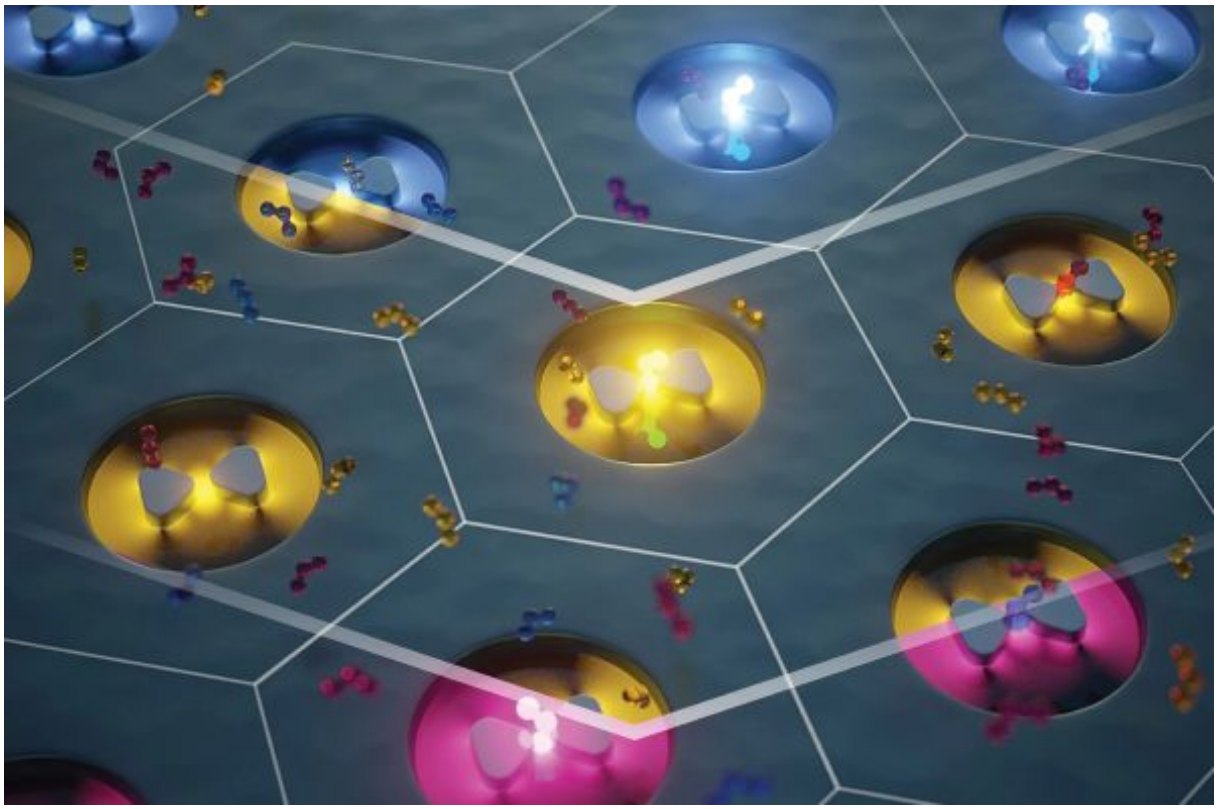


Nuevas nanoantenas permiten la deteccion multicolor sensible de moleculas individuales con un rendimiento sin precedentes

Investigadores del ICFO han desarrollado una plataforma de nanoantenas capaz de aumentar la emision de fluorescencia en todo el espectro visible, lo que permite la deteccion multicolor de moleculas individuales a concentraciones micromolares. El metodo propuesto tambien puede examinar mas de mil nanoantenas en paralelo, acelerando los tiempos de adquisicion de datos.

August 26, 2024

Desentranar las complejidades de los procesos biologicos a nivel de moleculas individuales es crucial para capturar la heterogeneidad de los sistemas biologicos y expandir nuestro conocimiento sobre su dinamica bioquimica. Sin embargo, la complejidad inherente al entorno biologico exige tecnicas de biosensado muy sensibles, las cuales comunmente

capturan la luz fluorescente emitida por las biomoleculas deseadas o sus etiquetas fluorescentes. Maximizar el brillo de su fluorescencia es esencial para asegurar su deteccion altamente sensible. Hasta la fecha, la investigacion de las interacciones entre diferentes biomoleculas con una sensibilidad a nivel de moleculas individuales cuando estas se encuentran a concentraciones tipicas de organismos vivos es un gran desafio para los metodos convencionales.

Las llamadas nanoantenas plasmonicas pueden proporcionar sensibilidad a nivel de moleculas individuales bajo estas condiciones, ya que pueden aumentar significativamente el brillo de una molecula fluorescente cercana. Sin embargo, la deteccion de moleculas individuales con estas nanoantenas en condiciones biologicamente relevantes presenta dos grandes desafios.

Por un lado, la deteccion de diferentes especies moleculares que emiten luz fluorescente en diferentes colores (longitudes de onda) requiere un gran aumento de la fluorescencia en varias regiones espectrales. Este tipo de estudios, conocidos como experimentos multicolor, requieren nanoantenas con una resonancia espectralmente amplia, lo que generalmente resulta en una amplificacion debil de la emision de fluorescencia y, en consecuencia, dificulta la sensibilidad de deteccion.

Por otro lado, las aplicaciones de biosensado a menudo requieren sensibilidad a nivel de moleculas individuales a concentraciones micromolares, el nivel de concentracion en el que muchas moleculas biologicas, interacciones y reacciones ocurren. Desafortunadamente, a concentraciones tan altas, la respuesta de las moleculas individuales se ve oscurecida por la fuerte senal de fondo generada por la gran cantidad de moleculas circundantes.

Teniendo en cuenta ambas problematicas, el objetivo se vuelve claro: desarrollar un diseno de nanoantena que potencie la fluorescencia de las moleculas objetivo y simultaneamente reduzca el ruido de fondo en todo el espectro visible.

Ahora, los investigadores del ICFO, **Ediz Kaan Herkert**, **Lukas Lau** y **Roger Pons Lanau**, liderados por la **Prof. ICREA Maria F. Garcia-Parajo**, han desarrollado una plataforma de nanoantenas que aborda con exito estos problemas. La plataforma aumenta la fluorescencia en todo el espectro visible y, al mismo tiempo, reduce la fluorescencia de fondo, lo que permite la deteccion multicolor de moleculas individuales a concentracion micromolar. Es importante destacar que ademas muestra un incremento en factor 1000 en el numero de nanoantenas que se pueden examinar en paralelo, facilitando un cribado rapido de las muestras, lo que a su vez conduce a un alto rendimiento (en referencia a la cantidad de informacion que se puede procesar en un periodo de tiempo determinado). Los resultados han sido publicados en ACS Applied Materials & Interfaces.

Nueva plataforma de nanoantenas: Antena-en-Caja Hexagonal de Alta Densidad y Empacado Cerrado

Las plataformas de Antena-en-Caja (AiB, por sus siglas en ingles), que consisten en una

nanoantena dentro de una nanoapertura, se han aplicado con exito a tareas de biosensado muy relevantes debido a que combinan una fuerte reduccion del ruido fluorescente de fondo y un aumento en la emision de fluorescencia.
A pesar de que su potencial para aplicaciones de biosensado se ha ido perfeccionando a lo largo de los anos, hay dos grandes desafios que todavia permanecen: las AiBs tradicionales son inadecuadas para experimentos multicolor y su rendimiento se ve limitado por su lectura secuencial punto a punto (es decir, solo se puede medir una antena-en-caja a la vez).
El diseno desarrollado en el ICFO supera estos desafios al introducir AiBs de alta densidad y empaquetado cerrado hexagonal (HCP-AiBs, por las siglas en ingles) hechas de aluminio. El enfoque de los investigadores consistio en colocar tantas AiBs tan cercanas entre si como fuera posible. En contraste con la disposicion cuadrada comunmente elegida, un empacado cerrado hexagonal les permitio maximizar el numero de AiBs dentro de un espacio dado.
La alta densidad de empaquetado aumento significativamente el numero de AiBs que se podian detectar simultaneamente. Al final, **el equipo logro medir mas de 1000 AiBs en paralelo, acelerando asi los tiempos de adquisicion de datos**. "Para aplicaciones de biosensado, esto significa que **el numero de analitos a detectar podria aumentar en tres ordenes de magnitud**, lo cual es un logro unico en el campo", comparte la Prof. ICREA Maria F. Garcia-Parajo.
Ademas, elegir aluminio en lugar de oro (el material tradicionalmente empleado para fabricar nanoantenas) fue clave para **lograr resonancias de banda ancha que cubriesen todo el rango visible**. El equipo luego diseno un microscopio personalizado con tres canales de excitacion, cada uno de los cuales capturo con exito la emision de fluorescencia de una especie molecular distinta.

Aumento de fluorescencia multicolor y paralelizacion del metodo de lectura desbloqueados
Conseguir el aumento de la fluorescencia multicolor y la paralelizacion del metodo de lectura son hitos unicos que fueron muy dificiles de demostrar experimentalmente en el pasado, pero el equipo del ICFO ha logrado desbloquearlos de manera eficiente. "Es por eso que considero que nuestros resultados son un gran paso hacia aplicaciones de las nanoantenas en el campo del biosensado realmente verdaderas", comparte Ediz Herkert, primer autor del articulo.
Pero el trabajo aun no ha terminado, ya que siempre hay margen de mejora. "Los proximos pasos en el campo deberian centrarse en desarrollar un proceso de sala limpia mas eficiente en tiempo y costos para producir este tipo de formaciones hexagonales de nanoantenas, y demostrar que la sensibilidad multicolor a nivel de moleculas individuales de las HCP-AiBs se puede llevar a cabo en condiciones biologicamente relevantes, incluyendo las celulas vivas", explica Herkert.
La Prof. ICREA Maria Garcia-Parajo tambien ve un gran potencial en su descubrimiento: "Nuestras HCP-AiBs podrian utilizarse en aplicaciones de biosensado multicolor para estudiar

interacciones entre diferentes proteinas en la membrana celular o para monitorizar la cinetica de union biomolecular, con una sensibilidad en la deteccion de moleculas individuales mejorada en ambos casos".

Referencia:

Ediz Kaan Herkert, Lukas Lau, Roger Pons Lanau, y Maria F. Garcia-Parajo. ACS Applied Materials & Interfaces 2024 16 (31), 41271-41280 DOI: 10.1021/acsami.4c04744

Fuente de la Imagen: portada de ACS Applied Materials and Interfaces