

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 754 814**

51 Int. Cl.:

**G01N 21/65** (2006.01)

**C40B 70/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.04.2008 PCT/US2008/060871**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.01.2009 WO09009198**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2008 E 08826290 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2019 EP 2147295**

54 Título: **Ensayos de nanomarcadores de DRPS**

30 Prioridad:

**18.04.2007 US 912599 P**

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

**20.04.2020**

73 Titular/es:

**SICPA HOLDING SA (100.0%)  
Avenue de Florissant 41  
1008 Prilly, CH**

72 Inventor/es:

**NATAN, MICHAEL J.**

74 Agente/Representante:

**TORO GORDILLO, Ignacio**

ES 2 754 814 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Ensayos de nanomarcadores de DRPS

### 5 **Campo técnico**

Las realizaciones que se desvelan se refieren a métodos para el uso de nanopartículas activas para DRPS o nanomarcadores de Dispersión Raman Potenciada en Superficie (nanomarcadores de DRPS) para crear o implementar una diversidad de plataformas de ensayo.

10

### **Antecedentes**

Se conocen innumerables tipos de ensayos biológicos, ensayos químicos, inmunoensayos o ensayos y pruebas similares en las técnicas biológicas, químicas, forenses, genómicas, médicas y genéticas. Muchos de estos ensayos o pruebas presentan la detección de una sustancia o analito que se ha marcado o asociado de otro modo a un marcador que hace que la detección sea más fácil, más rápida, más fiable o se mejor de otro modo.

15

Los marcadores conocidos pueden estar limitados de muchas maneras. Por ejemplo, el marcador puede ser difícil de asociar a un analito o puede ser difícil de detectar, en particular, los marcadores conocidos pueden ser difíciles de detectar rápidamente, con precisión o en cantidades muy pequeñas. Los marcadores conocidos pueden someterse a degradación. Los marcadores conocidos pueden alterar las propiedades o interactuar de otro modo con el material o analito que se detecta. Además, los marcadores conocidos y las familias de marcadores pueden no incluir suficientes miembros para permitir ensayos altamente multiplexados donde numerosos tipos independientes de marcadores se leen o clasifican inequívocamente.

20

25

La presente invención se refiere a superar uno o más de los problemas analizados anteriormente.

### **Sumario de las realizaciones**

Se desvelan varios métodos y sistemas para el uso de nanomarcadores de Dispersión Raman Potenciada en Superficie (nanomarcadores de DRPS) para crear o potenciar plataformas de ensayo. Los formatos de ensayo que se describen específicamente en el presente documento no pretenden limitar el alcance de la presente invención. Por tanto, cualquier ensayo, prueba, protocolo de diagnóstico o técnica similar que presente el uso de un elemento marcador separado puede implementarse con nanomarcadores de DRPS. Los ensayos con nanomarcadores de DRPS pueden usarse para detectar cualquier analito de interés, incluyendo, pero sin limitación, la detección de células, virus, bacterias, proteínas, ADN, ARN o moléculas pequeñas en cualquier tipo de muestras biológicas (reino animal o vegetal) o ambientales incluyendo, pero sin limitación, sangre completa o suero, muestras ocultas, orina, heces, aire, agua potable, fago, cualquier organismo, grupos multicelulares de células, por ejemplo, homogeneizado de tejido canceroso, compuestos inorgánicos o cualquier otro tipo de analito.

30

35

40

El documento US 2005/147976-A1 desvela un método para determinar la aparición de un nucleótido en una posición de nucleótido objetivo de un ácido nucleico objetivo, que utiliza la unión del ácido nucleico objetivo a una sonda oligonucleotídica marcada que se une al ácido nucleico objetivo, en el que la sonda oligonucleotídica marcada incluye un primer marcador y un segundo marcador, siendo el primer marcador capaz de afectar a una propiedad óptica del segundo marcador. El documento US 2006/038979-A1 desvela un método para generar una característica de seguridad para documentos, usando un marcador que comprende una nanopartícula metálica y una molécula activa para Raman asociada a la superficie de la nanopartícula metálica, en el que el metal potencia Raman y en el que dicha partícula tiene un espectro de DRPS medible.

45

50

Una realización es un método de producción de un espectro de dispersión Raman potenciada en superficie que es útil para determinados tipos de ensayos, en particular, ensayos de proximidad. El método incluye proporcionar dos nanopartículas activas para DRPS. La primera nanopartícula activa para DRPS absorberá un fotón a una primera longitud de onda y emitirá un fotón desplazado por Raman a una segunda longitud de onda. La segunda nanopartícula activa para DRPS absorberá un fotón a la segunda longitud de onda y emitirá un fotón desplazado por Raman a una tercera longitud de onda. En consecuencia, cuando las nanopartículas activas para DRPS primera y segunda están próximas entre sí y la primera nanopartícula activa para DRPS se ilumina a la primera longitud de onda, puede emitirse un fotón desplazado por Raman a la segunda longitud de onda. Este fotón puede ser absorbido por la segunda nanopartícula activa para DRPS provocando la emisión detectable de un segundo fotón desplazado por Raman a la tercera longitud de onda. Pueden diseñarse varios ensayos basados en lo anterior. Los ensayos de proximidad usando dos nanopartículas activas para DRPS tendrán características de señal de fondo ventajosas.

55

60

Pueden usarse diversas técnicas para preparar las nanopartículas activas para DRPS primera y segunda que tienen diferentes características de absorción y emisión. Las nanopartículas primera y segunda tienen diferentes formas. La primera nanopartícula puede ser esférica y la segunda nanopartícula, no esférica. Como alternativa, la primera nanopartícula puede ser sólida y la segunda nanopartícula hueca. La composición de las nanopartículas activas para DRPS respectivas también puede afectar a sus características de absorción y emisión. Por ejemplo, la primera

65

nanopartícula activa para DRPS puede ser de composición uniforme y la segunda nanopartícula activa para DRPS puede tener diferentes composiciones en estructuras separadas tales como un núcleo y una cubierta. Diferentes materiales utilizados para fabricar las nanopartículas activas para DRPS respectivas también pueden provocar diferentes características de emisión. Por ejemplo, una nanopartícula puede fabricarse a partir de un único metal tal como Au y la segunda partícula una aleación o mezcla de Au con otra sustancia. Como alternativa, pueden utilizarse partículas de diferentes elementos metálicos, mezclas o aleaciones de los mismos.

Como se ha descrito anteriormente, las características de absorbancia y emisión de las nanopartículas primera y segunda serán diferentes. Por ejemplo, un máximo de absorbancia de la primera nanopartícula activa para DRPS puede separarse de un máximo de absorbancia de la segunda nanopartícula activa para DRPS entre  $200\text{ cm}^{-1}$  y  $3500\text{ cm}^{-1}$ . Separaciones alternativas adecuadas entre características de absorbancia o emisión pueden caer dentro o fuera de este intervalo.

La relación entre la longitud de onda o las frecuencias de emisión primera y segunda puede, en determinados casos, estar directamente relacionada con la longitud de onda o frecuencia de iluminación. Por ejemplo, puede usarse un indicador de DRPS que posea un pico vibracional activo para DRPS a la energía  $\nu_1$ . La detección del fotón desplazado por Raman emitido a la tercera longitud de onda puede lograrse a una frecuencia de  $L-(2\nu_1)$  donde L es la primera longitud de onda que corresponde a la frecuencia de excitación del láser.

Los métodos descritos anteriormente pueden usarse para implementar diversos tipos de ensayos de proximidad donde al menos dos nanopartículas activas para DRPS se acercan estrechamente entre sí. La primera nanopartícula se excita a una primera longitud de onda y emite a una segunda longitud de onda. La segunda nanopartícula activa para DRPS puede entonces excitarse a la segunda longitud de onda y emitir a una tercera longitud de onda. El ensayo incluirá un detector configurado para detectar luz a la tercera longitud de onda. Un ensayo de proximidad como se ha descrito anteriormente presenta inmunidad relativa a las emisiones de fondo. El ensayo de proximidad puede implementarse con cualquier tipo de nanopartícula activa para DRPS como se ha descrito anteriormente.

#### Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un diagrama esquemático de un nanomarcador de DRPS adecuado para la implementación de realizaciones seleccionadas de la presente invención;  
La Fig. 2 es una comparación gráfica de los espectros de DRPS de nanomarcadores de DRPS que tienen cinco moléculas indicadoras diferentes;  
La Fig. 3 es un diagrama esquemático de una realización de ensayo de proximidad que presenta dos tipos de nanomarcadores activos para DRPS.

#### Descripción detallada de la invención

##### I. ANÁLISIS GENERAL DE NANOMARCADORES DE DRPS Y NANOPARTICULAS ACTIVAS PARA DRPS

Muchos de los ensayos que se describen en el presente documento presentan nanopartículas activas para DRPS o nanomarcadores de DRPS. Como se usa en el presente documento, una nanopartícula activa para DRPS es una partícula de tamaño nanométrico que tiene una superficie adecuada para la potenciación de la dispersión Raman. Por ejemplo, una nanopartícula de oro o plata. También pueden usarse otros materiales para fabricar una nanopartícula activa para DRPS. Como se describe a continuación, las nanopartículas activas para DRPS pueden tener diversas formas y estructuras. La característica clave de una nanopartícula activa para DRPS es que tiene una superficie que potenciará un espectro de Raman. Una nanopartícula activa para DRPS puede asociarse a una sustancia activa para Raman, tal como un indicador de Raman o un colorante de Raman. Como alternativa, la nanopartícula activa para DRPS puede no asociarse a una sustancia activa para Raman. Una nanopartícula activa para DRPS puede funcionalizarse o encapsularse con cualquier número de sustancias. Por ejemplo, un tipo específico de nanopartícula, un nanomarcador de DRPS como se describe en detalle a continuación, normalmente se encapsula. Por tanto, el núcleo de la nanopartícula de un nanomarcador de DRPS es en sí mismo una nanopartícula activa para DRPS.

Los nanomarcadores de DRPS ofrecen al menos seis ventajas intrínsecas como marcadores de detección. (1) Aunque pueden excitarse en un amplio intervalo de longitudes de onda, en particular los marcadores de DRPS pueden excitarse en el IR cercano y, por tanto, son compatibles con mediciones en sangre total. (2) Los nanomarcadores de DRPS resisten el fotoblanqueo, lo que permite mayores potencias de láser y tiempos de obtención de datos más largos, dando como resultado mediciones más sensibles. (3) Existe un gran número de marcadores distintos, permitiendo ensayos altamente multiplexados. (4) Los nanomarcadores de DRPS no son reactivos con muchos analitos y sustratos (5) Los nanomarcadores de DRPS son duraderos. (6) Los nanomarcadores de DRPS se manipulan y almacenan fácilmente. Por tanto, los marcadores de DRPS son resistentes a la agregación, son estables contra la descomposición en disolvente y aire, son químicamente inertes y pueden centrifugarse y redispersarse sin pérdida de actividad de DRPS.

En algunas realizaciones, se usan nanomarcadores de DRPS en ensayos biológicos y químicos como sustitutos de

marcadores fluorescentes. De hecho, los nanomarcadores de DRPS poseen una serie de características que los hacen muy superiores a los marcadores ópticos de la técnica anterior a base de fluoróforos. Por ejemplo, los ensayos que usan la detección de fluoróforos se ven obstaculizados habitualmente por la presencia de auto fluorescencia y otros efectos de fondo. Además, muchos ensayos requieren el uso de una serie de fluoróforos diferentes; los fluoróforos diferentes requieren habitualmente diferentes químicas de fijación y tienen diferentes requisitos ambientales y sensibilidades. Es particularmente notable la interrupción de la actividad fluorescente que se observa cuando algunos fluoróforos se conjugan con proteínas. Por último, la fotodegradación irreversible resultado de la creación de un estado excitado triplete o singulete, seguida de una reacción química no reversible que elimina permanentemente el estado excitado, determina una limitación grave en la sensibilidad de detección. Por el contrario, los nanomarcadores de DRPS no pueden fotoblanquearse ni fotodegradarse, tienen propiedades químicas y físicas uniformes y pueden resolverse fácilmente del fondo.

Los nanomarcadores de DRPS son marcadores de detección óptica novedosos en forma de nanopartículas basados en la dispersión Raman potenciada en superficie (DRPS) (Mulvaney et al. (2003) *Langmuir* 19: 4784-4790; Natan, Patente de los EE.UU. N.º 6.514.767). *Raman scattering* (Long (2002) *The Raman Effect; A Unified Treatment of the Theory of Raman Scattering by Molecules*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester; *Modern Techniques in Raman Spectroscopy* (1996) John Wiley & Sons Ltd, Chichester; *Analytical Applications of Raman Spectroscopy* (1999) Blackwell Science Ltd, Malden, MA.) La DRPS es una espectroscopía óptica basada en láser que, para moléculas, genera un espectro vibracional similar a una huella dactilar con características que son mucho más estrechas que la fluorescencia habitual. La dispersión Raman puede excitarse usando un amplio intervalo de longitudes de onda que incluyen luz monocromática de rojo lejano o IR cercano, energías de fotones que son demasiado bajas para excitar la fluorescencia de fondo inherente en muestras biológicas. Puesto que los espectros de Raman generalmente cubren energías vibracionales de 300-3500  $\text{cm}^{-1}$ , podría ser posible medir una docena de marcadores simultáneamente (o más), todo con una única fuente de luz. Sin embargo, los espectros de Raman normales son muy débiles, limitando la utilidad de la química bioanalítica. En la DRPS, moléculas muy cercanas a las características de rugosidad a escala nanométrica sobre superficies de metales nobles (oro, plata, cobre) dan lugar a aumentos de millones a billones de veces [conocidos como factor de potenciación (FP)] en la eficiencia de la dispersión (Moskovits (1985) *Rev Mod. Phys.* 57:783-826; Otto et al. (1992) *J. Phys. Cond. Mat.* 4:1143-1212; Campion y Kambhampati (1998) *Chem. Soc. Rev.* 27:241-249; Tian et al. (2002) *J. Phys. Chem. B* 106:9463-9483; Búsqueda en línea de CAS, abril de 2004), *Surface-Enhanced Raman Scattering: Physics and Applications*, Kneipp, K., Moskovits, M. y Kneipp, H., Ed. Springer-Verlag, 2007, Berlín Heidelberg.

Más importante aún, la DRPS también puede usarse para detectar moléculas adsorbidas en nanopartículas metálicas individuales (Emory et al. (1998) *J. Am. Chem. Soc.* 120:8009-8010; Moyer et al. (2000) *J. Am. Chem. Soc.* 122:5409-5410) y se ha usado para demostrar la detección de moléculas individuales (Nie y Emory (1997) *Science* 275:1102-1106; Kneipp et al. (1997) *Phys. Rev. Lett.* 78:1667-1670; Michaels et al. (1999) *J. Am. Chem. Soc.* 121:9932-9939; Xu et al. (1999) *Phys. Rev. Lett.* 83:4357-4360; Goulet et al. (2003) *Anal. Chem.* 75:1918-1923).

Un nanomarcador de DRPS 10 típico se muestra en la Fig. 1. El nanomarcador de DRPS 10 ilustrado incluye un núcleo de nanopartícula de metal 12 y una cubierta de  $\text{SiO}_2$  (sílice) 14. También pueden usarse otros materiales incluyendo, pero sin limitación, diversos tipos de polímeros, como encapsulantes o cubiertas de una manera coherente con la presente invención. Además, pueden usarse polímeros como indicadores y pueden usarse polímeros multifuncionales como indicadores y encapsulantes. El núcleo de nanopartícula metálica 12 podría ser en sí mismo una partícula de cubierta de núcleo, una partícula hueca o podría contener dos o más materiales en una orientación geométrica bien definida o no definida. Los detalles relativos al uso, la fabricación y las características de un nanomarcador de DRPS normal se incluyen en las Patentes de los EE.UU. N.º 6.514.767 y 7.192.778 tituladas "Nanopartículas compuestas activas para espectroscopía potenciada en superficie". Aunque la invención se describe en términos de nanomarcadores de DRPS preparados a partir de núcleos de nanopartículas 12 individuales, ha de entenderse que pueden usarse grupos o agregados de núcleos de nanopartículas en la preparación de nanomarcadores de DRPS. Los expertos en la materia conocen métodos para la preparación de grupos de agregados de coloides metálicos. El uso de partículas de tipo sándwich como se describe en la Patente de los EE.UU. N.º 6.861.263, también se contempla.

El núcleo de nanopartícula 12 puede ser de cualquier material conocido en la técnica como potenciador de Raman. Los núcleos de nanopartícula 12 pueden ser isotropos o anisotropos. Las nanopartículas anisotropas pueden tener una longitud y un ancho. La partícula 12 podría comprender una colección de dos o más partículas del mismo o diferente tamaño, o la misma o diferente forma, o mezclas de tamaños y formas. En algunas realizaciones, la longitud de una nanopartícula anisótropa es la dimensión paralela a la abertura en la que se produjo la nanopartícula. En el caso de las nanopartículas anisotropas, en algunas realizaciones, la nanopartícula tiene un diámetro (ancho) de 350 nm o menos. En otras realizaciones, la nanopartícula tiene un diámetro de 250 nm o menos y, en algunas realizaciones, un diámetro de 100 nm o menos. En algunas realizaciones, el ancho es de entre 15 nm y 300 nm. En algunas realizaciones, la nanopartícula tiene una longitud de aproximadamente 10-350 nm.

Las nanopartículas adecuadas para ser el núcleo de un nanomarcador de DRPS incluyen metal coloidal, nanobarras huecas o rellenas, nanopartículas magnéticas, paramagnéticas, conductoras o aislantes, partículas sintéticas,

hidrogeles (coloides o barras). Las nanopartículas utilizadas en la presente invención pueden existir como nanopartículas individuales o como grupos o agregados de las nanopartículas.

Un experto habitual en la materia apreciará que las nanopartículas pueden existir en una diversidad de formas, incluyendo, pero sin limitación, esferoides, varillas, discos, pirámides, cubos, cilindros, nanohélices, nanocadenas, nanoanillos, nanopartículas en forma de varilla, nanopartículas en forma de flecha, nanopartículas en forma de lágrima, nanopartículas en forma de tetrápodo, nanopartículas en forma de prisma y una pluralidad de otras formas geométricas y no geométricas. Otra clase de nanopartículas que se ha descrito incluye aquellas con área superficial interna. Éstas incluyen partículas huecas y partículas porosas o semiporosas. Además, se entiende que se han descrito en la bibliografía métodos para preparar partículas de estas formas y, en ciertos casos, para preparar partículas activas para DRPS de estas formas. Aunque se reconoce que la forma de la partícula y la relación de aspecto pueden afectar a las características físicas, ópticas y electrónicas de las nanopartículas, la forma específica, la relación de aspecto o la presencia/ausencia de área superficial interna no influyen en la calificación de una partícula como nanopartícula.

Una nanopartícula también incluye una nanopartícula en la que el metal incluye un componente adicional, tal como en una partícula de núcleo-cubierta. Por ejemplo, pueden usarse partículas de núcleo de Ag/cubierta de Au, como las que se describen en *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 7961, o partículas de núcleo de Au/cubierta de Ag, o cualquier combinación núcleo-cubierta que implique metales activos para DRPS. En la presente invención se incluyen otras combinaciones adecuadas para su uso en partículas de núcleo-cubierta, tales como coloides de sílice/alúmina funcionalizados con nanopartícula de Au o de Ag, coloides de TiO<sub>2</sub> funcionalizados con Au o Ag, nanopartículas de Au cubiertas con nanopartículas de Au (véase, por ejemplo, Mucic, et al., *J. Am. Chem. Soc.* 1998, 120, 12674), coloides de TiO<sub>2</sub> cubiertos con nanopartículas de Au, partículas que tienen un núcleo de Si con una cubierta metálica ("nanocubiertas"), tales como coloides de SiO<sub>2</sub> cubiertos con plata o coloides de SiO<sub>2</sub> cubiertos con oro. (Véase, por ejemplo, Jackson, et al., 2004 *Proc Natl Acad Sci USA*. 101(52):17930-5; Talley, et al., *Nano Letters* (2005)). También pueden usarse nanopartículas huecas, tales como nanoesferas huecas y nanocristales huecos, en los nanomarcadores de DRPS.

Los expertos en la materia reconocerán que pueden formarse nanomarcadores de DRPS sobre otras partículas no activas para DRPS. Por ejemplo, las nanopartículas metálicas activas para DRPS pueden inmovilizarse sobre una partícula de sílice. Pueden introducirse indicadores y la partícula resultante puede encapsularse en sílice.

Cada nanomarcador de DRPS se codifica con un único indicador 16, que comprende una molécula orgánica o inorgánica en la superficie de contacto entre el núcleo de nanopartícula y la cubierta de vidrio u otro encapsulante adecuado. Este enfoque para los marcadores de detección aprovecha las fortalezas de la dispersión Raman como una herramienta de espectroscopía molecular de alta resolución y las potenciaciones asociadas a DRPS, pasando por alto al mismo tiempo las deficiencias que con frecuencia se encuentran cuando se fabrican sustratos de DRPS independientes, tales como la reproducibilidad difícil y la falta de selectividad. El indicador único 16 podría comprender combinaciones de molécula (proporcionando un espectro más complejo). Pueden fabricarse diferentes marcadores variando la relación de dos (o más) indicadores. Los nanomarcadores de DRPS presentan espectros intensos (factores de potenciación de más de 10<sup>6</sup>) con las longitudes de onda de excitación de 633 y 785 nm que son excelentes para evitar la fluorescencia de fondo intrínseca en muestras biológicas tales como sangre completa y en matrices como vidrio y plástico. El recubrimiento de sílice, que es esencialmente inactivo para DRPS, estabiliza las partículas contra la agregación, evita que el indicador difunda, evita la adsorción competitiva de especies no deseadas y proporciona una superficie excepcionalmente bien establecida con la que pueden conjugarse biomoléculas para el desarrollo de bioensayos (Aslam y Dent (1998) *Bioconjugation: Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences*. Grove's Dictionaries Inc, Nueva York, NY). En otras realizaciones, pueden usarse encapsulantes con cierta actividad de DRPS (y restarlos del espectro de Raman), siempre que no interfieran con el espectro de la molécula indicadora.

Hay disponibles múltiples aromas únicos de marcadores. La Fig. 2 muestra un gráfico 18 de los espectros de cinco marcadores de DRPS únicos, con características claramente diferenciadas, que pueden utilizarse para un ensayo multiplexado. En un ensayo multiplexado, se obtendrá un solo espectro y será necesario separar cuantitativamente ese espectro en sus componentes. Para separar los espectros y la cuantificación de los componentes individuales, puede usarse un paquete de software comercial potenciado para realizar un análisis lineal de mínimos cuadrados usando espectros puros de cada marcador como patrón.

Las características únicas de un marcador de DRPS como se ha descrito anteriormente hacen que las partículas sean particularmente adecuadas para su uso como marcadores indicadores o indicadores para todos y cada uno de los tipos de ensayos biológicos, químicos o de diagnóstico. A continuación se presenta una descripción no exclusiva de diversos tipos de ensayos que pueden implementarse con marcadores de DRPS. La siguiente descripción contiene solo una lista representativa de ensayos adecuados para la implementación con marcadores de DRPS y no pretende limitar el alcance de la presente invención. Los expertos en la materia apreciarán fácilmente que pueden implementarse muchos otros tipos de ensayos utilizando nanomarcadores de DRPS como marcadores indicadores o indicadores.

**II. EJEMPLOS DE ENSAYOS.**

**Inmunoensayo competitivo**

5 Un ensayo de inmunoensayo aprovecha la unión específica de un anticuerpo a su antígeno. Con frecuencia se usan anticuerpos monoclonales ya que por lo general solo se unen a un sitio de una molécula particular y, por tanto, proporcionan un ensayo más específico y preciso, que se confunde con menos facilidad por la presencia de otras moléculas. Los anticuerpos seleccionados deben tener una afinidad alta por el antígeno (si hay un antígeno disponible, debe unirse al anticuerpo una proporción muy alta).

10 Puede medirse la presencia tanto de antígeno como de anticuerpos. Por ejemplo, cuando se detecta infección se mide la presencia de anticuerpos contra el patógeno. Para medir hormonas tales como la insulina, la insulina actúa como el antígeno.

15 Para obtener resultados numéricos, la respuesta del fluido que se mide debe compararse con patrones de una concentración conocida. Esto por lo general se hace a través del trazado de una curva patrón en un gráfico, después, se examina la posición de la curva en la respuesta a la muestra desconocida y, por tanto, se encuentra la cantidad de la muestra desconocida. La detección de la cantidad o presencia de un anticuerpo o antígeno puede conseguirse mediante una diversidad de métodos. Por ejemplo, el anticuerpo o el antígeno pueden conjugarse, o marcarse de otro modo, con un nanomarcador de DRPS. El espectro de Raman de la molécula indicadora asociada al nanomarcador de DRPS puede detectarse como se ha descrito anteriormente.

25 En un inmunoensayo competitivo, el antígeno en la muestra desconocida compite con el antígeno marcado para unirse con los anticuerpos. Después, se mide la cantidad de antígeno marcado unido al sitio del anticuerpo. En este método, la respuesta será inversamente proporcional a la concentración de antígeno en la muestra desconocida. Esto se debe a que cuanto mayor era la respuesta, menos antígeno en la muestra desconocida había disponible para competir con el antígeno marcado. El antígeno puede estar marcado con un nanomarcador de DRPS.

**Inmunoensayo de tipo sándwich**

30 En inmunoensayos de tipo "sándwich", también denominados ensayos no competitivos, el antígeno en la muestra desconocida se une al sitio del anticuerpo, después, el anticuerpo marcado se une al antígeno. El anticuerpo puede estar marcado con uno o más nanomarcadores de DRPS. Después, se mide la cantidad de anticuerpo marcado en el sitio. A diferencia del método competitivo, los resultados del método no competitivo serán directamente proporcionales a la concentración del antígeno. Esto se debe a que el anticuerpo marcado con nanomarcador de DRPS no se unirá si el antígeno no está presente en la muestra desconocida.

40 Los inmunoensayos pueden ser homogéneos o heterogéneos. Un inmunoensayo heterogéneo requerirá una etapa de lavado adicional para retirar el antígeno o anticuerpo no unido del sitio. Los inmunoensayos homogéneos, también conocidos como ensayos sin lavado, no tienen etapa de lavado y la detección tiene lugar en presencia de antígeno o anticuerpo no unido. Debido a que los ensayos homogéneos no requieren una etapa de lavado, normalmente son más rápidos y fáciles de realizar. Los ensayos homogéneos pueden ser menos precisos o menos fáciles de leer debido a la presencia de antígeno o anticuerpo no unido.

**Inmunoensayo enzimático**

50 Un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, o ELISA, es una técnica bioquímica utilizada principalmente en inmunología para detectar la presencia de un anticuerpo o un antígeno en una muestra. Usa dos anticuerpos. Un anticuerpo es específico para el antígeno. El otro reacciona a complejos antígeno-anticuerpo y se acopla a una enzima. Este segundo anticuerpo, que representa "ligado a enzimas" en el nombre del ensayo, puede conjugarse o unirse de otro modo a un nanomarcador de DRPS para producir una señal detectable. Debido a que el ELISA puede realizarse para evaluar la presencia de antígeno o la presencia de anticuerpo en una muestra, es una herramienta útil tanto para determinar las concentraciones de anticuerpo en suero (tal como con el ensayo del VIH, Virus de Inmunodeficiencia Humana, o el Virus del Nilo Occidental) como también para detectar la presencia de antígeno. ELISA tiene variaciones directas e indirectas. También se conocen variaciones de tipo sándwich y competitiva del ELISA básico. Todo puede implementarse con nanomarcadores de DRPS como la modalidad de detección/indicador.

**Ensayo de aglutinación de látex**

60 Un ensayo de aglutinación de látex normal incluye proporcionar un sistema reactivo que tenga más de una partícula que tenga la capacidad de formar agregados de múltiples partículas y que tenga en su superficie o superficies un ligando que sea igual o diferente del ligando sospechoso de estar presente en la muestra. Al menos una de las partículas puede ser un nanomarcador de DRPS. El sistema reactivo también incluye una cantidad de receptor que es específico tanto para el ligando en la muestra como para el ligando que se encuentra sobre las partículas. La cantidad de receptor debería ser suficiente para estabilizar las partículas.

Los métodos normales de aglutinación de látex incluyen adicionalmente formar una mezcla de ensayo poniendo en contacto el sistema reactivo con la muestra y hacer pasar la mezcla de ensayo a través de un filtro que tiene aberturas que son más grandes que las partículas pero más pequeñas que los agregados, produciendo de este modo un filtrado. Cualquier nanomarcador de DRPS unido en el filtrado o que pase a través del filtro puede detectarse entonces por la presencia o ausencia de partículas que llevan ligando. La ausencia de ligando en la muestra se confirma por la presencia de partículas que llevan ligando en el filtrado, mientras que la presencia de ligando en la muestra se confirma por la ausencia de partículas que llevan ligando en el filtrado.

#### 10 **Ensayos de proteína-proteína y proteína-ligando**

Es posible una amplia diversidad de ensayos basados en proteínas que no hacen uso de anticuerpos. Por ejemplo, los ensayos de proteína-proteína y proteína-ligando son extraordinariamente comunes en el descubrimiento de fármacos y el desarrollo de fármacos, y en todo el proceso hasta la fabricación del fármaco. Pueden usarse fácilmente nanomarcadores de DRPS en estos tipos de ensayos, en una diversidad de formatos, incluyendo, pero sin limitación, modos de partícula-partícula y de partícula-superficie.

#### **Electroforesis en gel**

20 La electroforesis en gel es un método de ensayo de separación que separa macromoléculas, normalmente ácidos nucleicos o proteínas, en función del tamaño, la carga eléctrica y otras propiedades físicas. Un gel es un coloide en forma sólida. El término electroforesis describe la migración de partículas cargadas bajo la influencia de un campo eléctrico. Electro se refiere a la energía de la electricidad. Foesis, del verbo griego *phoros*, significa "llevar a través". Por tanto, electroforesis en gel se refiere a una técnica en la que las moléculas son forzadas a través de una extensión de gel, motivadas por una corriente eléctrica. Los electrodos activados en cada extremo del gel proporcionan la fuerza impulsora. Las propiedades de una molécula determinan qué tan rápido un campo eléctrico puede mover la molécula a través de un medio gelatinoso.

30 Muchas moléculas biológicas importantes, tales como aminoácidos, péptidos, proteínas, nucleótidos y ácidos nucleicos, poseen grupos ionizables y, por tanto, a cualquier pH dado, existen en solución como especies cargadas eléctricamente, ya sea como cationes o aniones. En función de la naturaleza de la carga neta, las partículas cargadas migrarán al cátodo o al ánodo.

35 La electroforesis en gel es una técnica de separación. Después de que se desarrolla la electroforesis, cuando las moléculas casi han alcanzado el cátodo o el ánodo, las moléculas en el gel se tiñen tradicionalmente para hacerlas visibles. Sin embargo, pueden unirse o conjugarse nanomarcadores de DRPS para seleccionar moléculas separadas con esta técnica para proporcionar una modalidad de detección alternativa. Normalmente, la electroforesis en gel va seguida de una rutina de detección específica, tal como las técnicas de transferencia que se describen inmediatamente a continuación.

40

#### **Transferencia de Western**

45 Una transferencia western se usa para detectar una molécula grande, normalmente proteína en una muestra dada de homogeneizado o extracto de tejido. Se usa electroforesis en gel u otra técnica de separación adecuada para separar las proteínas nativas por forma y/o tamaño. Después, las proteínas se transfieren fuera del gel y sobre una membrana (normalmente nitrocelulosa o PVDF). Posteriormente, los investigadores pueden examinar el tamaño, el procesamiento o la cantidad de proteína en una muestra dada y comparar varios grupos.

50 Durante el proceso de detección, la membrana es "sonda" para la proteína de interés con un anticuerpo modificado. Tradicionalmente, el anticuerpo modificado está unido a una enzima indicadora, que cuando se expone a un sustrato apropiado provoca una reacción colorimétrica y produce un color. Sin embargo, el anticuerpo modificado puede unirse o conjugarse con un nanomarcador de DRPS que puede detectarse a través de un espectro de Raman como se ha descrito anteriormente. Por una diversidad de razones, la etapa de detección tradicionalmente tiene lugar en un proceso en dos etapas, aunque ahora hay métodos de detección en una etapa disponibles para determinadas aplicaciones. Los nanomarcadores de DRPS pueden ser medios de detección adecuados en cualquier caso.

60 Por lo general, las sondas no unidas se retiran por lavado y entonces la transferencia Western está lista para la detección de las sondas que están marcadas y unidas a la proteína de interés. En términos prácticos, no todas las transferencias Western revelan proteínas solo en una banda en una membrana. Tradicionalmente, se tomaron aproximaciones de tamaño comparando las bandas teñidas con la del marcador o la escalera cargados durante la electroforesis. Se ha usado medición colorimétrica para evaluar la intensidad de una mancha de transferencia tradicional. Todas las mediciones tradicionales pueden potenciarse usando nanomarcadores de DRPS como indicadores y examinando la calidad e intensidad del espectro de DRPS obtenido como se ha descrito anteriormente.

65

**Transferencia Southern**

Una transferencia Southern se usa habitualmente en biología molecular para verificar la presencia de una secuencia de ADN en una muestra de ADN. La transferencia Southern generalmente combina electroforesis en gel de agarosa para la separación por tamaño de ADN con métodos para transferir el ADN separado por tamaño a una membrana de filtro para la hibridación con sonda. El método lleva el nombre de su inventor, el biólogo británico Edwin Southern. La sonda puede incluir un nanomarcador de DRPS para potenciar las capacidades de detección.

Las etapas incluidas en la preparación y el examen de una transferencia Southern generalmente incluyen cortar cadenas de ADN de peso molecular alto en fragmentos más pequeños con endonucleasas de restricción u otro método. Después, los fragmentos de ADN se separan por tamaño mediante electroforesis en un gel de agarosa. Si algunos de los fragmentos de ADN son mayores de 15 kb, el gel puede tratarse con un ácido, tal como HCl diluido, que depura los fragmentos de ADN, rompiendo el ADN en trozos más pequeños, lo que permite una transferencia más eficiente del gel a la membrana.

Una lámina de membrana de nitrocelulosa (o, como alternativa, nylon) se pone en contacto con el gel. Se aplica presión de manera uniforme a la membrana para garantizar un contacto bueno y uniforme entre el gel y la membrana. Después se usa transferencia de tampón por acción capilar para mover el ADN del gel a la membrana; las interacciones de intercambio iónico unen el ADN a la membrana debido a la carga negativa del ADN y la carga positiva de la membrana.

Después, la membrana puede hornearse, (en el caso de la nitrocelulosa) o exponerse a radiación ultravioleta (nylon) para reticular de manera permanente y covalente el ADN a la membrana.

Después, la membrana se expone a una sonda de hibridación, normalmente un único fragmento de ADN con una secuencia específica cuya presencia en el ADN objetivo ha de determinarse. En algunos casos, la sonda de hibridación puede prepararse a partir de ARN, en lugar de ADN. La sonda puede marcarse con nanomarcadores de DRPS de manera que se pueda detectar usando las técnicas descritas anteriormente. Tras la hibridación, la sonda en exceso se retira por lavado de la membrana y puede detectarse el espectro de Raman de los marcadores unidos.

**Transferencia Northern**

Una transferencia Northern es técnicamente similar a la transferencia Southern descrita anteriormente, sin embargo, el ARN, en lugar del ADN, es la sustancia que se analiza por electroforesis y detección con una sonda de hibridación. Una diferencia notable en el procedimiento (en comparación con la transferencia Southern) es la adición de formaldehído en el gel de agarosa, que actúa como un desnaturizante. Como en la transferencia Southern, la sonda de hibridación puede prepararse a partir de ADN o ARN. La sonda de hibridación puede incluir marcadores de nanomarcadores de DRPS.

En ocasiones se usa una variante del procedimiento conocida como transferencia Northern inversa. En este procedimiento, el ácido nucleico sustrato (el que está fijado a la membrana) es una colección de fragmentos de ADN aislados y la sonda es ARN extraído de un tejido y marcado. Como se ha descrito anteriormente, la sonda puede marcarse con uno o más nanomarcadores de DRPS. Se conocen otras técnicas de transferencia o están en desarrollo. Es probable que todo se pueda implementar con nanomarcadores de DRPS unidos a la sonda de detección.

**Cromatografía**

Cromatografía es el término colectivo para una familia de técnicas de laboratorio para la separación de mezclas. La cromatografía implica hacer pasar una mezcla disuelta en una "fase móvil" a través de una fase estacionaria, que separa el analito que se ha de medir de otras moléculas en la mezcla y permite aislarlo. Se emplean habitualmente numerosos tipos de cromatografía incluyendo, pero sin limitación, los siguientes: Cromatografía en columna, cromatografía plana, cromatografía en papel, cromatografía en capa fina, cromatografía de gases, cromatografía de líquidos, cromatografía de fluido supercrítico, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de afinidad, cromatografía de fase inversa, cromatografía bidimensional, cromatografía de gases de pirólisis, cromatografía líquida de proteína rápida, cromatografía a contracorriente y otras.

La cromatografía puede ser preparativa o analítica. La cromatografía preparativa busca separar los componentes de una mezcla para su uso posterior (y, por tanto, es una forma de purificación). La cromatografía analítica normalmente funciona con cantidades más pequeñas de material y busca medir las proporciones relativas de analitos en una mezcla. Las dos no son mutuamente excluyentes. En cualquier caso, los nanomarcadores de DRPS pueden unirse a una sonda para interrogar a un analito, o unirse directamente a un analito. Después, los nanomarcadores de DRPS pueden detectarse usando las técnicas descritas anteriormente.

**Espectrometría de masas**

La espectrometría de masas es una técnica analítica utilizada para medir la relación masa-a-carga de iones. Más



generalmente se usa para encontrar la composición de una muestra física generando un espectro de masas que representa las masas de los componentes de la muestra. La espectrometría de masas es un método emergente importante para la caracterización de proteínas y otras moléculas grandes. Los dos métodos principales para la ionización de proteínas enteras son la ionización por electronebulización (IEN) y la desorción/ionización por láser asistida por matriz (DILAM). De acuerdo con el rendimiento y el intervalo de masas de los espectrómetros de masas disponibles, se usan dos enfoques para caracterizar las proteínas. En la primera, las proteínas intactas se ionizan mediante cualquiera de las dos técnicas descritas anteriormente y después se introducen en un analizador de masas. En el segundo, las proteínas se digieren enzimáticamente en péptidos más pequeños usando un agente tal como la tripsina o la pepsina. También se usan otros agentes de digestión proteolíticos. La colección de productos peptídicos se introduce después en el analizador de masas. Esto con frecuencia se conoce como el enfoque "de abajo hacia arriba" del análisis de proteínas.

Las proteínas de interés para los investigadores biológicos por lo general forman parte de una mezcla muy compleja de otras proteínas y moléculas que coexisten en el medio biológico. Esto presenta dos problemas importantes. En primer lugar, las dos técnicas de ionización utilizadas para moléculas grandes solo funcionan bien cuando la mezcla contiene cantidades aproximadamente iguales de constituyentes, mientras que en muestras biológicas, diferentes proteínas tienden a estar presentes en cantidades muy diferentes. Si una mezcla de este tipo se ioniza usando electronebulización o DILAM, las especies más abundantes tienen una tendencia a "ahogar" las señales con respecto a las menos abundantes. El segundo problema es que el espectro de masas de una mezcla compleja es muy difícil de interpretar debido al número abrumador de componentes de la mezcla. Esto se ve exacerbado por el hecho de que la digestión enzimática de una proteína origina un gran número de productos peptídicos.

Varios métodos recientes permiten la cuantificación de proteínas mediante espectrometría de masas. Históricamente, se incorporan isótopos más pesados estables (por ejemplo, no radiactivos) de carbono (C13) o nitrógeno (N15) en una sola muestra, mientras que la otra se marca con los isótopos ligeros correspondientes (por ejemplo, C12 y N14). Los marcadores tradicionales asociados a la espectrometría de masas cuantitativa pueden ser diferentes aromas de nanomarcadores de DRPS. Las dos muestras normalmente se mezclan antes del análisis. Los péptidos derivados de las diferentes muestras pueden distinguirse debido a su diferencia de masa y pueden compararse cuantitativamente usando los métodos de interrogación de nanomarcadores de DRPS descritos anteriormente. El uso de nanomarcadores de DRPS puede potenciar de forma similar muchas otras técnicas de espectrometría de masas que no se describen en detalle en el presente documento.

### **Matrices de proteínas o chips**

Las matrices de proteínas son sistemas de ensayo de unión a ligando en fase sólida que usan proteínas inmovilizadas sobre superficies que incluyen vidrio, membranas, pocillos de microtitulación, placas de espectrómetro de masas y perlas u otras partículas. Los ensayos son altamente paralelos (multiplexados) y con frecuencia están miniaturizados (tales como micromatrices, chips de proteínas). Sus ventajas incluyen ser rápidos y automatizables, susceptibles de alta sensibilidad, económicos en cuanto a reactivos y proporcionan una gran cantidad de datos para un único experimento. El soporte bioinformático es importante; la manipulación de datos exige un software sofisticado y un análisis de comparación de datos. Uno de los principales formatos es la matriz de captura, en la que los reactivos de unión a ligando, que por lo general son anticuerpos, pero también pueden ser armazones de proteínas, péptidos o aptámeros de ácido nucleico alternativos, se usan para detectar moléculas objetivo en mezclas tales como extractos de plasma o tejidos. En el diagnóstico, pueden usarse matrices de captura para realizar múltiples inmunoensayos en paralelo, sometiendo a ensayo varios analitos en sueros individuales, por ejemplo, y sometiendo a ensayo muchas muestras de suero simultáneamente. En proteómica, las matrices de captura se usarán para cuantificar y comparar los niveles de proteínas en diferentes muestras con y sin enfermedad, es decir, perfiles de expresión de proteínas, y en esto las matrices de proteínas pueden desafiar la tecnología 2DE. Se usan proteínas distintas de enlazadores de ligando específicos en el formato de matriz para detecciones de interacción funcional *in vitro* tales como proteína-proteína, proteína-ADN, proteína-fármaco, receptor-ligando, enzima-sustrato, etc. También pueden usarse para correlacionar los cambios polimórficos resultantes de PNU con función proteínica. Los propios reactivos de captura deberán seleccionarse y detectarse contra muchas proteínas, lo que también puede hacerse en un formato de matriz múltiple contra múltiples objetivos de proteínas.

Por tanto, en términos generales, existen al menos cuatro áreas principales donde se aplican matrices de proteínas, cada una de las cuales requiere formatos y métodos de lectura apropiados. Las áreas amplias incluyen;

Diagnóstico: detección de antígenos y anticuerpos en muestras de sangre; realización de perfiles de sueros para descubrir nuevos marcadores de enfermedades; control ambiental y alimentario.

Proteómica: realización de perfiles de expresión de proteínas; matrices específicas de órganos y enfermedades.

Aislamiento de miembros individuales de bibliotecas de visualización para su posterior expresión o manipulación: selección de anticuerpos y armazones de proteínas entre bibliotecas de visualización de fagos o ribosomas para su uso en matrices de captura.

Análisis funcional de proteínas: interacciones proteína-proteína; propiedades de unión a ligando de receptores; actividades enzimáticas; reactividad cruzada y especificidad de anticuerpos, cartografiado de epítopos.

5 Para la construcción de matrices, las fuentes de proteínas incluyen sistemas de expresión basados en células para proteínas recombinantes, purificación a partir de fuentes naturales, producción *in vitro* mediante sistemas de traducción sin células y métodos de síntesis para péptidos. Muchos de estos métodos pueden automatizarse para la producción de alto rendimiento. Para las matrices de captura y el análisis de función de proteínas, es importante que las proteínas se plieguen correctamente y sean funcionales; éste no siempre es el caso, por ejemplo, cuando las proteínas recombinantes se extraen de bacterias en condiciones desnaturizantes. No obstante, matrices de  
10 proteínas desnaturizadas son útiles en la detección de anticuerpos para la reactividad cruzada, la identificación de autoanticuerpos y la selección de proteínas de unión a ligandos.

Se usan tradicionalmente métodos de marcado y detección por fluorescencia con matrices de proteínas. Por ejemplo, para la visualización diferencial, pueden sondearse matrices de captura (por ejemplo, anticuerpo) con proteínas marcadas con fluorescencia de dos estados celulares diferentes, en las que se conjugan lisados celulares directamente con fluoróforos diferentes y se mezclan. Podría implementarse una estrategia de detección similar con nanomarcadores de DRPS como modalidad de detección. Las proteínas de cada estado celular, por ejemplo, podrían marcarse con distintos aromas de marcadores de DRPS que después se detectan como se ha descrito anteriormente. Las tecnologías de micromatrices relacionadas que pueden implementarse usando nanomarcadores de DRPS incluyen, pero sin limitación, micromatrices de ADN, micromatrices de anticuerpos, micromatrices de tejidos, micromatrices de células y micromatrices de compuestos químicos.

### Citometría de flujo

25 La citometría de flujo es una técnica para contar, examinar y clasificar partículas microscópicas suspendidas en una corriente de fluido. Permite el análisis multiparamétrico simultáneo de las características físicas y/o químicas de células individuales que fluyen a través de un aparato de detección óptico y/o electrónico. Un citómetro de flujo normal incluye una fuente de luz, generalmente una fuente de luz láser, dirigida al flujo de citometría.

30 Tradicionalmente, cada partícula suspendida que pasa a través del haz dispersa la luz de alguna manera y los productos químicos fluorescentes descubiertos en la partícula o fijados a la partícula pueden ser excitados para emitir luz a una frecuencia inferior a la de la fuente de luz. Los detectores recogen esta combinación de luz dispersa y fluorescente y mediante el análisis de las fluctuaciones de brillo en cada detector (uno para cada pico de emisión fluorescente) es posible entonces extrapolar diversos tipos de información acerca de la estructura física y química de cada partícula individual. Los nanomarcadores de DRPS pueden estar asociados a las partículas suspendidas en la corriente de fluido. En este caso, pueden realizarse mediciones tradicionales de citometría de flujo junto con la interrogación complementaria de los marcadores de DRPS como se ha descrito anteriormente. Los nanomarcadores de DRPS pueden usarse de manera similar para potenciar la clasificación de células basada en citometría de flujo y técnicas relacionadas similares. Los practicantes expertos reconocerán que los nanomarcadores de DRPS pueden usarse con una diversidad de otras técnicas de citometría, incluyendo la citometría de detección por láser de microvolumen. Además, los marcadores de DRPS pueden acoplarse con métodos de clasificación y/o separación de células no basados en citometría. Por ejemplo, pueden clasificarse células individuales en dispositivos generados litográficamente que controlan la dirección y la velocidad del flujo.

### Ensayos de microfluidos

Una amplia diversidad de ensayos emplea microfluidos para controlar y/o miniaturizar las corrientes que fluyen. Pueden incorporarse nanomarcadores de DRPS en los ensayos de microfluidos en una diversidad de medios. En un ejemplo, se introducen nanomarcadores de DRPS en una muestra usando microfluidos. En otro, una muestra se separa en componentes mediante métodos de microfluidos, con nanomarcadores de DRPS añadidos a uno o más componentes. Pueden usarse microfluidos para separar especies con nanomarcadores de DRPS unidos a ellas de especies sin ellos. Dichas especies pueden ser moléculas, polímeros, células o partículas. Por ejemplo, puede realizarse un inmunoensayo de tipo sándwich usando una perla de látex con un anticuerpo de captura y un nanomarcador de DRPS con un anticuerpo de detección. El dispositivo de microfluído puede separar las perlas de látex que tienen marcadores de DRPS unidos (en virtud de la presencia de antígeno) de aquellas que no tienen marcadores de DRPS unidos. Además, los complejos de perla-nanomarcador separados pueden concentrarse usando microfluidos.

### Otros ensayos ópticos

60 Pueden usarse nanomarcadores de DRPS junto con otras técnicas ópticas que se usan en biología, química, ingeniería, ciencia de materiales, diagnóstico y/o medicina. Por ejemplo, se usan pinzas ópticas para atrapar y/o estudiar una o más especies (partículas, células, objetos). También pueden capturarse nanomarcadores de DRPS mediante pinzas; como alternativa, pueden interrogarse nanomarcadores de DRPS cuando están unidos a especies  
65 que se han atrapado mediante pinzas ópticas. Análogamente, pueden detectarse nanomarcadores de DRPS mediante una diversidad de técnicas de fotones múltiples en un formato de ensayo. Por ejemplo, puede usarse

hiperRaman potenciada en superficie para desarrollar ensayos ópticos sin fondo usando nanomarcadores de DRPS. En este caso, se podrían usar dos fotones de 1500 nm y detectar el fotón desplazado por Raman a 750 nm. Como alternativa, puede ser posible usar métodos de detección coherentes (por ejemplo, CARS) en los ensayos.

5 Además, puede usarse una diversidad de otras técnicas ópticas junto con DRPS. Por ejemplo, puede medirse la dispersión de la luz a partir de marcadores de DRPS como una exploración para detectar la presencia o ausencia de partículas. Después, pueden realizarse mediciones de DRPS para determinar la identidad de la partícula. Un método de este tipo podría ser muy útil en la exploración de alto rendimiento, ya que permite determinar rápidamente la presencia de partículas. Análogamente, este método puede usarse en flujo lateral u otros tipos de ensayos  
10 inmunocromatográficos, donde la detección de partículas se realiza en primer lugar visualmente basándose en luz dispersa y seguido de una lectura de DRPS basada en instrumentos para cuantificar el número y los tipos de nanomarcadores de DRPS.

### **Ensayos de proximidad de fondo reducido**

15 Un método de ensayo novedoso que implica partículas activas para DRPS (incluyendo, pero sin limitación, nanomarcadores de DRPS) se basa en el aprovechamiento de la emisión de fotones de Raman a frecuencias particulares para estimular otros procesos. En muchos formatos de bioensayo, la sensibilidad del ensayo en última instancia se ve limitada por la señal de fondo debido a la unión no específica y/u otros factores. En consecuencia,  
20 son muy ventajosos formatos de ensayo que sean capaces de producir señales "sin fondo" o de fondo reducido. Un buen ejemplo de esto implica procesos fluorescentes de dos fotones, donde un ensayo utiliza dos fotones de longitud de onda de 1000 nm para estimular un proceso de emisión detectado a longitudes de onda superiores a 500 nm. Puesto que no entran fotones de 500 nm se evita la posible fluorescencia de fondo a la frecuencia de detección en muestras biológicas, cristalería, etc.

25 Otro tipo de ensayo útil se basa en la generación de señal solo cuando se juntan dos o más componentes. Existe una diversidad de estos ensayos, en general denominados ensayos de proximidad. Por ejemplo, en los ensayos de complementación, una proteína fluorescente se divide en dos partes y cada parte se une a una molécula diferente (por ejemplo, A y B). Cuando A y B están separadas, la fluorescencia no es posible. Sin embargo, cuando A y B  
30 están muy cerca (es decir, unidas entre sí), los fragmentos de la proteína fluorescente están lo suficientemente cerca como para volver a ensamblarse en una proteína funcional y la excitación óptica conduce a emisión. Por tanto, la detección de un fotón fluorescente se acopla a la formación del complejo A:B.

35 Un ensayo potencialmente más ventajoso incorpora los conceptos de ensayos de fondo reducido y de proximidad. Por ejemplo, la generación de un fotón detectable a una frecuencia donde no hay ruido de fondo como resultado de un evento de unión próximo. Los atributos plasmónicos de nanopartículas activas para DRPS como se describen en el presente documento permiten implementar un formato de ensayo de este tipo.

40 Se entiende bien que la excitación de los plasmones de nanopartículas se acopla fuertemente a la actividad de DRPS. Los dos tipos más comunes de nanopartículas activas para DRPS son Au y Ag. Las partículas coloidales de Au esféricas normalmente presentan resonancias de plasmón en el intervalo de 520-560 nm, en función del diámetro, mientras que las nanopartículas de Ag esféricas pueden permitir resonancias en el intervalo de 400-  
45 450 nm, nuevamente en función del tamaño de partícula. Además, es bien sabido que la potenciación de la intensidad de Raman asociada a DRPS aumenta significativamente cuando el plasmón implica dos o más partículas en estrecha proximidad (por ejemplo, dímeros, trímeros o agregados). Se describen en detalle a continuación ejemplos específicos de partículas activas para DRPS con respuestas de plasmón ajustables.

50 Por ejemplo, se ha demostrado que las nanovarillas de oro con una relación de aspecto de 1,5 a 10 tendrán máximos de absorción correspondientes de 600 a 1300 nm (Nikoobakht, B; El-Sayed, MA. "Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method" *CHEMISTRY OF MATERIALS*, 15 (10): 1957-1962 20 de MAYO de 2003). De forma similar, se han cultivado nanovarillas de oro con relaciones de aspecto de hasta 23. (Gole, A; Murphy, CJ "Seed-mediated synthesis of gold nanorods: Role of the size and nature of the seed" *CHEMISTRY OF MATERIALS*, 16(19): 3633-3640 21 de SEP de 2004). También se ha demostrado que  
55 pueden cultivarse nanoprismas de plata a través de métodos de iluminación novedosos de manera que los nanoprismas resultantes tengan longitudes de borde de 38-120 nm y bandas de absorción que oscilen entre 470-1000 nm (Jin, RC; Cao, YC; Hao, EC; et al. "Controlling anisotropic nanoparticle growth through plasmon excitation" *NATURE*, 425 (6957): 487-490 2 de OCT de 2003). Además, se ha demostrado que pueden usarse métodos químicos en húmedo para la síntesis de prismas de oro con longitudes de borde de 100-300 nm y bandas de absorción superiores a 1200 nm (Millstone, JE; Metraux, GS; Mirkin, CA "Controlling the edge length of gold  
60 nanoprisms via a seed-mediated approach" *ADVANCED FUNCTIONAL MATERIALS*, 16 (9): 1209-1214 6 DE JUNIO DE 2006).

Pueden producirse y usarse nanocubos de plata como moldes de sacrificio para "nanocajas" de oro (Sun, YG; Xia, YN "Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles" *SCIENCE*, 298 (5601): 2176-2179 13 de DIC de  
65 2002). Existen métodos para ajustar la resonancia de plasmón de nanopartículas en el espectro visible (Sun, YG; Xia, YN "Gold and silver nanoparticles: A class of chromophores with colors tunable in the range from 400 to 750 nm"

ANALYST, 128 (6): 686-691 2003). Más recientemente, se ha demostrado la síntesis de nanobarras de plata y "nanoarroz", cuyas partículas tienen resonancias plasmónicas que se extienden hasta casi 900 nm (Wiley, BJ; Chen, YC; McLellan, JM; et al. "Synthesis and optical properties of silver nanobars and nanorice" NANO LETTERS, 7 (4): 1032-1036 ABR de 2007).

5 Se han usado métodos similares para crear partículas de oro huecas con máximos de absorción que variaban de 400-990 nm usando nanoesferas de plata como moldes de sacrificio (Alvarez-Puebla, RA; Ross, DJ; Nazri, GA; et al. "Surface-enhanced Raman scattering on nanoshells with tunable surface plasmon resonance" LANGMUIR, 21 (23): 10504-10508 8 de NOV de 2005). Se han producido cubiertas de oro huecas monodispersas pequeñas con  
10 máximos de absorción de aproximadamente 600 nm usando nanopartículas de cobalto como precursor (Schwartzberg, AM; Oshiro, TY; Zhang, JZ; et al. "Improving nanoproboscopes using surface-enhanced Raman scattering from 30-nm hollow gold particles" ANALYTICAL CHEMISTRY, 78(13): 4732-4736 1 de JUL de 2006). Se conocen métodos elegantes para aplicar oro como recubrimiento sobre un núcleo de sílice, produciendo resonancias de plasmón intensas que se extienden desde el rojo lejano hasta 2200 nm (Oldenburg, SJ; Jackson, JB; Westcott, SL; et al. "Infrared extinction properties of gold nanoshells" APPLIED PHYSICS LETTERS, 75 (19): 2897-2899 8 de NOV de 1999). Se conocen o se desarrollarán en el futuro otros métodos para producir nanopartículas activas para DRPS con respuestas de plasmón ajustables. Algunos o todos estos tipos de partículas pueden ser útiles para implementar los espectros y ensayos novedosos que se describen en el presente documento.

## 20 Descripción del ensayo:

Puede diseñarse un ensayo de proximidad activo para DRPS con partículas que tengan características de plasmón adecuadas. Los ejemplos de previsión que se describen a continuación no son limitantes. Un ejemplo representativo no limitante de un ensayo de proximidad 30 se representa esquemáticamente en la Fig. 3. Este ensayo  
25 representativo incluye una primera partícula activa para DRPS 32 con un máximo de plasmón superficial a 600 nm o  $16.666 \text{ cm}^{-1}$ . Adsorbida en ella o en proximidad muy estrecha hay una molécula 34 con una banda de Raman intensa a  $1666 \text{ cm}^{-1}$ . La partícula/molécula se irradia usando una luz 36 monocromática de 600 nm de un láser 37. El fotón 38 desplazado por Stokes emitido desde este sistema en un experimento de Raman será a  $16.666 - 1.666$  o  $15.000 \text{ cm}^{-1}$ , que es equivalente a una longitud de onda de 666 nm. La intensidad del fotón 38 emitido será superior a en un experimento de Raman normal en virtud del efecto de DRPS de una única partícula: en función de la forma y la composición, podrían esperarse potenciaciones de  $10^4$  a  $10^7$ .

El ensayo 30 representativo también incluye una segunda partícula 40 activa para DRPS, que se coloca adyacente a la primera, con la molécula 34 intercalada en medio. La segunda partícula tiene un pico de plasmón de superficie afilada a 666 nm. La excitación láser a 600 nm no excita la DRPS de esta segunda partícula. Sin embargo, el fotón 38 desplazado por Raman de la primera partícula 32 sí, puesto que corresponde precisamente al máximo de absorbancia. El fotón 42 desplazado por Stokes emitido desde la segunda partícula (porque también está en estrecha proximidad a la molécula 34) ocurrirá a  $15.000 - 1.666$  o  $13.334 \text{ cm}^{-1}$  o 750 nm. Por tanto, en este sistema, la excitación a una sola longitud de onda (600 nm) conduce a la emisión a dos longitudes de onda diferentes, 666 y  
40 750 nm, que corresponden a la diferencia entre la energía del fotón de entrada y una y dos veces la frecuencia vibracional, respectivamente. La emisión a 750 nm puede detectarse con un detector 44 y la señal detectada tendrá características de ruido de fondo reducido. Es importante tener en cuenta que la longitud de onda de excitación y la longitud de onda de emisión descritas anteriormente son ejemplos representativos y no limitantes solamente. Sin embargo, la relación entre la longitud de onda de excitación y la longitud de onda de emisión puede generalizarse.  
45 En particular, si el indicador utilizado posee un pico vibracional activo para DRPS a la energía  $v_1$ , la detección puede lograrse a una frecuencia  $L - (2v_1)$  donde L es la frecuencia de excitación del láser.

Pueden prepararse ensayos funcionales donde las dos nanopartículas tienen máximas de absorbancia separadas por cualquier cantidad adecuada. Las partículas que tienen máximos de absorbancia separados por aproximadamente  $200 \text{ cm}^{-1}$  y  $3500 \text{ cm}^{-1}$  son particularmente adecuadas para la implementación de ensayos de proximidad como se describen en el presente documento. Como se ha descrito en detalle anteriormente, pueden prepararse partículas que tengan máximos de absorbancia separados convenientemente y adaptados específicamente teniendo dos tipos de nanopartículas con diferentes formas. Por ejemplo, una en particular puede ser esférica y la otra no esférica. Como alternativa, la primera partícula puede ser sólida y la segunda hueca. La primera partícula puede ser de composición uniforme teniendo la segunda partícula una composición o estructura diferente tal como un núcleo y una cubierta. Las características de absorbancia de las partículas también pueden verse afectadas por los materiales seleccionados para cada partícula. Por ejemplo, una partícula puede fabricarse a partir de un único elemento metálico y la otra partícula a partir de una mezcla, aleación o metal diferente. Por ejemplo, una primera partícula puede ser de Au y la segunda de Ag. Cualquiera de las partículas puede ser una aleación o mezcla de Au, Ag u otros elementos, composiciones o materiales.  
60

Una forma conveniente de diseñar un ensayo tal como se describe con respecto a la Fig. 3 es realizar un ensayo de tipo sándwich usando ADN o proteínas. Por ejemplo, en un inmunoensayo de tipo sándwich, la primera partícula 32 puede recubrirse con un anticuerpo de captura (Ab) y la segunda partícula 40 puede recubrirse con un Ab de detección. Si cualquiera de los dos Ab se modifica con un indicador activo para DRPS (es decir, la molécula 34), cuando se forma un sándwich mediante la presencia de un antígeno, necesariamente llevará al indicador activo para  
65

DRPS entre las partículas. Como alternativa, pueden usarse partículas en las que parte de la superficie de las partículas activas para DRPS estén recubiertas con una molécula indicadora adsorbida y parte está recubierta con un Ab.

5 Es bien sabido que las secciones transversales de Raman, incluso con DRPS, son pequeñas y, por tanto, usando el ejemplo representativo analizado anteriormente, el número de fotones de 750 nm emitidos será pequeño en comparación con el número de fotones de 666 nm emitidos. No obstante, la señal de fondo a 750 nm será muy pequeña o cero en comparación con la que sería a 666 nm.

10 Además, el ensayo puede disponerse de manera que se maximice el número de fotones de 750 nm generados, de la siguiente manera. En lugar de introducir una mezcla de ambos tipos de partículas revestidas con Ab en una muestra que contiene un analito, en este ensayo puede ser ventajoso que el analito se una inicialmente al Ab asociado a la primera partícula. Después, la introducción de la segunda partícula conduce a la formación de sándwich, pero con la segunda partícula rodeando completamente a la primera. Esto es óptimo porque la primera partícula emitirá fotones de 666 nm alrededor de 4 pi esteradianos (es decir, en todo el espacio). Idealmente, que la segunda partícula rodee completamente a la primera partícula en tres dimensiones maximiza la probabilidad de que un evento de dispersión Raman genere un fotón a 750 nm.

20 En resumen, puede prepararse o implementarse un ensayo de proximidad novedoso como se ha descrito anteriormente. Es importante indicar que las características representativas de los fotones que se describen en el presente documento no son limitantes. Los niveles de energía y las características de onda de la energía detectada se determinarán mediante las características físicas de las partículas y el indicador y, como se ha descrito anteriormente, pueden ajustarse finamente fabricando partículas a partir de materiales seleccionados que tengan una forma, tamaño y estructura de superficie seleccionados. Por ejemplo, si una nanopartícula A de DRPS absorbe un fotón a  $13.000\text{ cm}^{-1}$  y emite un fotón de Raman a  $11.700\text{ cm}^{-1}$ , y la nanopartícula B de DRPS se excita a  $11.700\text{ cm}^{-1}$  (pero no a  $13.000\text{ cm}^{-1}$ ) y emite un fotón disperso a  $10.000\text{ cm}^{-1}$ , se podría en principio excitar una colección de partículas de A y B a  $13.000\text{ cm}^{-1}$  y detectar fotones solo a  $10.000\text{ cm}^{-1}$ . En la práctica, un fenómeno de este tipo se producirá a niveles detectables solo cuando las partículas sean dispersores eficientes, absorbedores eficientes y, mucho más importante, estén muy cerca una de la otra. Por tanto, pueden usarse pares de nanomarcadores de DRPS diseñados adecuadamente en una diversidad de ensayos de proximidad, donde la unión o desunión de la Especie 1 a la Especie 2 pueden detectarse mediante la aparición o pérdida de una señal de DRPS particular.

35 Otro tipo de ensayo de proximidad aprovecha el hecho de que las potenciaciones de campo electromagnético que impulsan la DRPS con frecuencia pueden ser órdenes de magnitud más grandes entre partículas espaciadas muy próximas entre sí que en partículas individuales. Por tanto, los niveles de detección pueden establecerse de manera que no se detecten señales de DRPS de partículas individuales, pero pueden detectarse señales de DRPS de partículas espaciadas muy próximas. En un caso de este tipo, la molécula detectada podría ser el indicador en la superficie de una o ambas partículas activas para DRPS, en cuyo caso el ensayo de proximidad produce un espectro más intenso (y, por tanto, detectable) del indicador. Como alternativa, los niveles de detección pueden ajustarse para que la DRPS de los indicadores en partículas individuales sea detectable y las partículas se aproximen estrechamente a una molécula entre las partículas, siendo un ejemplo un antígeno en un inmunoensayo de tipo sándwich. En un caso de este tipo, el espectro de DRPS cambiará del de los indicadores al de los indicadores más el del antígeno.

45 Todos estos tipos de ensayos de proximidad mencionados anteriormente pueden multiplexarse, es decir, el uso de múltiples indicadores en múltiples partículas permite detectar y/o cuantificar múltiples analitos.

50 Como alternativa, podrían usarse marcadores de DRPS en el contexto de un ensayo de UV-vis o de extinción. La inmovilización de nanomarcadores de DRPS en un dispositivo de longitud de trayectoria pequeña (por ejemplo, una célula de capa fina) puede realizarse mediante UV-vis, seguido de una interrogación por DRPS para la cuantificación.

### **Ensayos electroquímicos**

55 Pueden usarse nanomarcadores de DRPS junto con electrodos y métodos electroquímicos. Por ejemplo, podrían inmovilizarse nanomarcadores de DRPS en una superficie metálica. El número total de marcadores unidos podría determinarse mediante cambios en la capacitancia del electrodo, mientras que el número y la identidad de los marcadores podrían determinarse mediante interrogación óptica usando DRPS. En este caso, la capacitancia se usa para proporcionar confirmación en cuanto al número de partículas unidas. Como alternativa, podrían unirse nanomarcadores de DRPS a una superficie de electrodo a través de uno o más métodos descritos anteriormente (por ejemplo, un inmunoensayo). Después, el número y la identidad de los marcadores podrían determinarse mediante DRPS. Después, las partículas podrían oxidarse electroquímicamente para proporcionar una medida del contenido de metal. También pueden usarse otros métodos electroquímicos incluyendo, pero sin limitación, métodos potenciométricos, métodos culombimétricos y métodos voltimétricos.

**Ensayos gravimétricos y otros**

También pueden usarse nanomarcadores de DRPS en una diversidad de técnicas de detección de masa. Por ejemplo, puede usarse gravimetría de cristal de cuarzo para detectar la presencia de nanopartículas, seguida de interrogación por DRPS. Como alternativa, los sensores basados en MEMS más sensibles y/o los resonadores de cuarzo o metal que detectan masa mediante diferencias en cizalla, o mediante otros medios, pueden usarse para detectar la presencia de pequeños números de nanomarcadores de DRPS, con una identificación posterior mediante Raman.

Los ensayos electroquímicos y gravimétricos comprenden "métodos ortogonales" para detectar la presencia o ausencia o cuantificar el número total de nanomarcadores de DRPS. Aunque no proporcionan información espectral (y, por tanto, no pueden usarse para multiplexar), estos métodos podrían ser útiles (por ejemplo, para la detección, la cuantificación absoluta o para la eliminación de falsos positivos). Por ejemplo, podría desarrollarse un ensayo ultrasensible basado en la detección de un número muy pequeño de nanomarcadores de DRPS, tal vez incluso una única partícula. La detección paralela de esa partícula o partículas mediante un método no óptico aumenta significativamente el nivel de confianza de la medición.

Existe una diversidad de otros métodos de detección ortogonal, incluyendo, pero sin limitación, absorción atómica y emisión atómica, difracción de rayos X, dispersión de rayos X, dispersión de neutrones, microscopía electrónica, microscopio de fuerza atómica, microscopía de túnel de detección, otras microscopías de sonda barrida y fluorescencia de rayos X.

También pueden detectarse nanomarcadores de DRPS usando instrumentos distintos de los espectrómetros de Raman. Por tanto, los fluorímetros diseñados para leer fluorescencia también pueden detectar nanomarcadores de DRPS con indicadores ajustados para emitir fotones a las mismas longitudes de onda que la emisión de fluoróforos. De hecho, con los conjuntos de filtros apropiados, pueden detectarse nanomarcadores de DRPS con instrumentación muy económica.

**III. OTROS FORMATOS DE ENSAYO Y TÉCNICAS DE MARCADO.**

Pueden usarse nanomarcadores de DRPS como marcadores, etiquetas o modalidades de detección, o de otro modo, en otros tipos de ensayos no descritos específicamente en el presente documento. Por ejemplo, pueden usarse nanomarcadores de DRPS en ensayos tales como (pero sin limitación) los siguientes:

- electroforesis capilar,
- dielectroforesis,
- enfoque isoeléctrico,
- cualquier otro formato de ensayo.

Además, pueden usarse nanomarcadores de DRPS para implementar el marcaje de células o materiales antes de cualquier etapa de ensayo adicional, tal como separación. Los marcadores de DRPS pueden usarse en muchos casos sin preocuparse por la naturaleza de la separación u otras etapas de ensayo posteriores. Un ejemplo representativo y no exclusivo de marcaje inicial incluye aplicaciones tales como en la expresión génica, el marcaje de PCR multiplexado, la hibridación *in situ* por DRPS, la detección de patógenos multiplexados o incluso la PCR en tiempo real. Por ejemplo, pueden usarse marcadores de DRPS para marcar el ARN o el ADN del paciente para reemplazar los colorantes fluorescentes Cy5 y Cy3 conocidos en la expresión génica en micromatrices. En otro ejemplo representativo, pueden usarse cebadores de marcaje con marcadores de DRPS multiplexados para amplificar diversos ARN víricos y detectar simultáneamente patógenos víricos.

**Hibridación *in situ***

La hibridación *in situ* es una tecnología que utiliza una cadena de ADN o ARN complementaria marcada (es decir, sonda) para localizar un ADN (dentro de los cromosomas del núcleo) o ARN (dentro del citoplasma) específico en una porción o sección de tejido (*in situ*) o en el tejido completo (montaje completo de HIS). Esto es distinto de la inmunohistoquímica, que localiza proteínas en secciones de tejido.

Para la hibridación, por lo general se tratan células y tejidos de muestra para fijar los transcritos objetivo en su lugar y para aumentar el acceso de la sonda. La sonda se hibrida con la secuencia objetivo a temperatura elevada y después el exceso de sonda se retira por lavado. Pueden manipularse parámetros de la solución tales como la temperatura, la concentración de sal y/o detergente, para retirar cualquier hibridación no específica. Después, la sonda que se marcó se localiza y se cuantifica en el tejido.

Tradicionalmente, se radiomarcaron sondas con <sup>32</sup>P <sup>35</sup>S de <sup>3</sup>H, pero más recientemente se han desarrollado marcadores no radiactivos que en general son más versátiles. Los nanomarcadores de DRPS pueden ser uno de los marcadores alternativos que proporcionan una sensibilidad igual o mayor, producen resultados más rápidos en general y, también de forma importante, evitan la manipulación de materiales peligrosos.

**HIS por DRPS frente a HISF (hibridación in situ por fluorescencia)**

La llegada de colorantes fluorescentes para su uso como marcadores ha hecho posible visualizar múltiples sondas al mismo tiempo. El nanomarcador de DRPS como marcador proporciona aún más ventajas, tal como un mayor nivel de mutiplexidad y una mayor sensibilidad, y ha abierto nuevas posibilidades para investigar y diagnosticar enfermedades. Esto incluye, pero sin limitación: formar un diagnóstico, evaluar un pronóstico, evaluar la remisión de una enfermedad, tal como el cáncer, o identificar las especies patógenas y comparar sus genomas a partir de muestras pequeñas de tejido del paciente. Después, el tratamiento puede adaptarse específicamente.

**PCR in situ y RT-PCR in situ**

La hibridación *in situ* convencional tiene una limitación en cuanto al número de copias de una secuencia que pueden resolverse. Una forma de potenciar la resolución de esta técnica ha sido combinar la hibridación *in situ* con la técnica muy poderosa de la reacción en cadena de la polimerasa. Esto tiene el potencial de resolver una única copia de una secuencia génica o niveles bajos de ARNm citoplasmático. Ha demostrado ser particularmente útil como herramienta de diagnóstico para la detección e identificación de células infectadas con ADN vírico. La sonda puede incluir un nanomarcador de DRPS para potenciar las capacidades de detección.

**INSC (marcaje in situ cebado)**

El INSC es una forma alternativa a la hibridación *in situ* tradicional para la identificación de cromosomas en extensiones de metafase o núcleos de interfase. Este método proporciona detección rápida con menos ruido de fondo. El ADN desnaturalizado se hibrida con fragmentos de ADN cortos u oligonucleótidos diseñados. Después, se realiza una extensión del cebador con la polimerasa adecuada en presencia de nucleótidos marcados. El sitio marcado puede detectarse usando un anticuerpo conjugado con nanomarcador de DRPS adecuado.

**Amplificación de recombinasa polimerasa (ARP)**

La ARP es una técnica de amplificación de ADN que proporciona una ventaja sobre los otros métodos de amplificación de ADN. En la ARP, la amplificación isotérmica de fragmentos de ADN específicos se consigue mediante la unión de cebadores oligonucleotídicos opuestos al ADN molde y su extensión mediante una ADN polimerasa. El ensayo es rápido y sensible. Se requiere poco o ningún soporte físico para soportar y mantener el proceso de ARP, lo que lo hace ideal para aplicaciones de campo y de punto de atención. Pueden aplicarse nanomarcadores de DRPS en combinación con perlas magnéticas al ensayo para desarrollar un DRPS-ARP. En el ensayo, un cebador 5' biotinilado y un cebador 3' conjugado con marcador de DRPS se unirán al ADN objetivo específico. Después de la ARP, se añade la perla magnética recubierta con neutroavidina, después se tira hacia abajo de la perla y se adquiere la señal. El DRPS-ARP será un método de diagnóstico ultrasensible y rápido para identificar patógenos humanos, plantas de GMC y para cribado de bancos de sangre, etc.

**IV. TÉCNICAS DE SEPARACIÓN INDEPENDIENTES DE EJEMPLO.**

Algunos de los ensayos descritos anteriormente utilizan etapas de separación especializadas, tales como electroforesis en gel, antes de la detección de resultados de ensayo. Pueden realizarse muchos ensayos después de una separación independiente del analito de otros componentes, por ejemplo, una matriz biológica. Cualquier ensayo que incluya una etapa de separación puede potenciarse o realizarse potencialmente con nanomarcadores de DRPS fijados, incorporados en o asociados de otro modo a un componente del analito. Los métodos de separación independientes representativos además de los analizados específicamente anteriormente incluyen, pero sin limitación, los siguientes: filtración, centrifugación, filtración de flujo tangencial, fraccionamiento de flujo de campo, microfluidos, separación electrostática, filtración por gradiente de densidad, separación electroquímica, electroforesis capilar; separación de perlas magnéticas y otras técnicas de separación mecánicas, físicas, químicas, eléctricas o biológicas.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de producción de un espectro de dispersión Raman potenciada en superficie (DRPS) que comprende:  
proporcionar una primera nanopartícula activa para DRPS que absorberá un fotón a una primera longitud de onda y emitirá un fotón desplazado por Raman a una segunda longitud de onda, **caracterizado** adicionalmente por comprender las etapas de:
- 10 proporcionar una segunda nanopartícula activa para DRPS que absorberá un fotón a la segunda longitud de onda y emitirá un fotón desplazado por Raman a una tercera longitud de onda;  
acercar las nanopartículas activas para DRPS primera y segunda entre sí, en la que la primera nanopartícula activa para DRPS y la segunda nanopartícula activa para DRPS tienen formas diferentes; e iluminar la primera nanopartícula activa para DRPS a la primera longitud de onda provocando que la primera nanopartícula activa para DRPS emita un fotón desplazado por Raman a la segunda longitud de onda que es absorbida por la
- 15 segunda nanopartícula activa para DRPS provocando la emisión de un segundo fotón desplazado por Raman a la tercera longitud de onda.
- 20 2. El método de producción de un espectro de dispersión Raman potenciada en superficie (DRPS) de la reivindicación 1, en el que la primera nanopartícula activa para DRPS es esférica y la segunda nanopartícula activa para DRPS es no esférica.
- 25 3. El método de producción de un espectro de dispersión Raman potenciada en superficie (DRPS) de la reivindicación 1, en el que la primera nanopartícula activa para DRPS es sólida y la segunda nanopartícula activa para DRPS es hueca.
- 30 4. El método de producción de un espectro de dispersión Raman potenciada en superficie (DRPS) de la reivindicación 1, en el que la primera nanopartícula activa para DRPS es de composición uniforme y la segunda nanopartícula activa para DRPS tiene composiciones diferentes en un núcleo y una cubierta.
- 35 5. El método de producción de un espectro de dispersión Raman potenciada en superficie (DRPS) de la reivindicación 1, en el que la primera nanopartícula activa para DRPS comprende un único metal y la segunda nanopartícula activa para DRPS comprende una mezcla o aleación de dos metales.
6. El método de producción de un espectro de dispersión Raman potenciada en superficie (DRPS) de la reivindicación 5, en el que la segunda nanopartícula activa para DRPS comprende una mezcla o aleación de Au y Ag.
- 40 7. El método de producción de un espectro de dispersión Raman potenciada en superficie (DRPS) de la reivindicación 1, en el que un máximo de absorbancia de la primera nanopartícula activa para DRPS se separa de un máximo de absorbancia de la segunda nanopartícula activa para DRPS por entre  $200\text{ cm}^{-1}$  y  $3500\text{ cm}^{-1}$ .



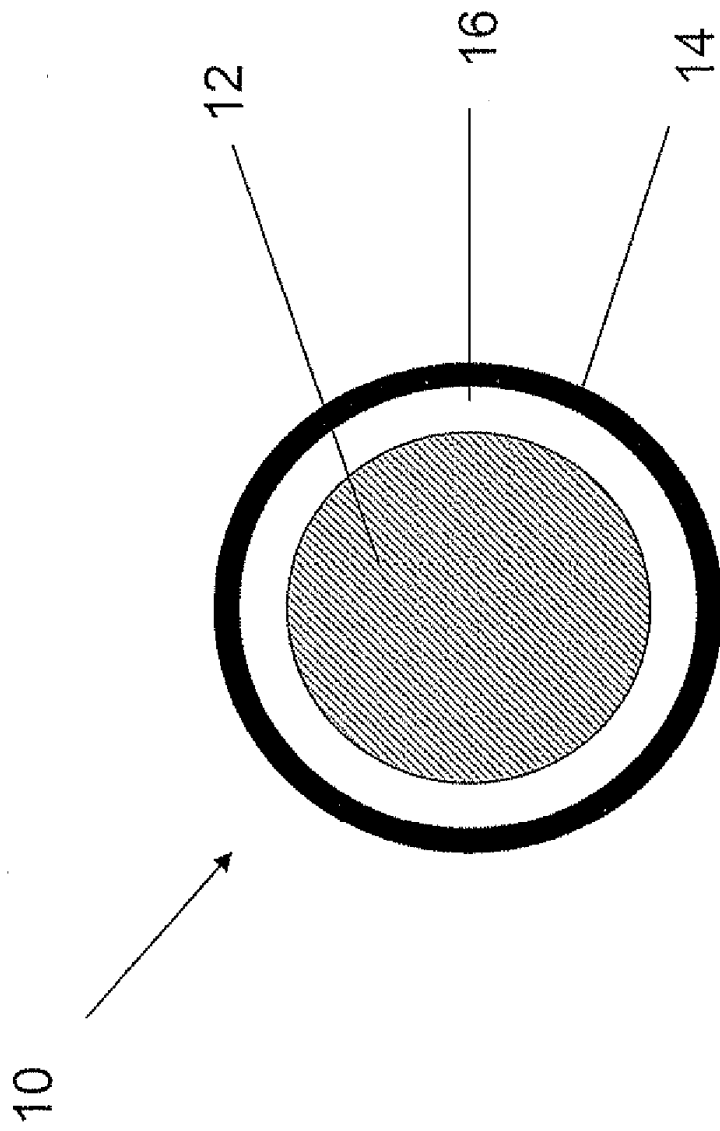
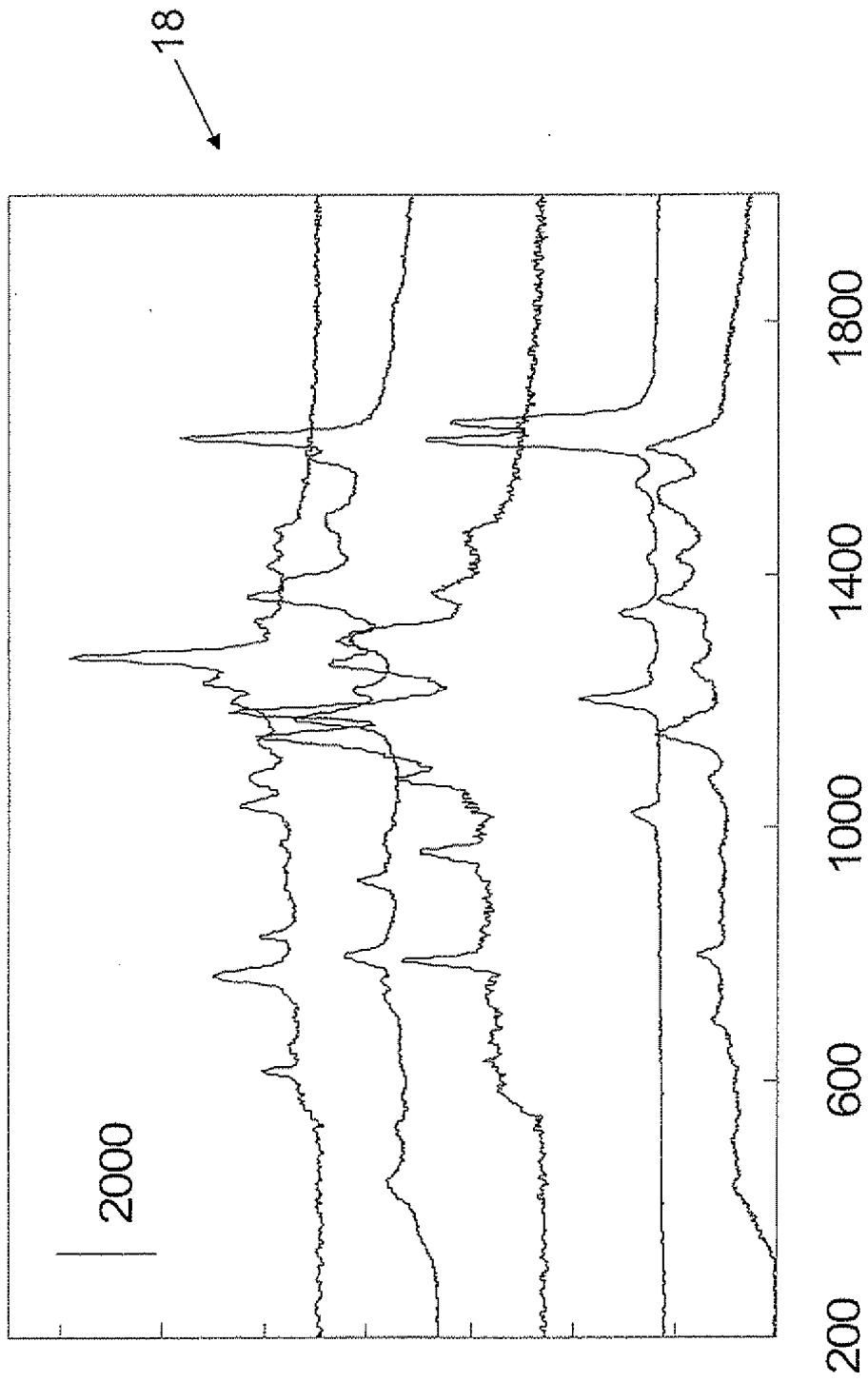


FIG. 1



Desplazamiento por Raman ( $\text{cm}^{-1}$ )

**FIG. 2**

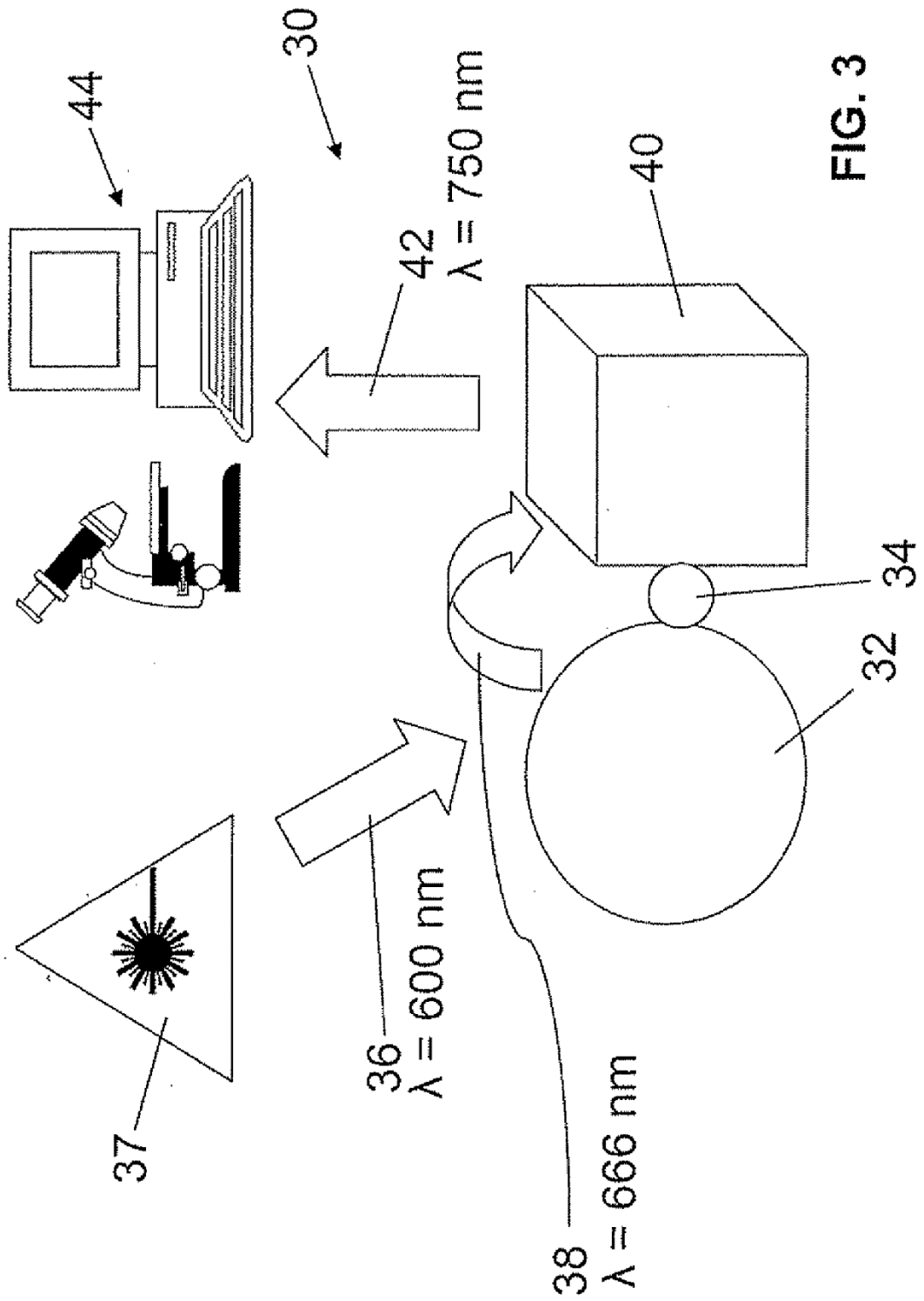


FIG. 3