



Nuevas nanoantenas permiten la detección multicolor sensible de moléculas individuales con un rendimiento sin precedentes

Investigadores del ICFO han desarrollado una plataforma de nanoantenas capaz de aumentar la emisión de fluorescencia en todo el espectro visible, lo que permite la detección multicolor de moléculas individuales a concentraciones micromolares. El método propuesto también puede examinar más de mil nanoantenas en paralelo, acelerando los tiempos de adquisición de datos.

August 26, 2024

Desentrañar las complejidades de los procesos biológicos a nivel de moléculas individuales es crucial para capturar la heterogeneidad de los sistemas biológicos y expandir nuestro conocimiento sobre su dinámica bioquímica. Sin embargo, la complejidad inherente al entorno biológico exige técnicas de biosensado muy sensibles, las cuales comúnmente

capturan la luz fluorescente emitida por las biomoléculas deseadas o sus etiquetas fluorescentes. Maximizar el brillo de su fluorescencia es esencial para asegurar su detección altamente sensible. Hasta la fecha, la investigación de las interacciones entre diferentes biomoléculas con una sensibilidad a nivel de moléculas individuales cuando estas se encuentran a concentraciones típicas de organismos vivos es un gran desafío para los métodos convencionales.

Las llamadas nanoantenas plasmónicas pueden proporcionar sensibilidad a nivel de moléculas individuales bajo estas condiciones, ya que pueden aumentar significativamente el brillo de una molécula fluorescente cercana. Sin embargo, la detección de moléculas individuales con estas nanoantenas en condiciones biológicamente relevantes presenta dos grandes desafíos.

Por un lado, la detección 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 amplificación débil de la emisión de fluorescencia y, en consecuencia, dificulta la sensibilidad de detección.

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

Teniendo en cuenta ambas problemáticas, el objetivo se vuelve claro: desarrollar un diseño de nanoantena que potencie la fluorescencia de las moléculas objetivo y simultáneamente 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 éxito 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 detección multicolor de moléculas individuales a concentración micromolar. Es importante destacar que además muestra un incremento en factor 1000 en el número de nanoantenas que se pueden examinar en paralelo, facilitando un cribado rápido de las muestras, lo que a su vez conduce a un alto rendimiento (en referencia a la cantidad de información que se puede procesar en un período 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 inglés), que consisten en una

nanoantena dentro de una nanoapertura, se han aplicado con éxito a tareas de biosensado muy relevantes debido a que combinan una fuerte reducción del ruido fluorescente de fondo y un aumento en la emisión de fluorescencia.

A pesar de que su potencial para aplicaciones de biosensado se ha ido perfeccionando a lo largo de los años, hay dos grandes desafíos que todavía 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 diseño desarrollado en el ICFO supera estos desafíos al introducir AiBs de alta densidad y empaquetado cerrado hexagonal (HCP-AiBs, por las siglas en inglés) hechas de aluminio. El enfoque de los investigadores consistió en colocar tantas AiBs tan cercanas entre sí como fuera posible. En contraste con la disposición cuadrada comúnmente elegida, un empaquetado cerrado hexagonal les permitió maximizar el número de AiBs dentro de un espacio dado.

La alta densidad de empaquetado aumentó significativamente el número de AiBs que se podían detectar simultáneamente. Al final, **el equipo logró medir más de 1000 AiBs en paralelo, acelerando así los tiempos de adquisición de datos.** "Para aplicaciones de biosensado, esto significa que **el número de analitos a detectar podría aumentar en tres órdenes de magnitud**, lo cual es un logro único en el campo", comparte la Prof. ICREA María F. García-Parajo.

Además, 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 diseñó un microscopio personalizado con tres canales de excitación, cada uno de los cuales capturó con éxito la emisión de fluorescencia de una especie molecular distinta.

Aumento de fluorescencia multicolor y paralelización del método de lectura desbloqueados
Conseguir el aumento de la fluorescencia multicolor y la paralelización del método de lectura son hitos únicos que fueron muy difíciles 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 artículo.

Pero el trabajo aún no ha terminado, ya que siempre hay margen de mejora. "Los próximos pasos en el campo deberían centrarse en desarrollar un proceso de sala limpia más eficiente en tiempo y costos para producir este tipo de formaciones hexagonales de nanoantenas, y demostrar que la sensibilidad multicolor a nivel de moléculas individuales de las HCP-AiBs se puede llevar a cabo en condiciones biológicamente relevantes, incluyendo las células vivas", explica Herkert.

La Prof. ICREA María García-Parajo también ve un gran potencial en su descubrimiento: "Nuestras HCP-AiBs podrían utilizarse en aplicaciones de biosensado multicolor para estudiar

interacciones entre diferentes proteínas en la membrana celular o para monitorizar la cinética de unión biomolecular, con una sensibilidad en la detección de moléculas 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