes, por ejemplo, las vesículas (así como las células) se puede transportar y moverse dentro de una solución. Además, puede observarse la fluctuación de las vesículas individuales en el pocillo potencial (es decir, creado por un aumento de la temperatura). Dado que la amplitud de las fluctuaciones depende de las propiedades de la vesícula, cualquier cambio, como la unión de proteínas a vesículas o la actividad de una proteína de membrana, por ejemplo, una proteína de membrana que bombea iones, se puede detectar como un cambio en la amplitud de fluctuación. El signo del movimiento termóforo (por ejemplo, atraído al centro de calor o repelido por el centro caliente) depende de las propiedades (por ejemplo, la carga, tamaño, modificación de la superficie, unión de proteínas). Cuando una vesícula que normalmente es atraída por la región de temperatura más alta se repele del centro caliente, esto es indicativo de un cambio en las propiedades de esta vesícula. Este comportamiento se puede observar después de cambiar el tampón alrededor de la vesícula a una solución que contiene, por ejemplo, una pareja de unión. Además, puede compararse u observado el comportamiento de dos muestras que contienen vesículas en tampón y vesículas en tampón con una pareja de unión (o una sustancia de activación de proteína de membrana, por ejemplo, ATP). Por último, las diferencias en las propiedades termóforas se pueden utilizar para clasificar las vesículas o células.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la medición de las interacciones inter y/o intramoleculares de partículas en una solución con las etapas de:
 - proporcionar una sonda de muestra con partículas marcadas en una solución;
 - 5 - excitar con fluorescencia dichas partículas marcadas y detectar, en primer lugar, la fluorescencia de dichas partículas excitadas;
 - irradiar un haz de luz láser en la solución para obtener una distribución de temperatura espacial en la solución alrededor del haz de luz láser irradiado;
 - 10 - detectar, en segundo lugar, una fluorescencia de las partículas en la solución en un tiempo predeterminado después del inicio de la irradiación del láser en la solución, y
 - caracterizar las interacciones inter y/o intramoleculares de las partículas en base a dichas dos detecciones,
- en el que la irradiación del láser (30) y la detección de la fluorescencia se realiza desde el mismo lado con respecto a la sonda de muestra.
- 15 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la detección de fluorescencia y el enfoque del láser infrarrojo se realiza a través de la misma unidad óptica (1), en particular, a través del mismo objetivo.
 3. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el tiempo predeterminado está dentro del intervalo de 1 ms a 250 ms.
 4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el tiempo de detección está dentro del intervalo de 1 ms a 50 ms.
 - 20 5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el haz láser se desenfoca de tal forma que un gradiente de temperatura dentro de la distribución de la temperatura está en el intervalo de 0,0 a 2K/μm, preferiblemente de 0,0 a 5 K/μm.
 6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el haz láser se irradia a través de un elemento óptico (1) en la solución.
 - 25 7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el elemento óptico (1) es una única lente.
 8. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además la etapa de medir la distribución de temperatura en dicha solución en torno al haz irradiado con un colorante sensible a la temperatura.
 - 30 9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la distribución de temperatura se determina en base a la fluorescencia detectada del colorante sensible a la temperatura, en el que la solución que comprende dicho colorante sensible a la temperatura se calienta por el haz láser irradiado y la intensidad de la fluorescencia espacial de fluorescencia se mide sustancialmente perpendicular en torno al haz láser.
 10. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 5 a 8, en el que el tiempo predeterminado está dentro del intervalo de 0,5 s a 250 s.
 - 35 11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que en dicho tiempo predeterminado la concentración cambia dentro de la distribución de temperatura espacial en la solución debido a los efectos termóforos y tal cambio de concentración se detecta por un cambio de la distribución de la fluorescencia.
 12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9 a 11, en el que el haz láser se enfoca de tal forma que un gradiente de temperatura dentro de la distribución de la temperatura se consigue en el intervalo de 0,001 a 10 K/μm.
 - 40 13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9 a 12, en el que dicha fluorescencia se detecta con una cámara CCD (31).
 14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9 a 13, en el que el brillo de dicha fluorescencia se detecta con un fotodiodo o un único píxel con una CCD (31) en el centro del haz láser.
 - 45 15. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las partículas son biomoléculas y/o nanopartículas y/o microperlas y/o, combinaciones de los mismas.
 16. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la luz láser se encuentra dentro del intervalo de 1200 nm a 2000 nm.

17. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el láser (30) es un láser de alta potencia dentro del intervalo de 0,1 W a 10 W, preferiblemente de 4 W a 6 W.
18. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la solución es una solución acuosa con una concentración de partículas dentro del intervalo de 1 atto Molar a 1 M, preferiblemente de 1 atto Molar a 100 μ Molar.
19. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la solución es una solución salina con concentraciones en el intervalo de 0 a 1 M.
20. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la distribución de la temperatura espacial está entre 0,1 °C y 100 °C.
21. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 20, en el que dicho gradiente de temperatura se crea dentro de 0,1 μ m a 500 μ m de diámetro en torno al haz láser.
22. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la solución se proporciona con un espesor en la dirección del haz de luz láser de 1 μ m a 500 μ m.
23. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la detección de la fluorescencia se detecta dentro de un intervalo de 1 nm a 500 μ m en la dirección del haz láser.
24. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la fluorescencia se detecta sustancialmente perpendicular con respecto al haz de luz láser con una cámara CCD (31).
25. El procedimiento según la reivindicación 24, en el que la segunda detección de fluorescencia es la medición espacial de la fluorescencia en función de la distribución de la temperatura sustancialmente perpendicular con respecto al haz de luz láser.
26. Un dispositivo adaptado para medir las interacciones inter y/o intramoleculares de partículas en una solución de acuerdo con un procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, en el que el dispositivo comprende:
- un medio de recepción (51) para recibir partículas marcadas dentro de una solución;
 - medios (32) para excitar con fluorescencia las partículas marcadas;
 - medios (31) para detectar la fluorescencia excitada en dicha solución; y
 - un láser (30) para irradiar un haz de luz láser en la solución para obtener una distribución de temperatura espacial en la solución alrededor del haz de luz láser irradiado en el que el láser (30) y los medios para detectar la fluorescencia excitada se disponen en el mismo lado con respecto a los medios de recepción (51).
27. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 26, en el que el láser (30) y los medios (31) para detectar la fluorescencia excitada se disponen de tal forma que las imágenes de fluorescencia y el enfoque láser infrarrojo se realizan a través de la misma unidad óptica (1), particularmente a través del mismo objetivo.
28. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 26 o 27, en el que los medios (32) para excitar con fluorescencia las partículas marcadas es un LED.
29. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 26 a 28, en el que el láser (30) es un láser de alta potencia dentro del intervalo de 0,1 W a 10 W, preferiblemente de 4 W a 6 W.
30. El dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 26 a 29, en el que el dispositivo comprende además una óptica para aumentar la región detectada.
31. El dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 26 a 30, en el que el dispositivo comprende además una óptica (10) para enfocar o desenfocar el haz láser.
32. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 31, en el que la óptica (10) es una única lente.
33. El dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 26 a 32, en el que el medio de detección (31) es una cámara CCD.
34. El dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 26 a 32, en el que el medio de detección (31) es un fotodiodo.
35. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, o el dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 26 a 34, en el que dichas partículas a medir se seleccionan del grupo que consiste en biomoléculas, nanopartículas, micropérlas, sustancias orgánicas, sustancias inorgánicas y/o combinaciones de estas.

36. Uso del procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25 y 35 y el dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 34 para la detección y/o medición de interacciones de las partículas en solución.

5 37. El uso de la reivindicación 36, en el que dichas partículas se seleccionan del grupo que consiste en biomoléculas, nanopartículas, microperlas, sustancias orgánicas, sustancias inorgánicas y/o combinaciones de estas.

38. El procedimiento de la reivindicación 35 o el uso de la reivindicación 37, en el que dichas biomoléculas se seleccionan del grupo que consiste en proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, moléculas de fusión de proteínas-ácidos nucleicos, PNA y ADN bloqueados.

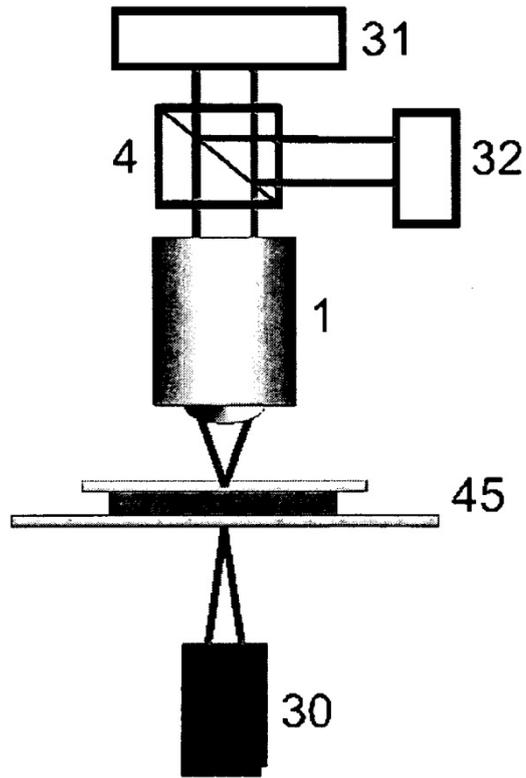


Fig. 1a

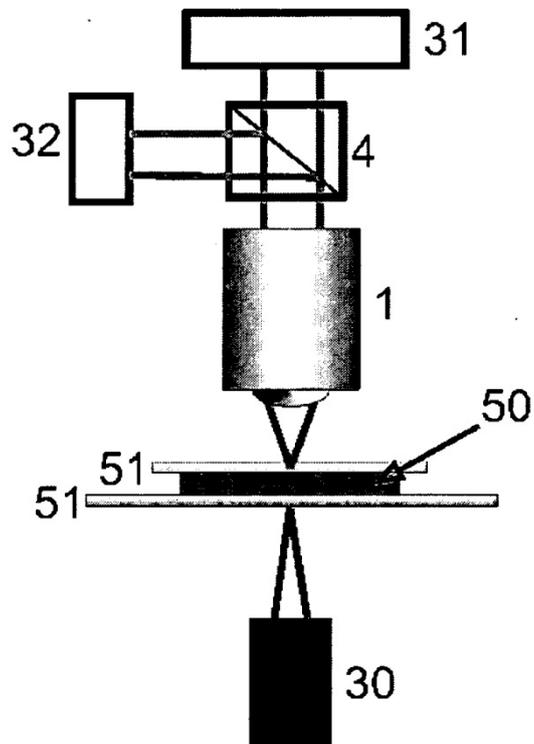


Fig. 1b

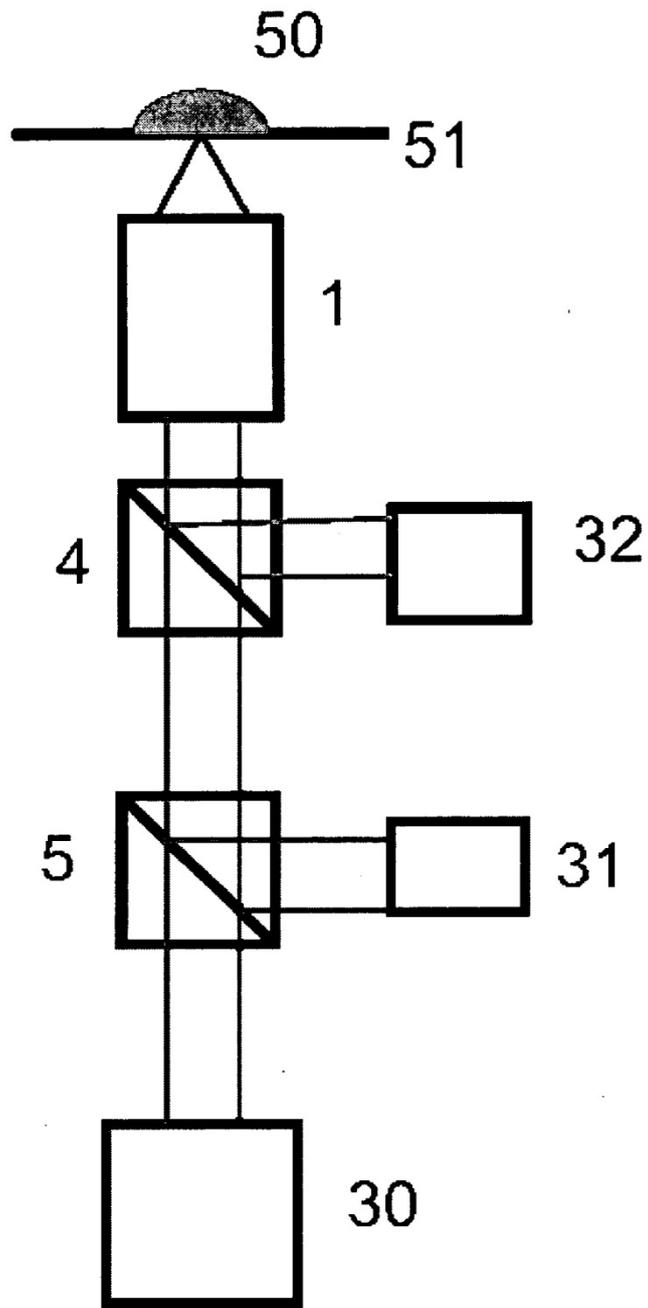


Fig. 2

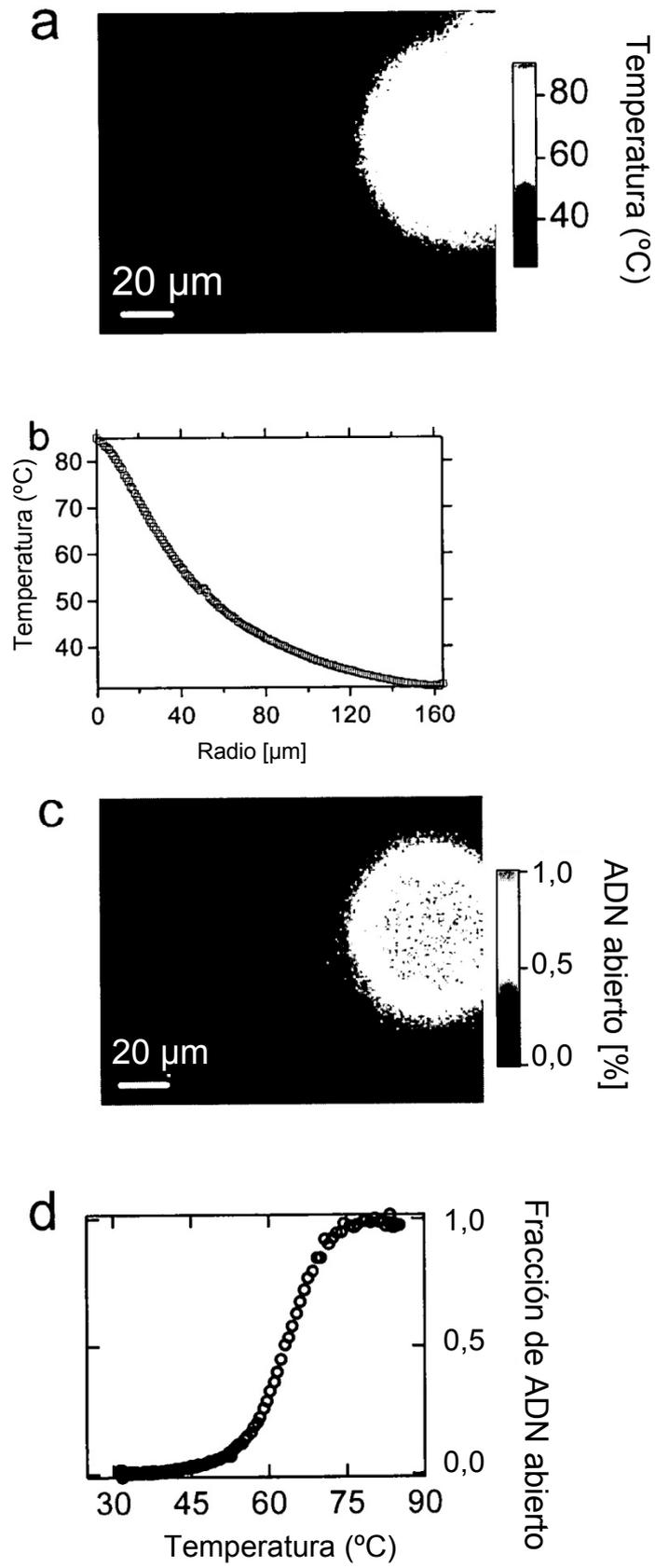


Fig. 3

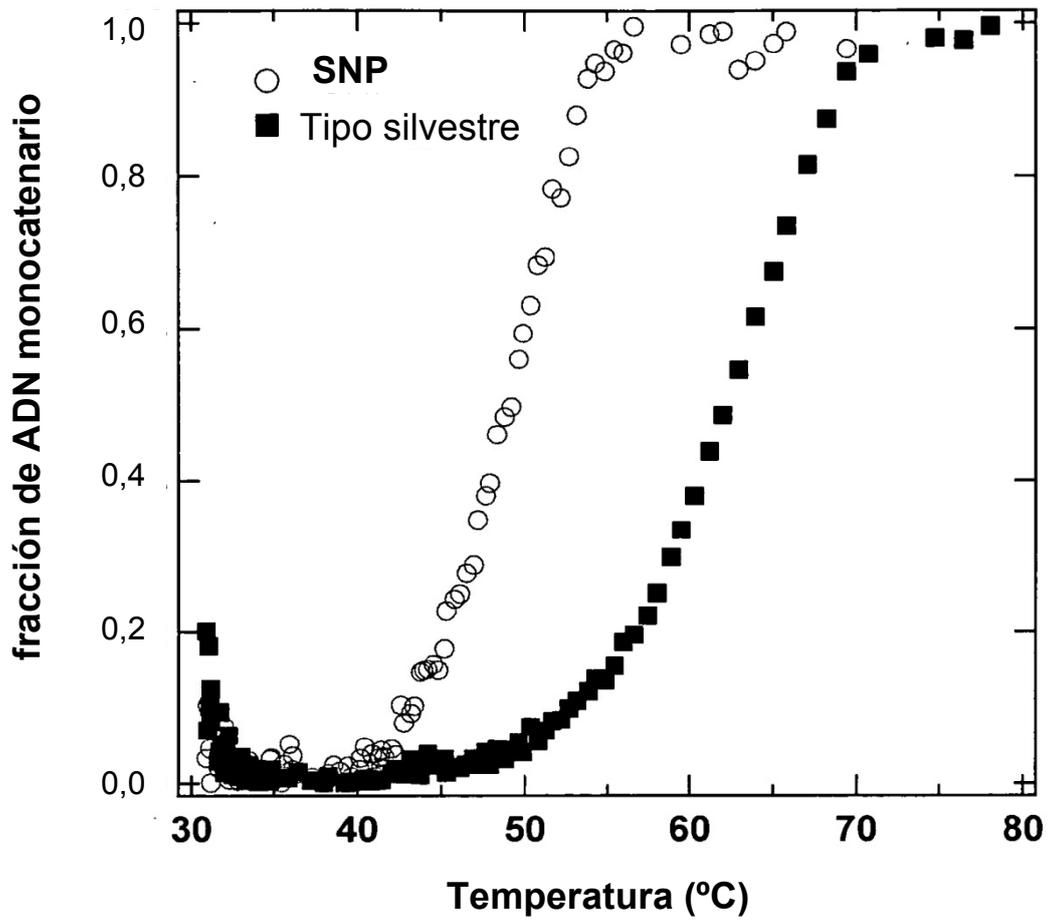


Fig. 4

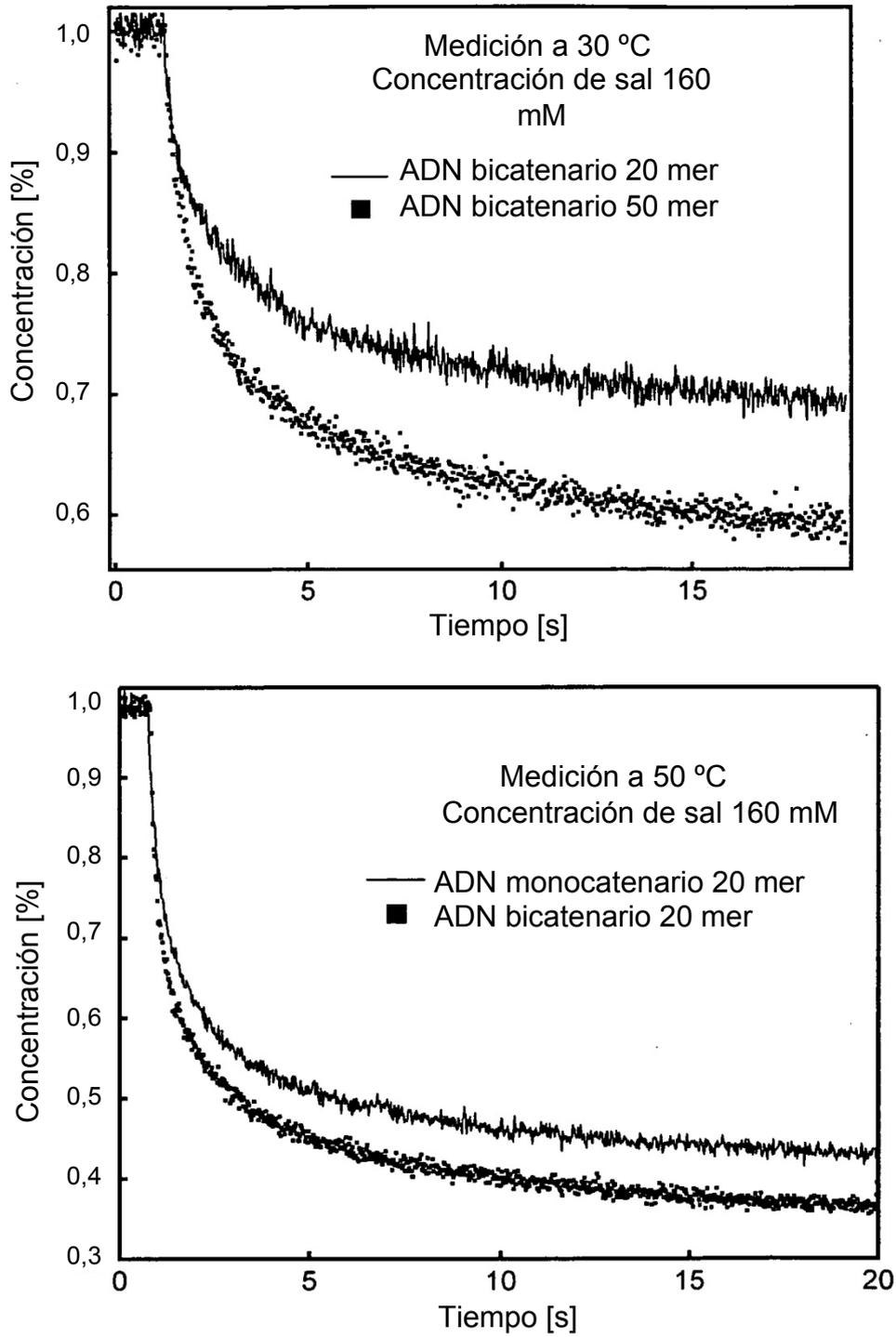
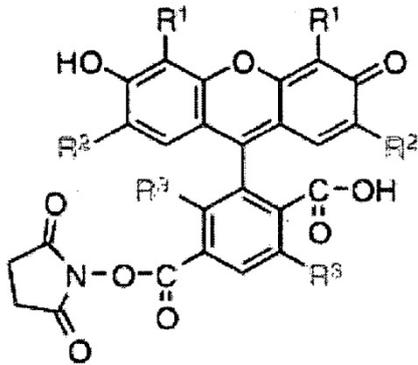


Fig. 5

6 Estructuras de 6-JOE SE (C6171MP), 6-HEX SE (C20091) y 6-TET SE (C20092).



	R ¹	R ²	R ³
JOE	Cl	OCH ₃	H
HEX	Cl	Cl	Cl
TET	H	Cl	Cl

Fig. 6

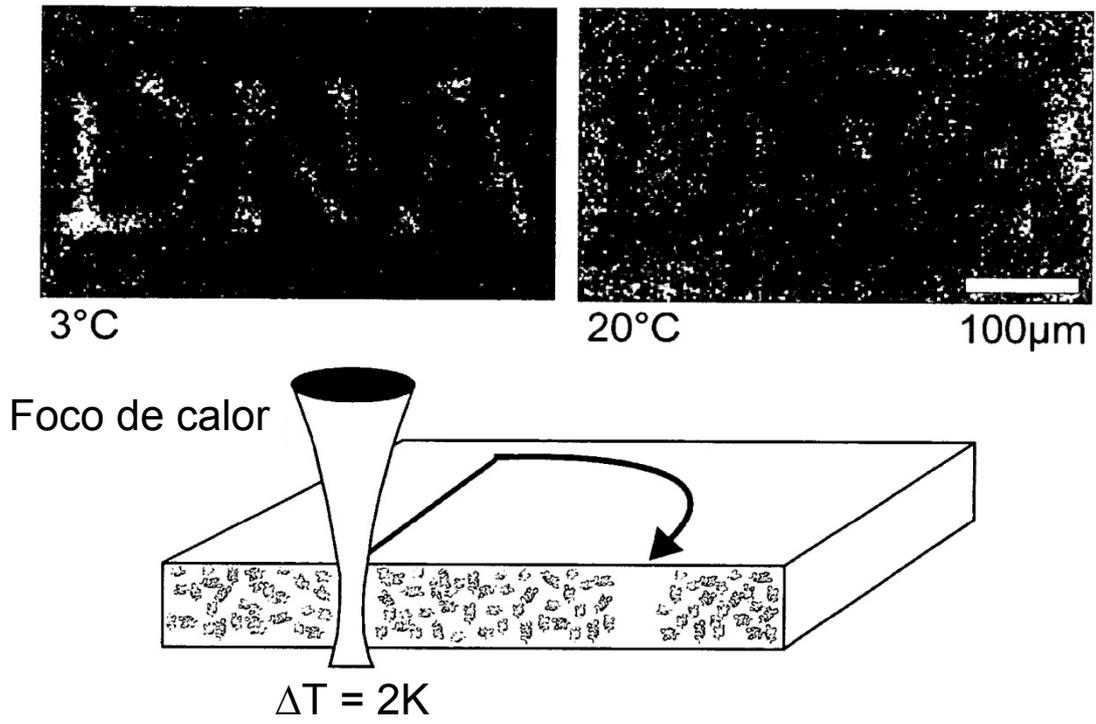


Fig. 7

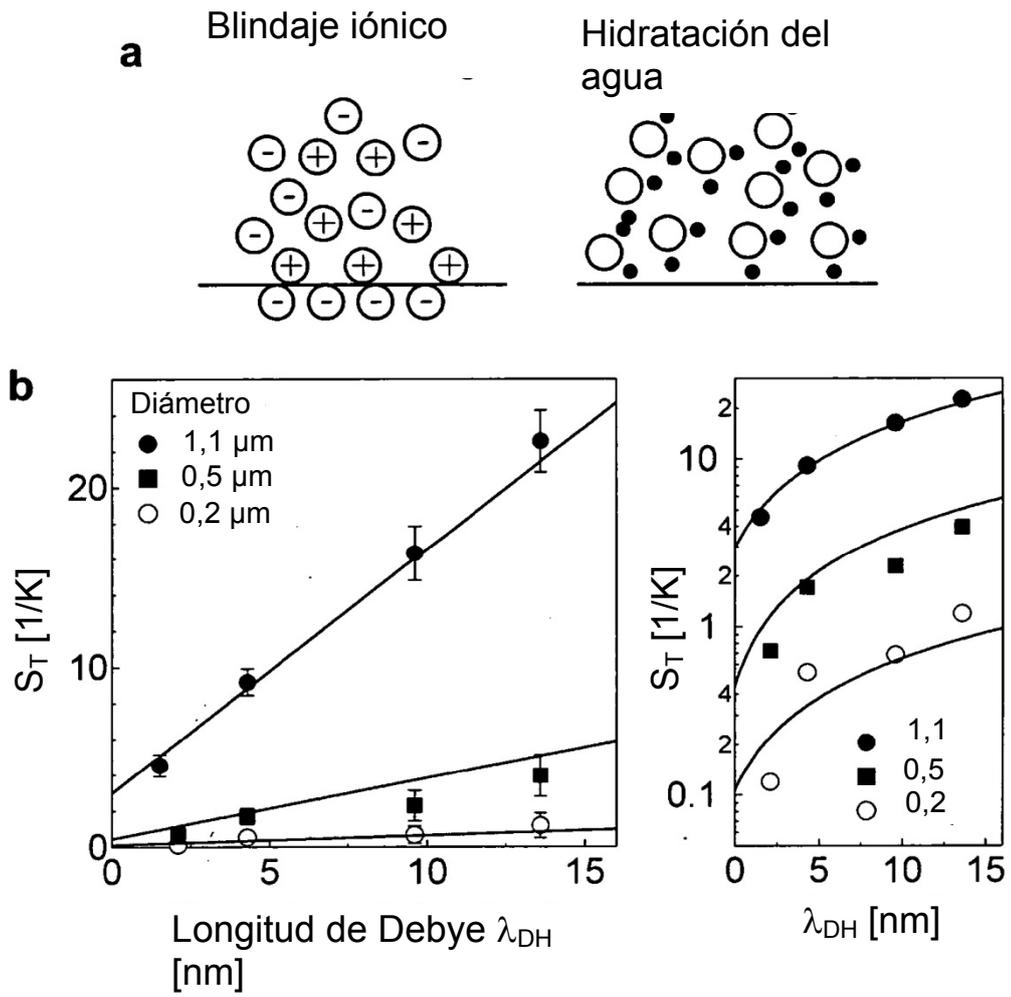


Fig. 8

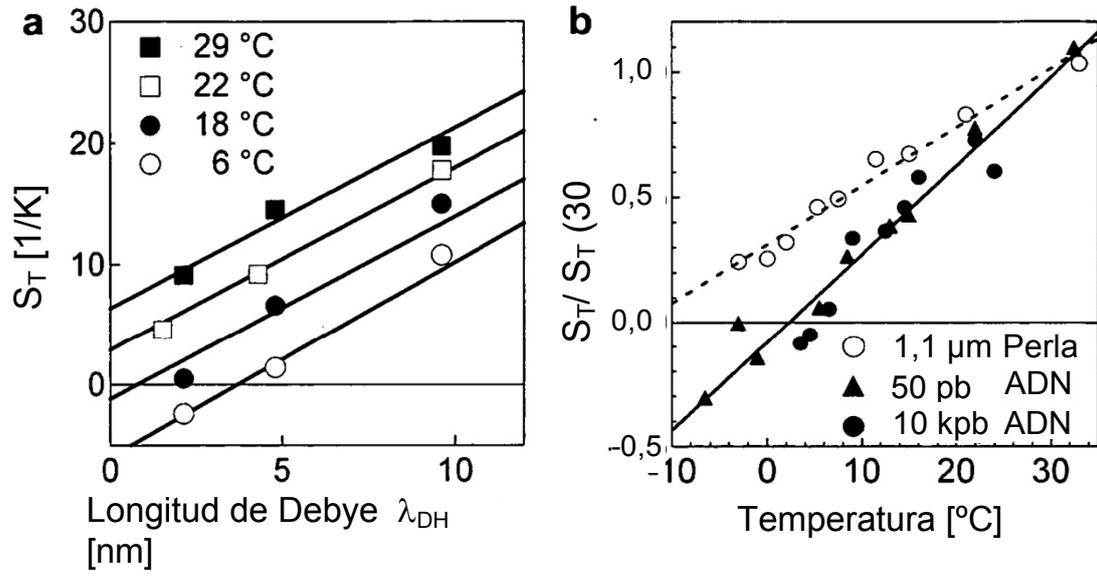


Fig. 9

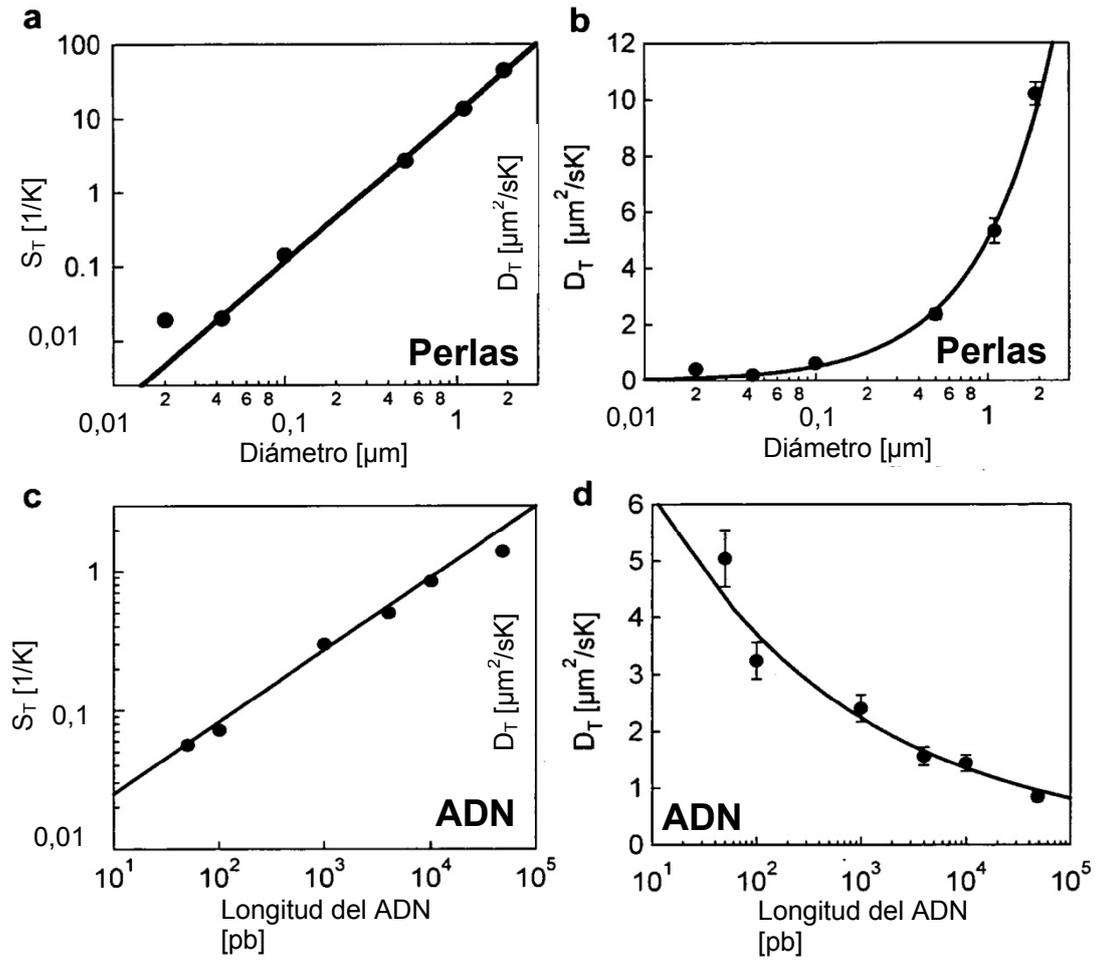


Fig. 10

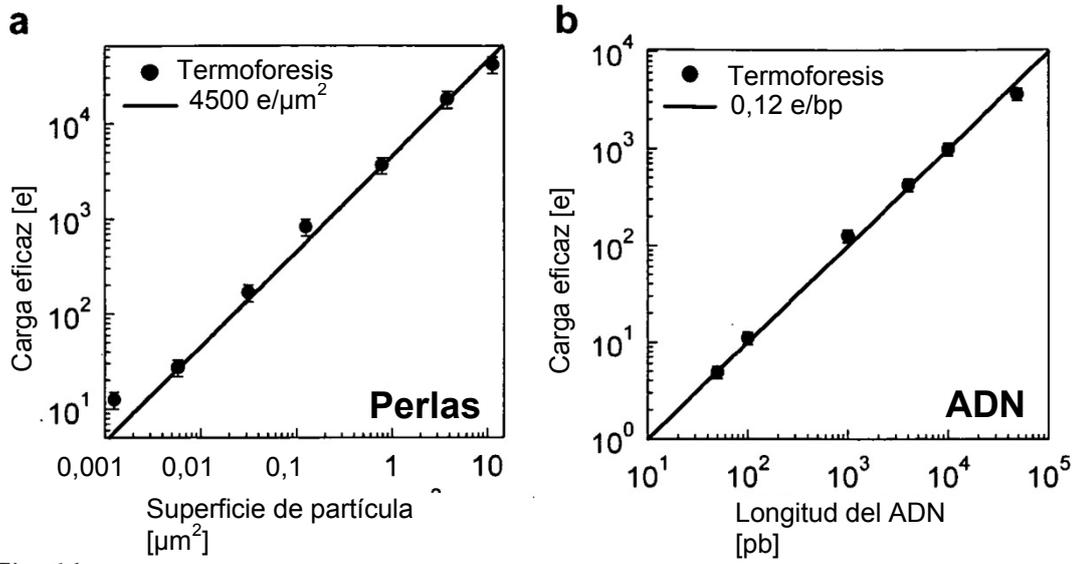


Fig. 11

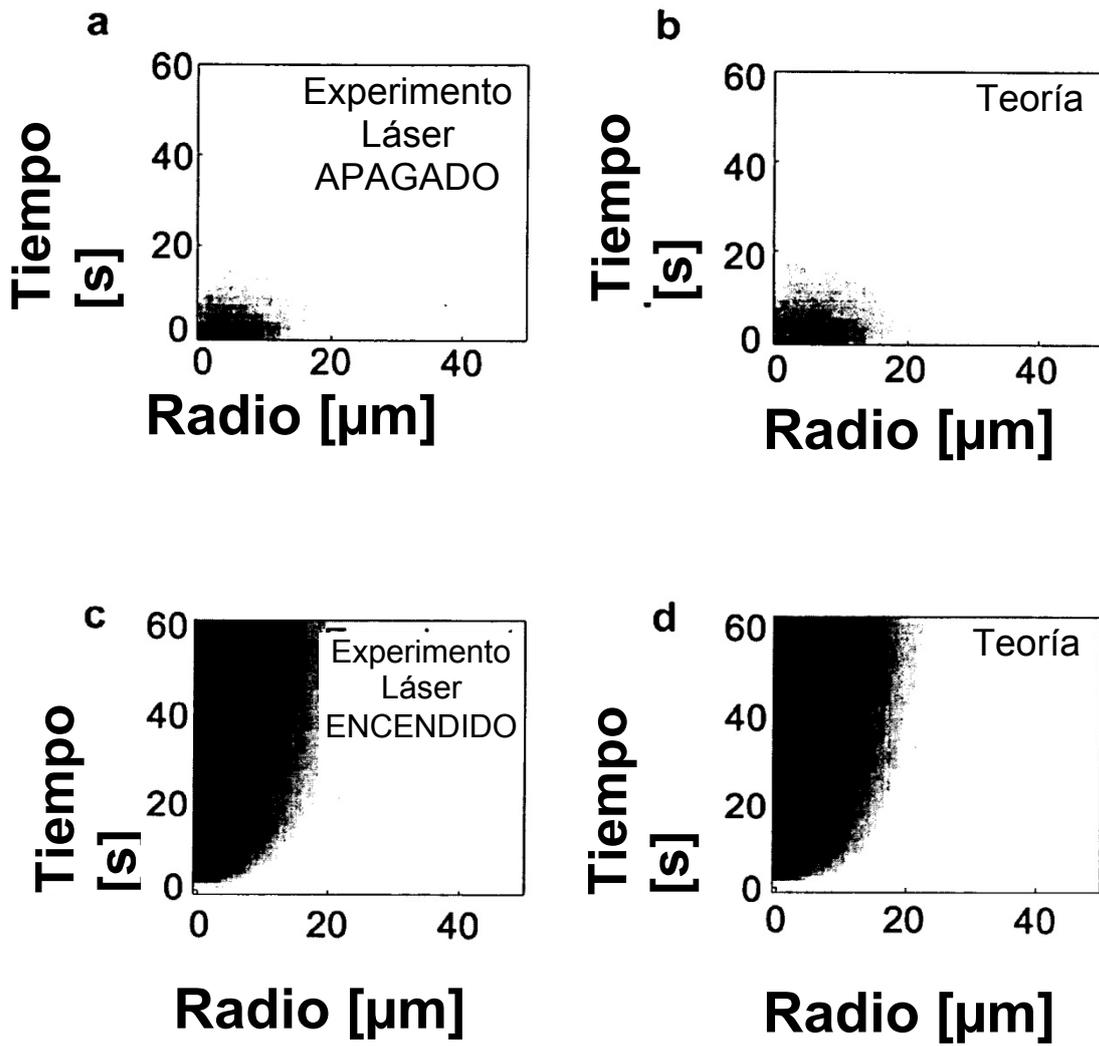


Fig. 12

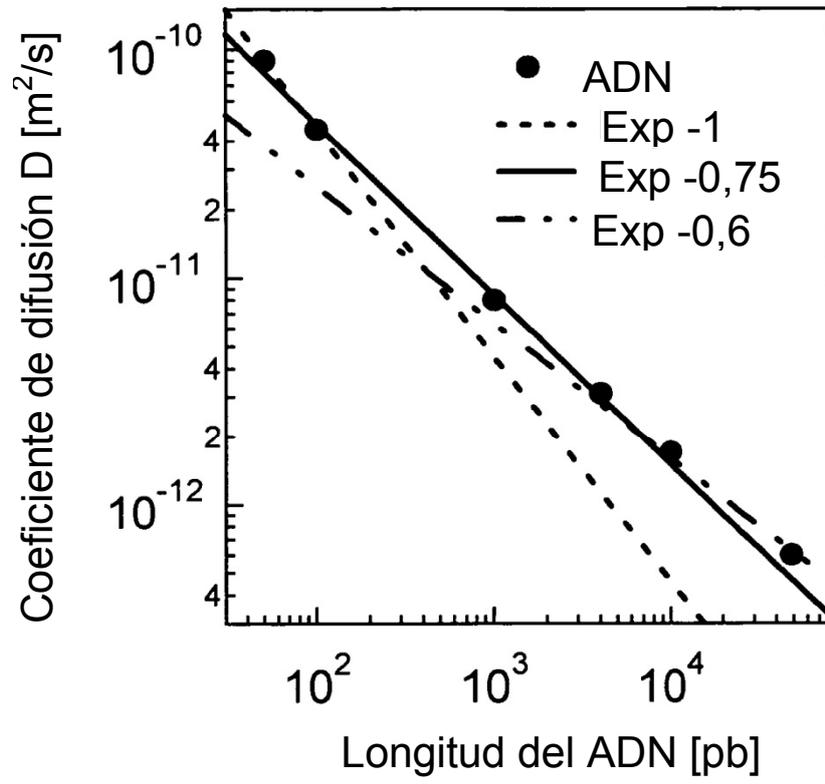


Fig. 13

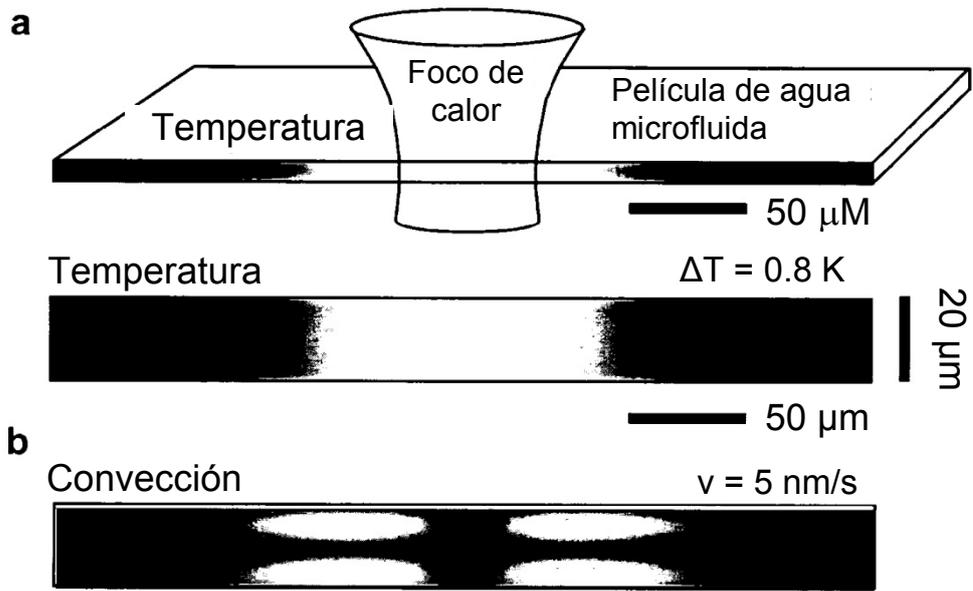


Fig. 14

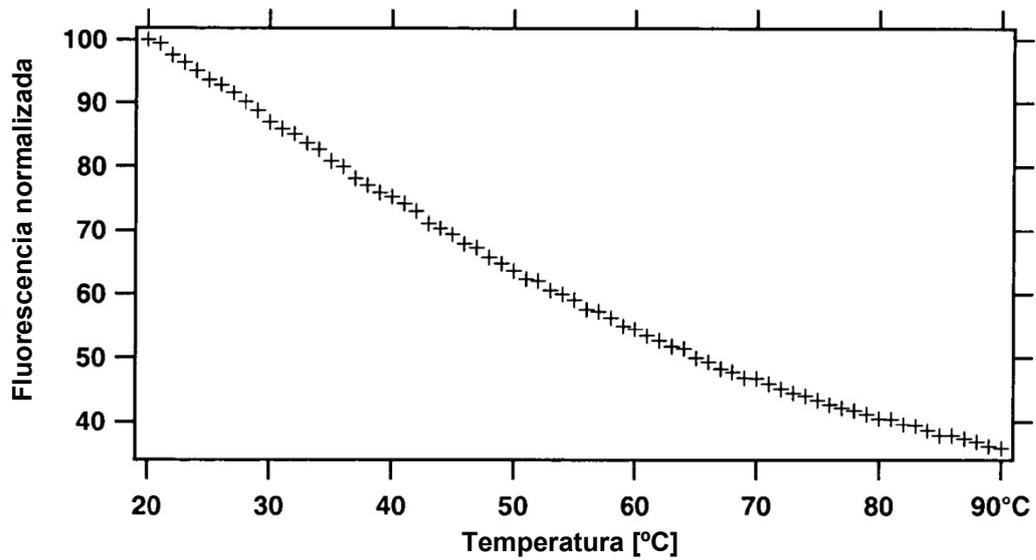


Fig. 15

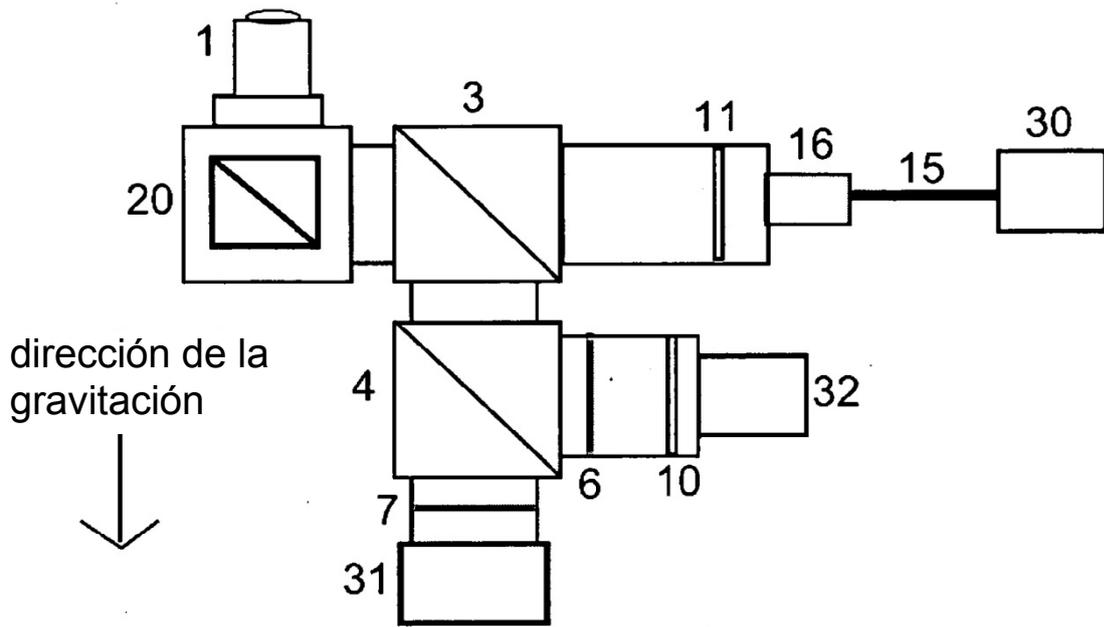


Fig. 16

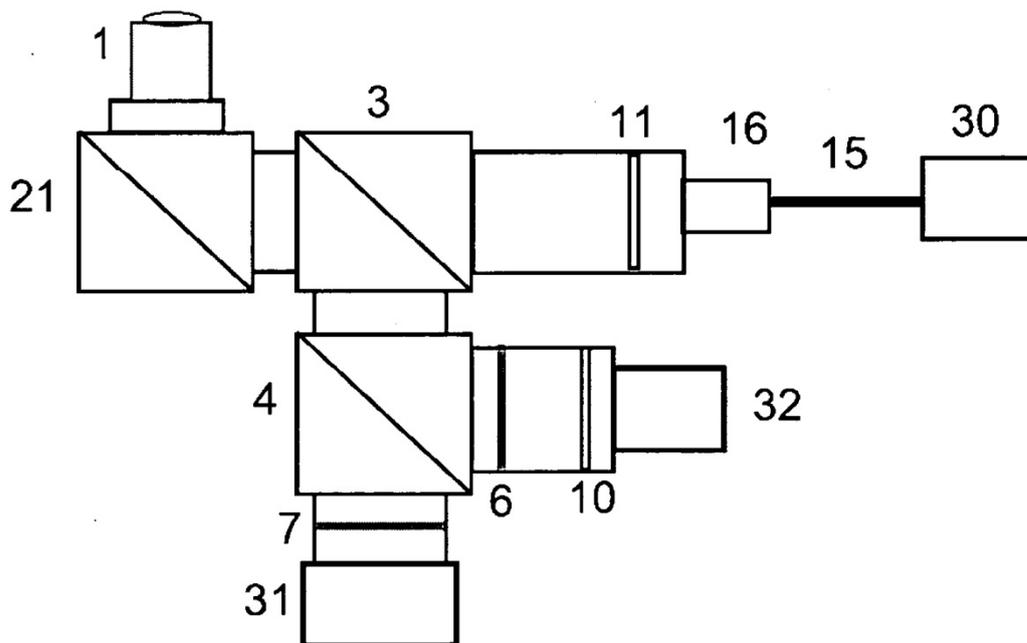


Fig. 17

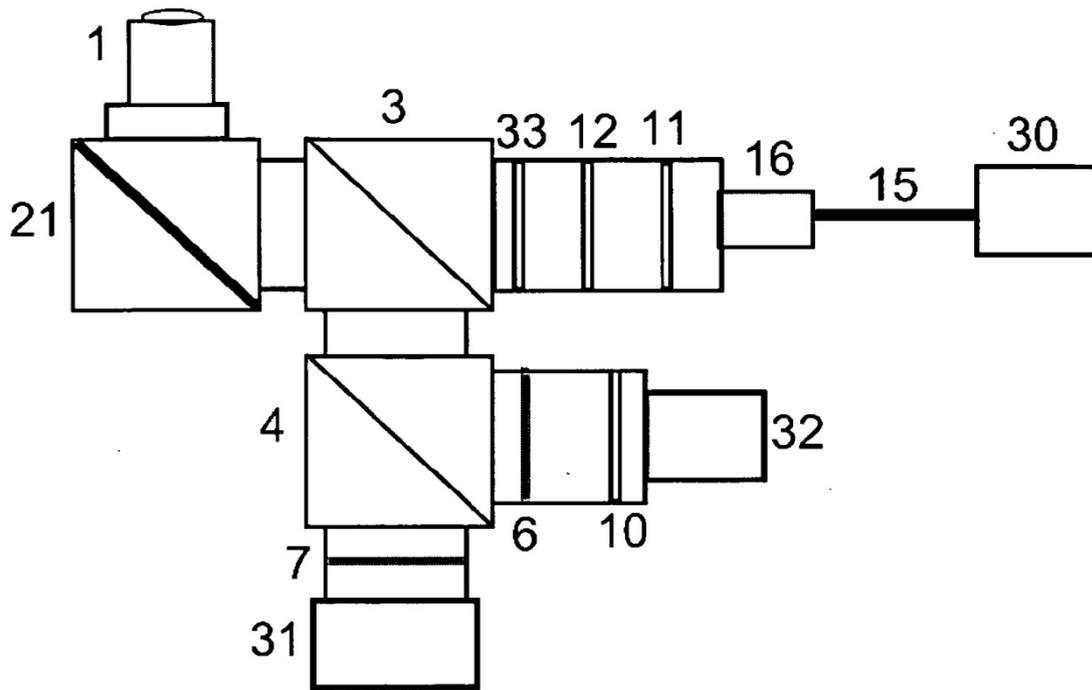


Fig. 18

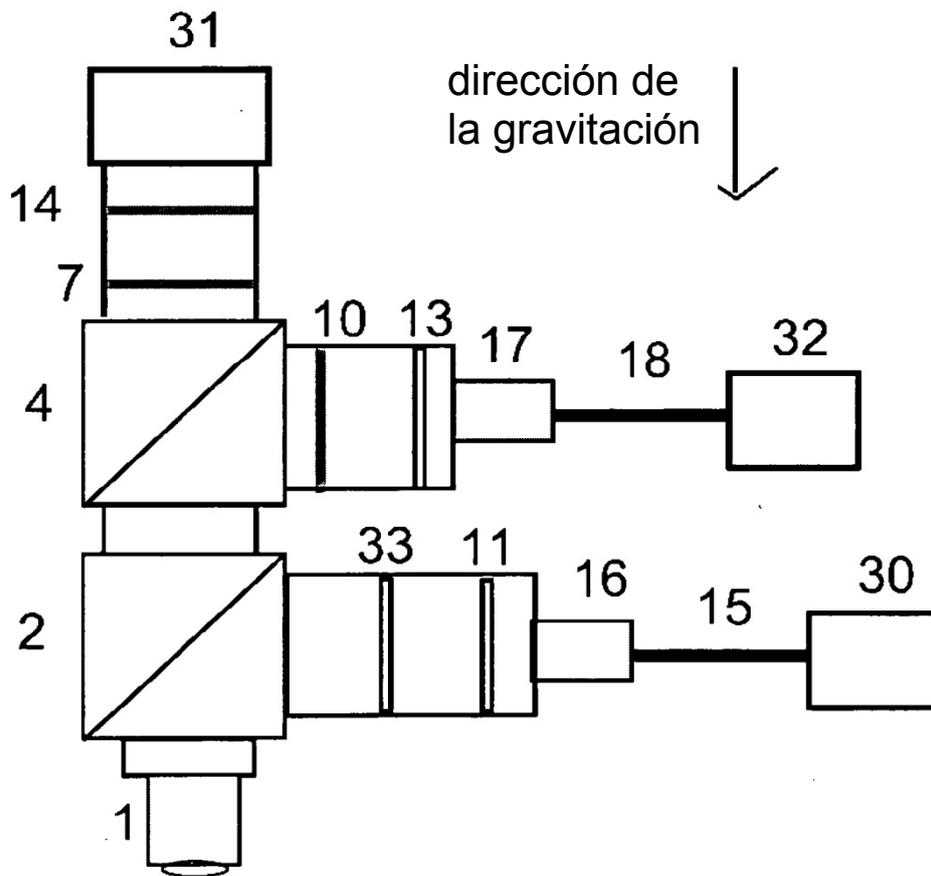


Fig. 19

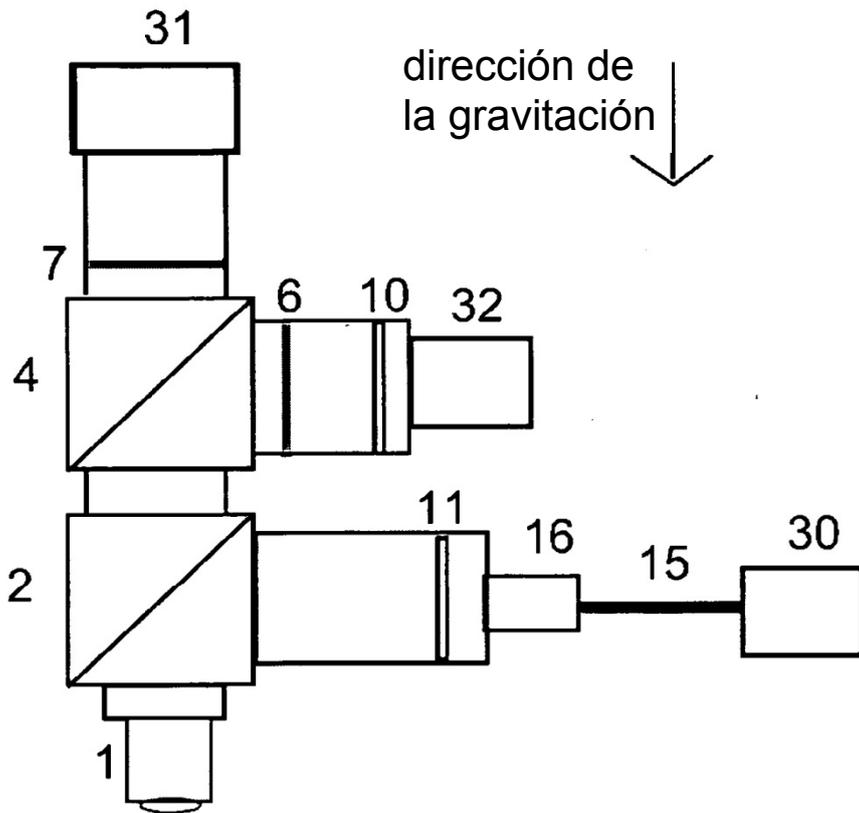


Fig. 20

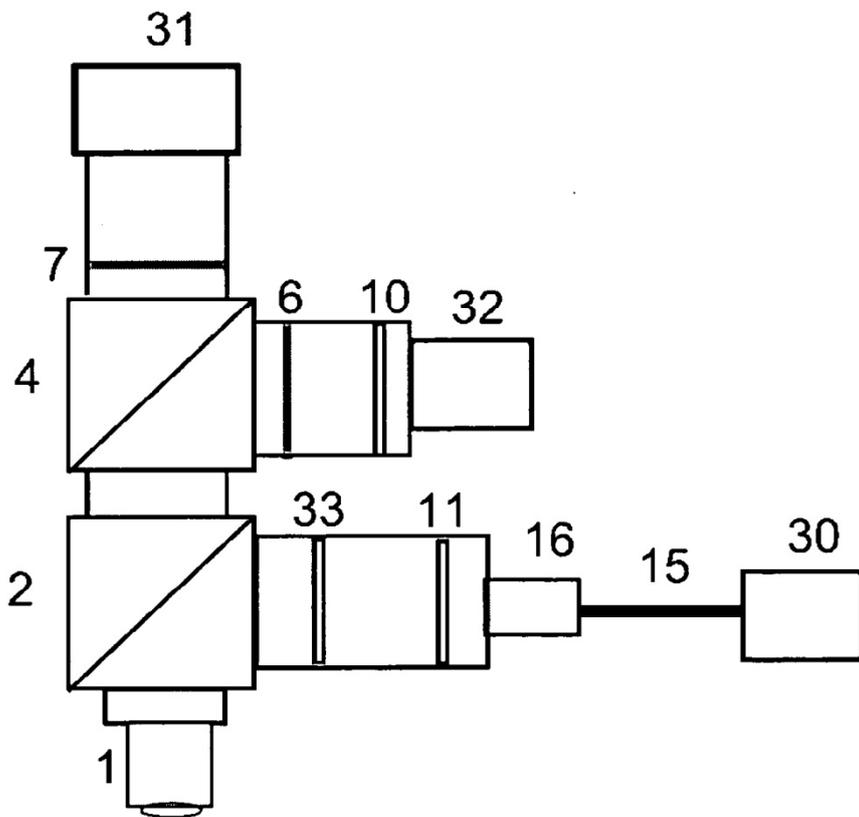


Fig. 21

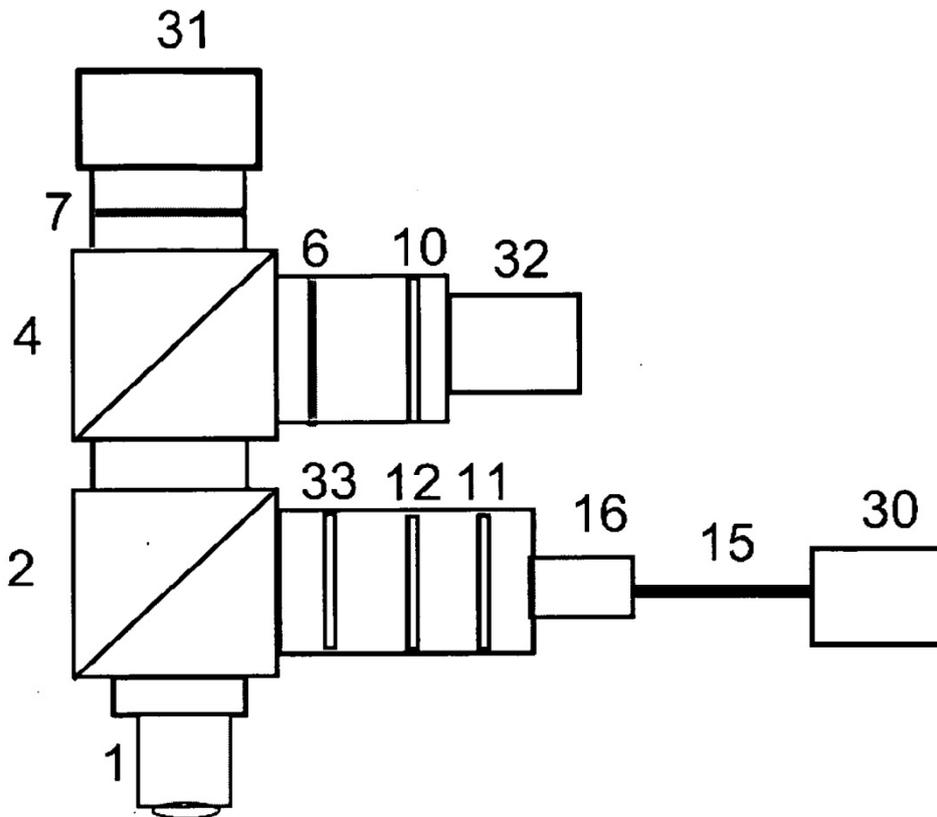


Fig. 22

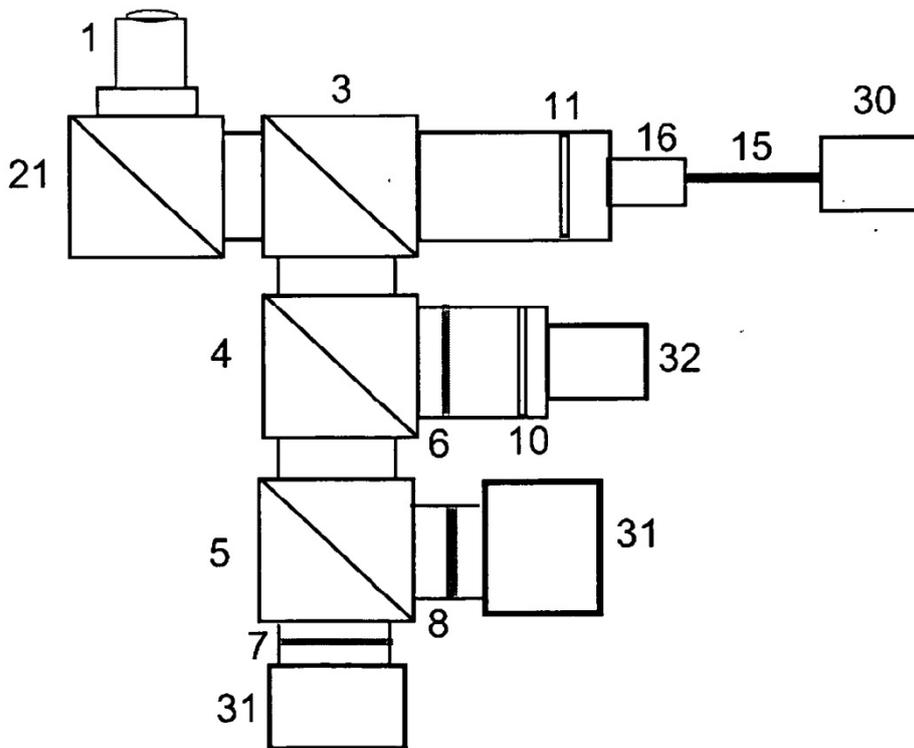


Fig. 23

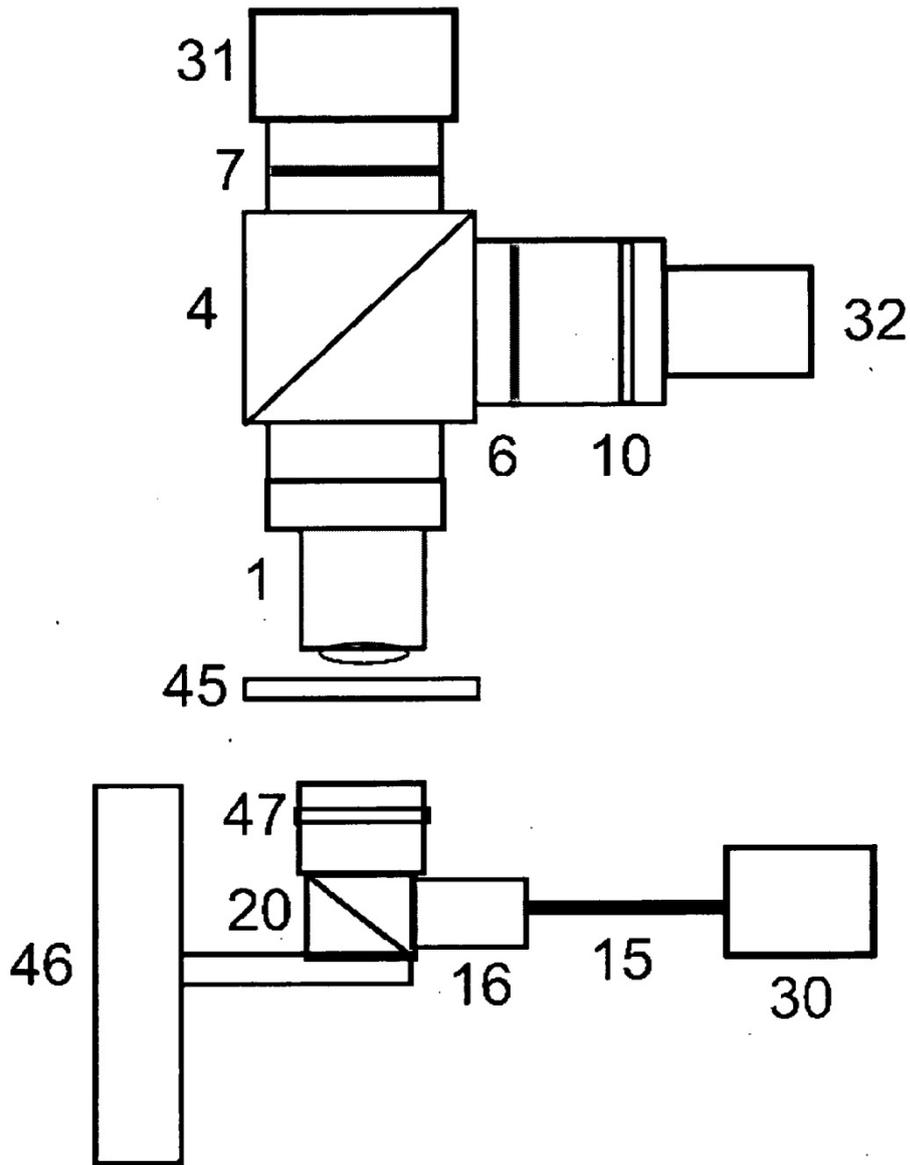


Fig. 24

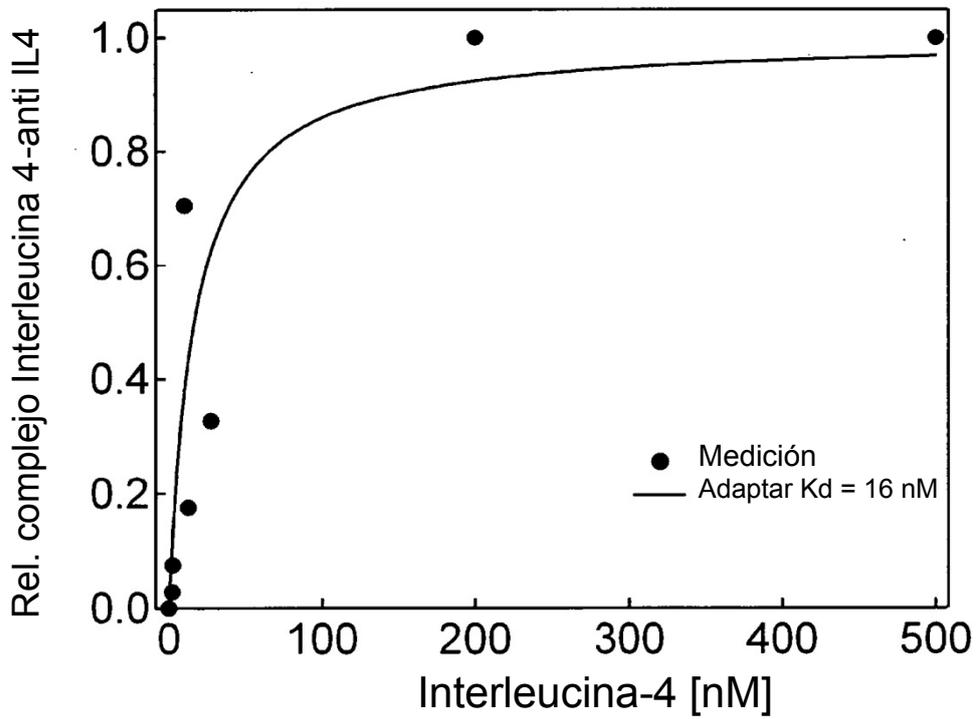
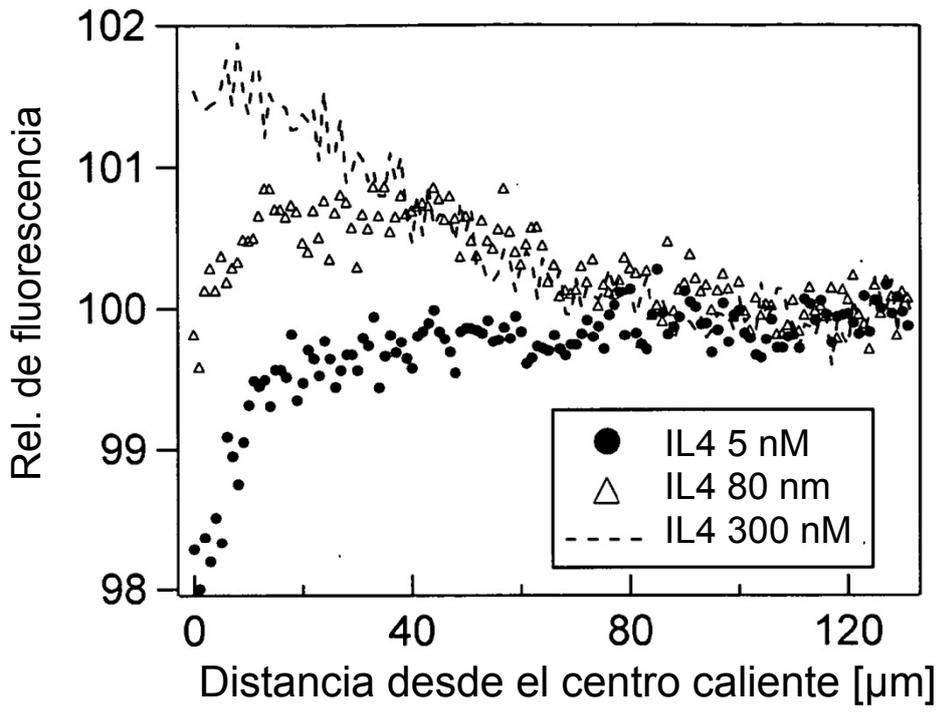


Fig. 25

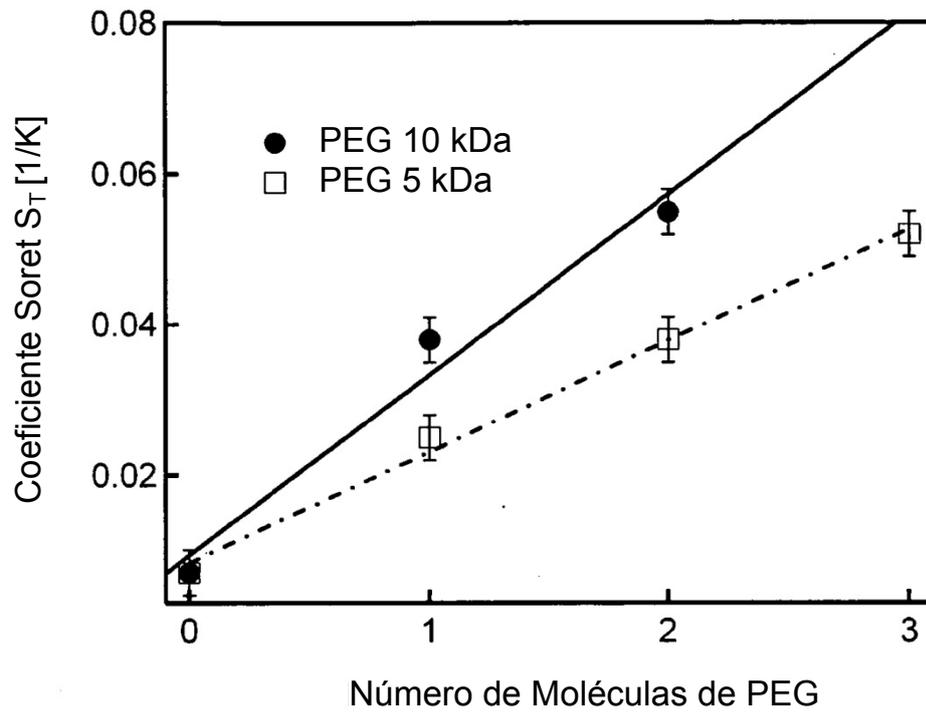


Fig. 26

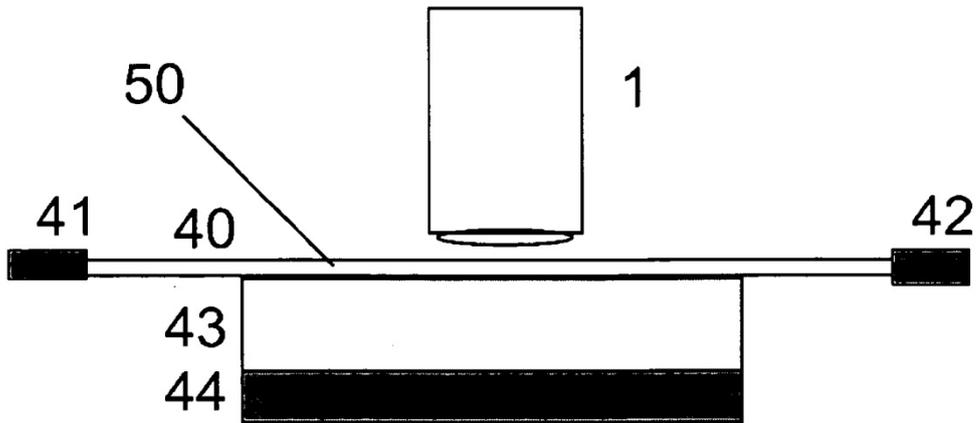


Fig. 27

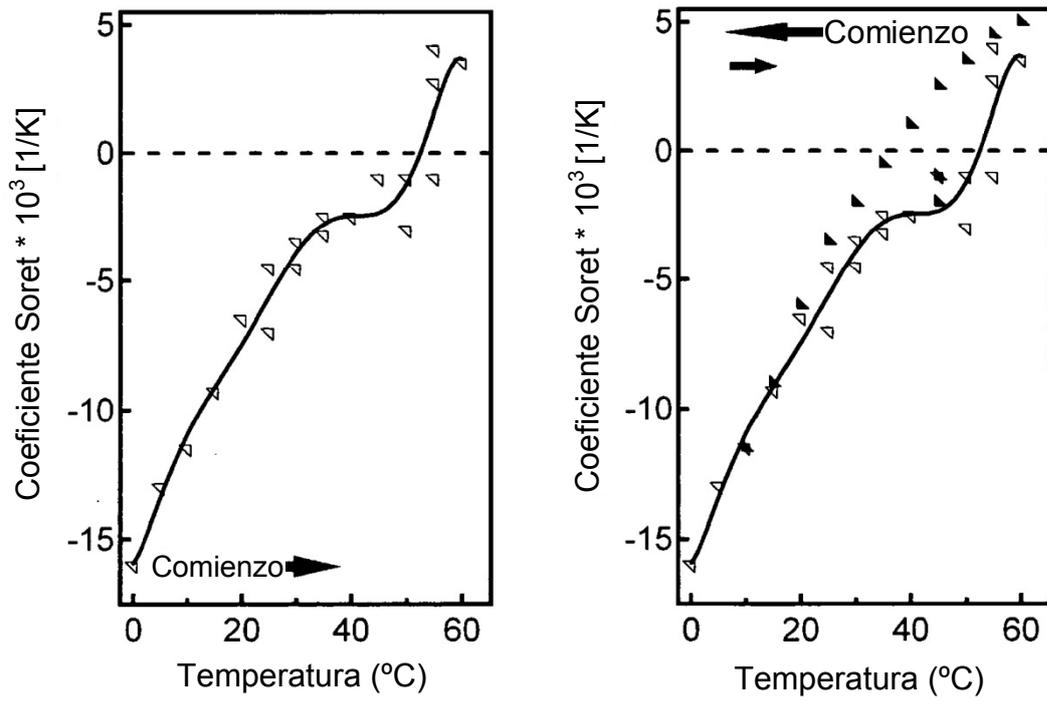


Fig. 28

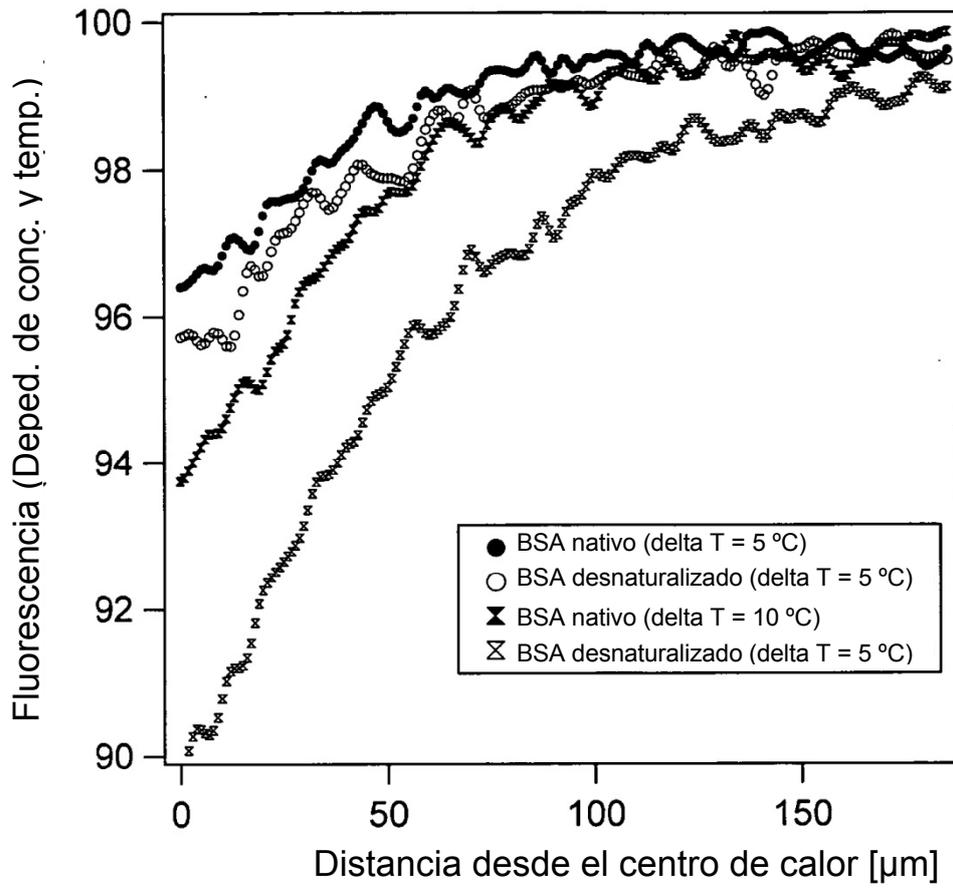


Fig. 29

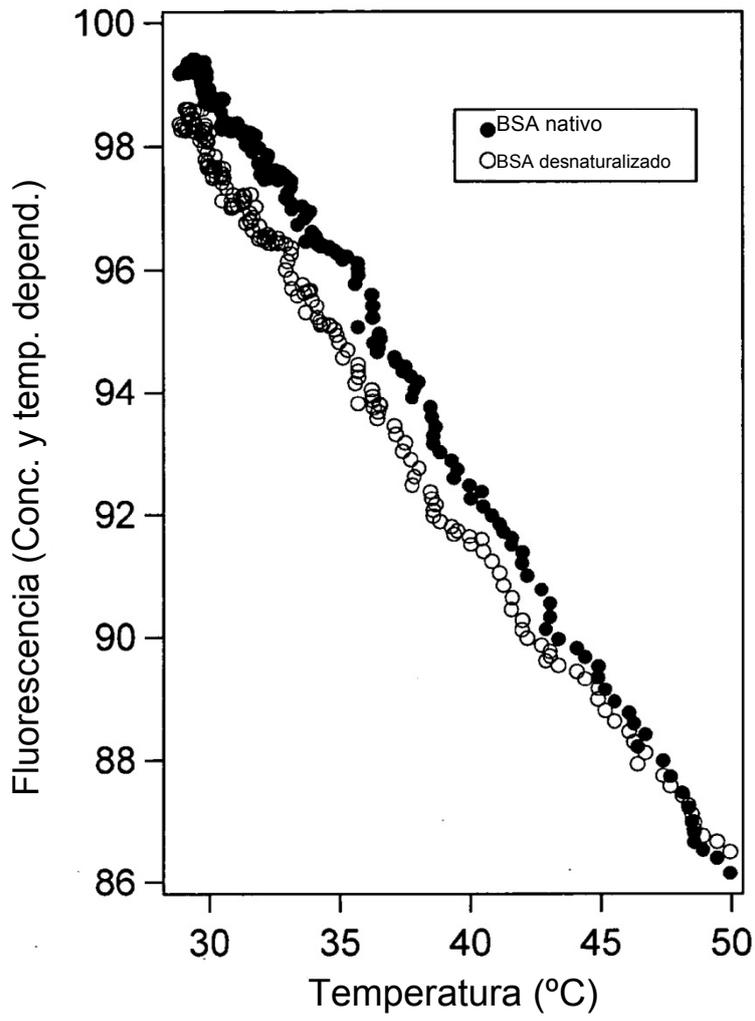


Fig. 30

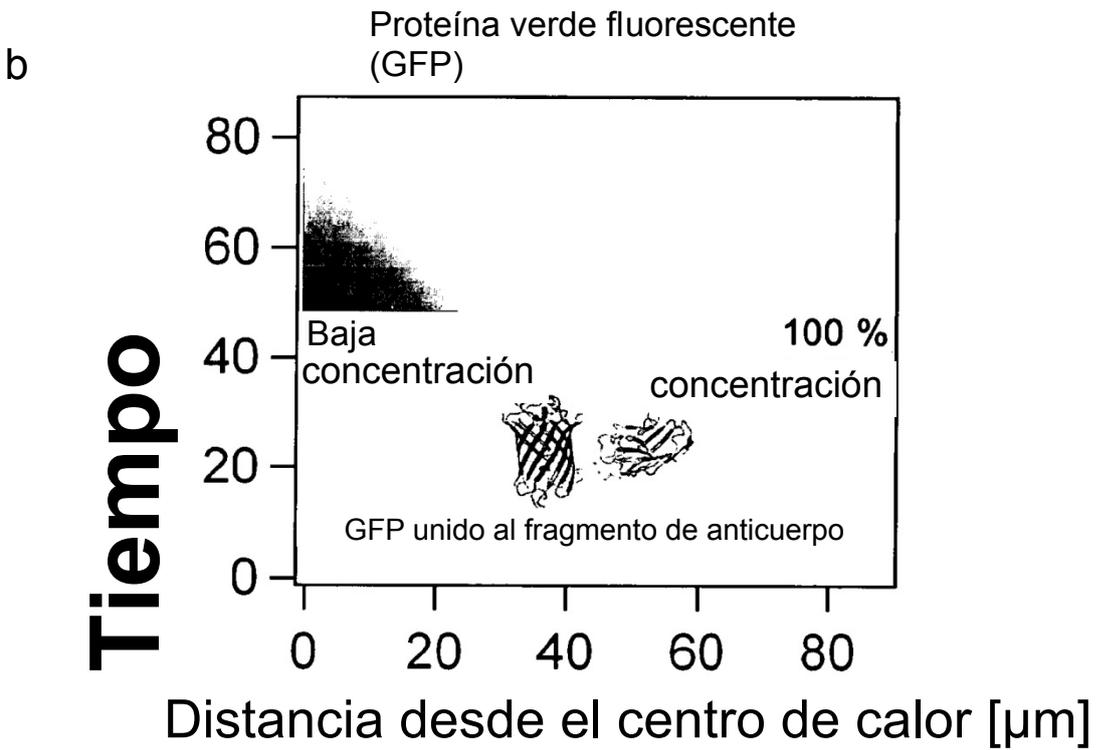
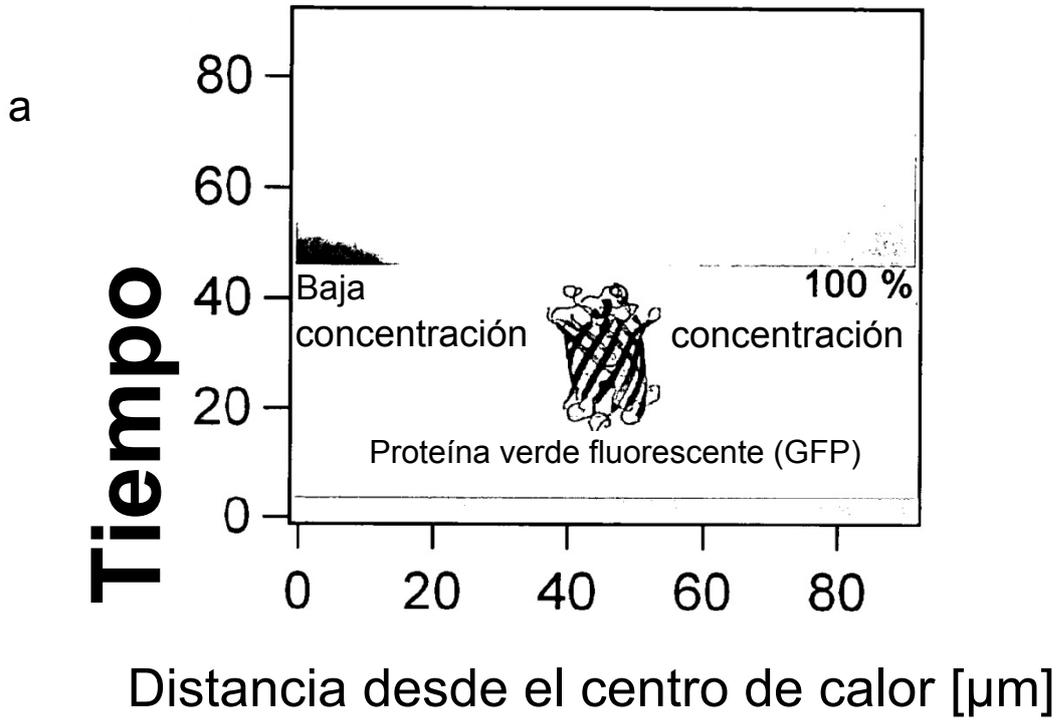


Fig. 31

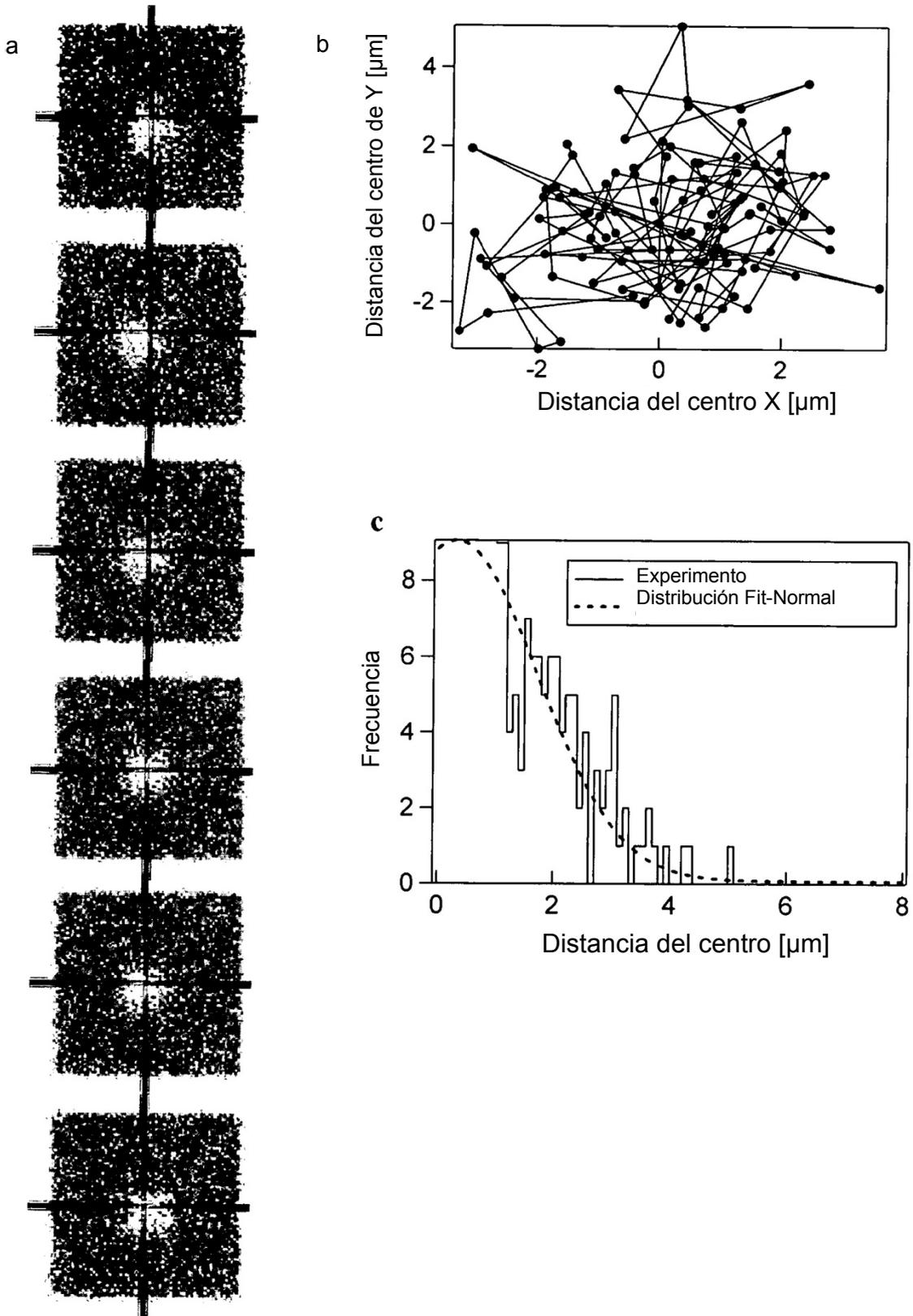


Fig. 32

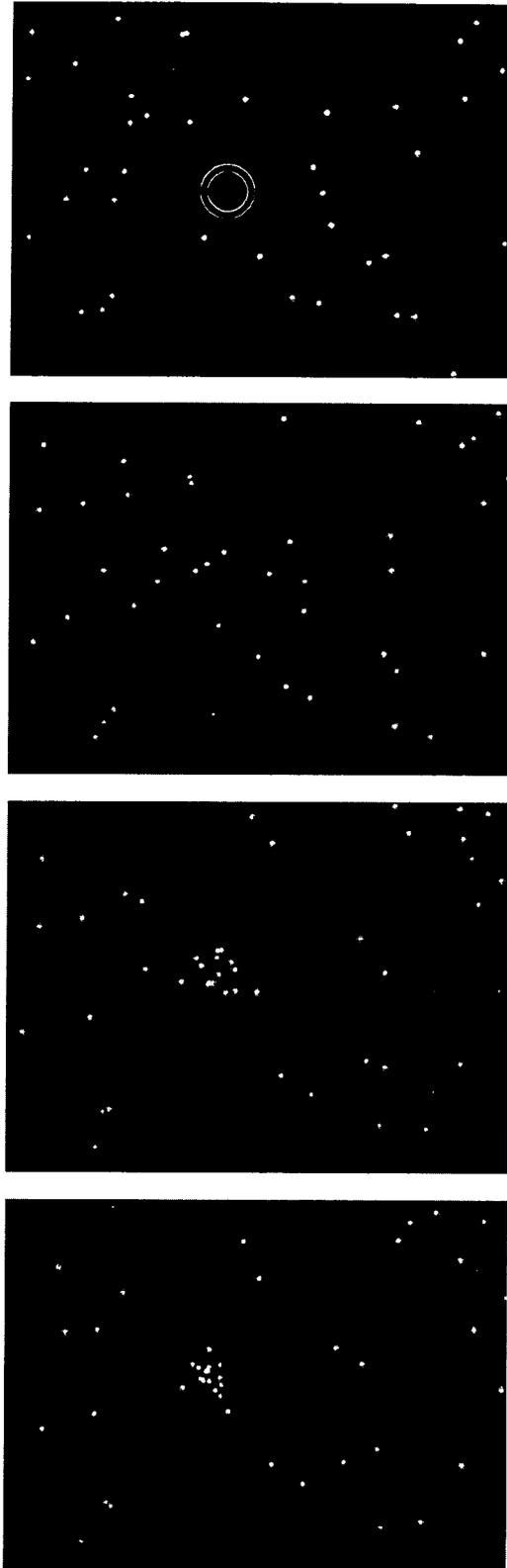


Fig. 33



Fig. 34

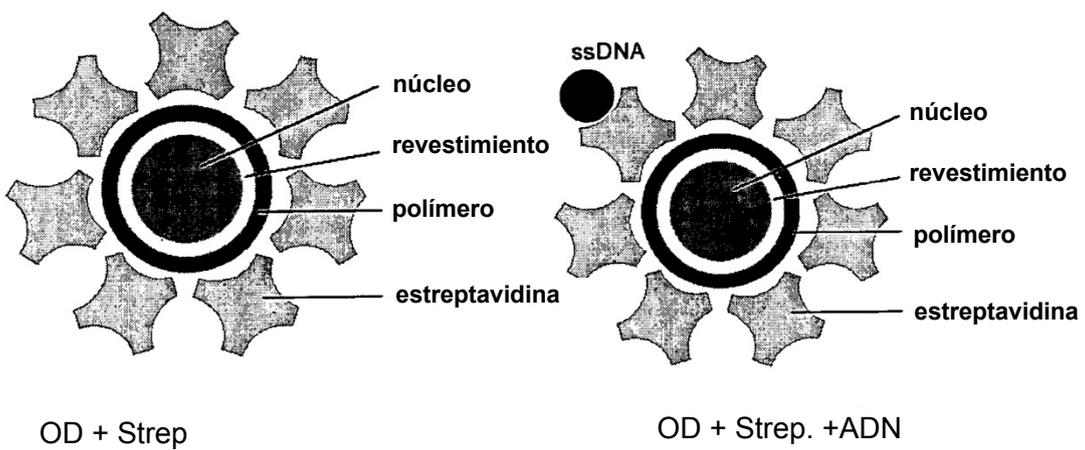
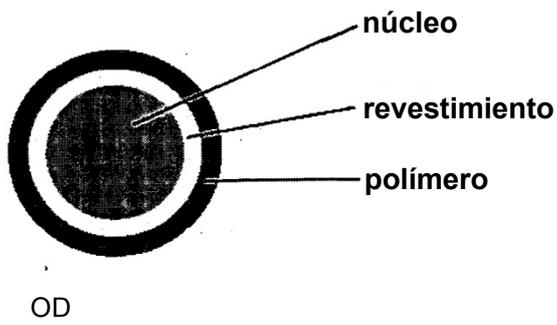
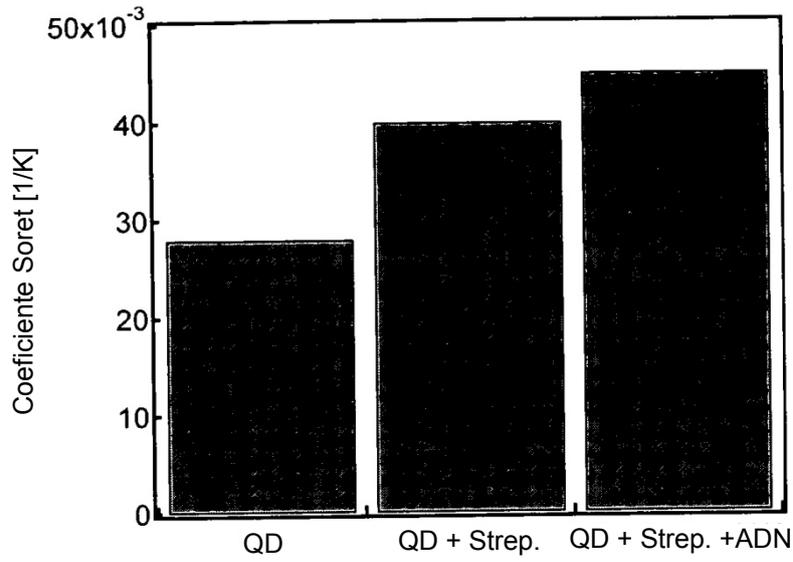


Fig. 35

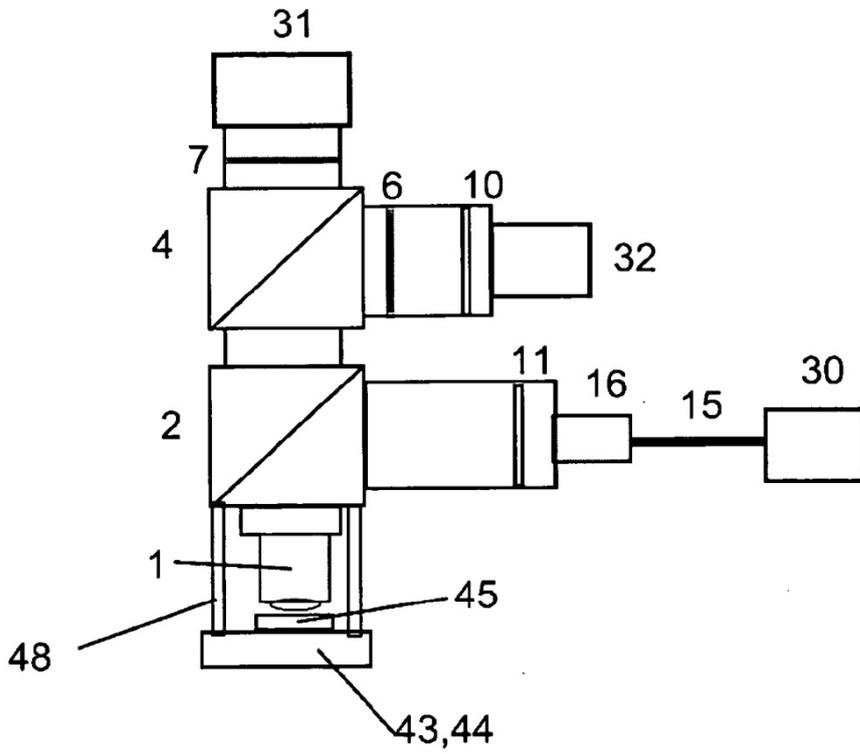


Fig. 36

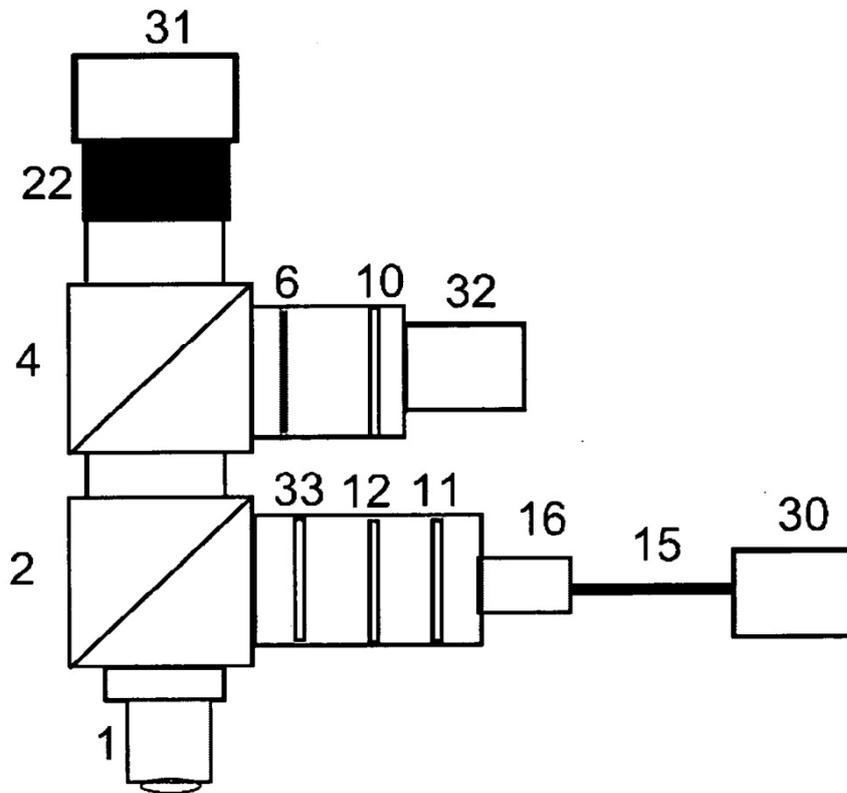


Fig. 37

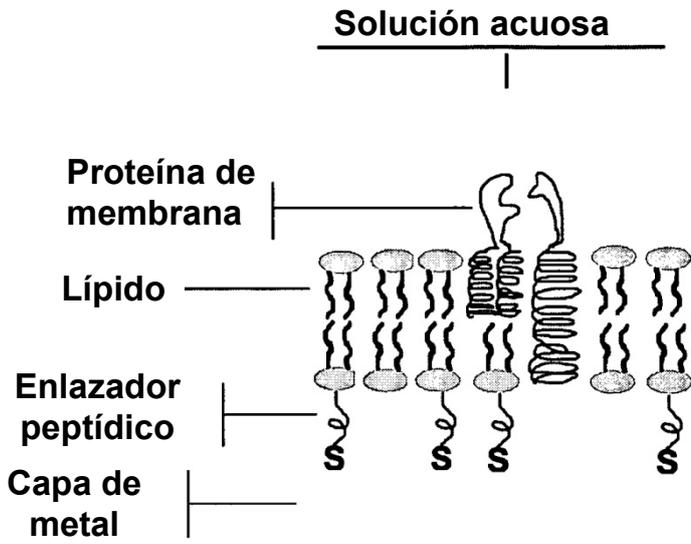
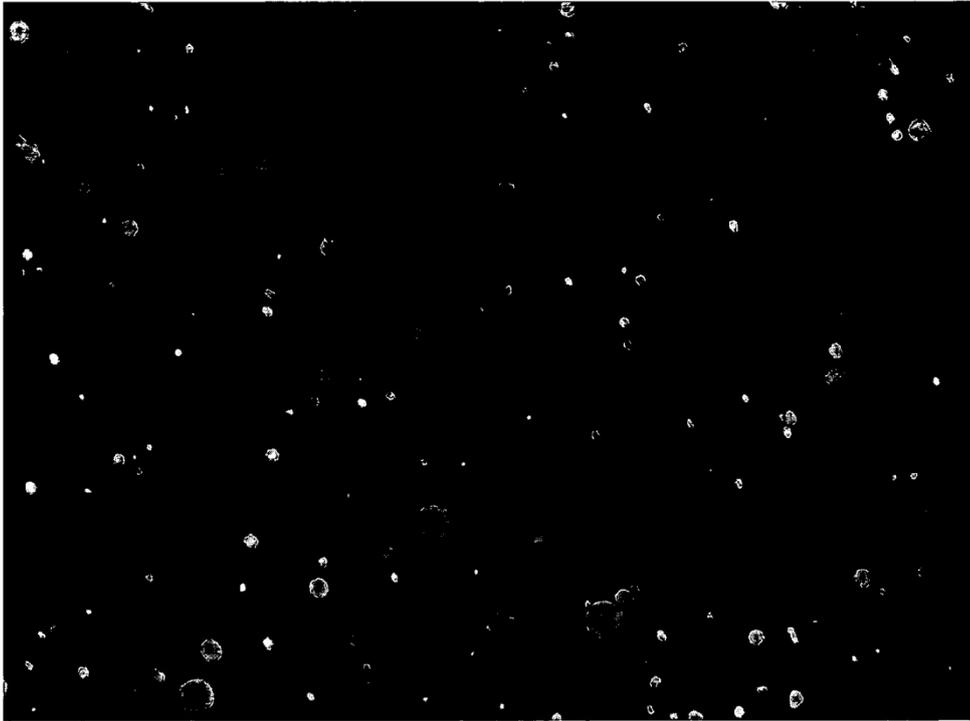


Fig. 38

a



b



Fig. 39