

A mis padres: Susana y José.

Apoyos institucionales

Quiero agradecer a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP) y al Instituto de Física (IF) por haberme formado y haberme dado la oportunidad de realizar este programa de posgrado. Al Instituto Potosino de Ciencia y Tecnología (IPICYT) por haberme abierto sus puertas como estudiante asociada y prestarme todas las facilidades para que mi proyecto se llevase a cabo. Al departamento de matemáticas aplicadas del IPICYT por habernos facilitado equipo electrónico que requerimos durante el proyecto. Al departamento de biología molecular del IPICYT por habernos facilitado espacios, reactivos y asesoría. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico sin el cual no podría haber solventado mis gastos. Agradezco también a UCMEXUS por el apoyo económico para gastos de viaje derivados de la colaboración con el Dr. Ajay Gopinathan de la Universidad de California, Merced.

Agradecimientos

Sin duda hacen falta palabras para agradecer a las personas que me han apoyado a lo largo de este proyecto. Posiblemente se me escapen algunas personas y espero no se sientan ofendidas, seguro saben que si no están enlistadas aquí, es parte de un descuido y no un reflejo de mi falta de agradecimiento.

Quiero comenzar agradeciendo a mis compañeras de Laboratorio, Ana Iris Peña Maldonado y Noemí Hernández Candia. A ellas, con las que conviví más que con ninguna otra persona durante el último año, quiero agradecer que hicieran más sencillos los momentos de frustración, más interesantes las sobremesas y más divertidas las noches de fiesta. A mi asesor, el Dr. Braulio Gutiérrez Medina, quiero agradecer la paciencia que siempre mostró al introducirme en el mundo de la física experimental y la biología molecular. Gracias a él por los conocimientos y la formación que me proporcionó. Gracias también por que, además de ser un excelente asesor, demostró ser una persona con una gran calidad humana y un muy buen amigo. Gracias por los consejos y las sugerencias. Gracias al Dr. Sergio Casas Flores por proporcionarme un espacio en su laboratorio y adoptarme como a otro más de sus estudiantes. Al Dr. Roberto Sánchez Olea, gracias por el apoyo institucional que me permitió realizar este proyecto.

No puedo dejar de agradecer a todas esas personas que resolvieron las preguntas que surgieron a lo largo del camino: a los estudiantes del laboratorio 8 de biología molecular, en especial a Mayte Guadalupe Cervantes y a Edith Elena Uresti, a los técnicos de laboratorio Irwin, quien además me ayudó con la impresión de la tarjeta electrónica, y a Isabel que también me auxilió con los procedimientos de biología.

A mis compañeros y amigos de generación, Adrián Pallares y Mayela

Romero, por prestarme incondicionalmente, como todo buen amigo lo hace, sus oídos y consejos, por compartirme momentos tristes, alegres y otros llenos de duda en los grises cubículos del Instituto de Física. Por la identificación que sentimos cuando escuchamos amparosamente que la vida te da. También quiero agradecer a las personas que me dieron apoyo moral (equivocadamente suena a que es una contribución menor), ya que sin su apoyo no podría haber disfrutado lo que realicé durante los dos últimos años: a mis amigos Itzia Guzman y Roberto De Arcia, que aunque fuera de San Luis Potosí, siempre estuvieron al teléfono para escucharme. A mis amigos Luis Enrique Sánchez y Jesús González por hacerme reír y escuchar mis múltiples quejas. A mis hermanos Lupita Tafoya y David Tafoya, gracias por entenderme siempre, aunque algunas veces sean tan diferentes a mí, a Daniel Tafoya por motivarme y creer en mi trabajo.

Quiero agradecer a Juan Oñate, que ha sido inspiración, ejemplo, amigo incondicional, rival de juego, en fin, me faltan las palabras, me sobran motivos para agradecerle; basta decir que le ha dado un sentido diferente a muchos aspectos de mi vida.

Finalmente, quiero agradecer a dos personas que nunca han dudado en apoyar un proyecto más grande del cual éste es sólo una pequeña parte: mis padres y amigos, Susana Martínez y José Tafoya. Gracias por apoyar el proyecto que he elegido para mi vida.

Resumen

En este trabajo se presentan los detalles de la construcción de un sistema de pinzas ópticas, el cual es un dispositivo que permite atrapar y manipular objetos micrométricos con ayuda de un láser, detectar desplazamientos del objeto atrapado del orden de nanómetros (nm), además de aplicar y detectar fuerzas del orden de picoNewtons (pN) que localmente se comportan como las de un resorte. Como parte de la construcción se realizaron procesos de caracterización del láser que consistieron en determinar la estabilidad de apunte, la estabilidad de la potencia, el tamaño de la mancha del láser y la divergencia en términos de la distancia de Rayleigh. Se detallan los componentes principales de la pinza (el objetivo y el láser), los métodos con los que es posible manipular la muestra (el deflector acusto-óptico y la platina piezoeléctrica) y el método para detectar los desplazamientos del objeto atrapado (el fotodetector de posición). Tras la construcción del dispositivo, se realizó una calibración para determinar los desplazamientos del objeto a partir de la señal del fotodetector de posición y la constante de rigidez de la pinza. El sistema de pinzas óptico fue probado con un sistema modelo constituido por moléculas individuales de ADN. Una molécula de ADN es estirada con la pinza para producir una curva que relaciona la extensión de la molécula en función de la fuerza aplicada. Las curvas son analizadas con el modelo de la cadena vermiforme de donde se obtiene la longitud de contorno y la longitud de persistencia de la molécula de ADN. Los resultados son comparados con valores reportados previamente en la literatura.

Construcción, caracterización y calibración de una pinza óptica para manipulación de moléculas individuales de ADN

Sara Tafoya Martínez

Julio 2011

Índice general

Apoyos institucionales	III
Agradecimientos	V
Resumen	VII
1. Introducción	1
2. Pinzas ópticas: teoría y construcción	7
2.1. Teoría de las pinzas ópticas	7
2.2. Caracterización del láser	14
2.3. Esquema de la pinza óptica.	20
2.4. Tarjeta de Acoplamiento de impedancias	33
3. Calibración de la pinza óptica	39
3.1. Calibración del FDP	42
3.1.1. Determinación del punto de equilibrio	43
3.1.2. Determinación del tamaño de la región lineal del FDP	49
3.1.3. Determinación de los coeficientes de proporcionalidad para la conversión de unidades.	51
3.2. Métodos para determinar la rigidez de la trampa	52
4. Sistema biológico: Moléculas de ADN	59
4.1. Conceptos preliminares	59

ÍNDICE GENERAL

4.2. Obtención del ADN	62
4.3. Purificación del ADN	66
5. Estiramiento de ADN y resultados	73
5.1. Preparación del ensayo	73
5.2. Curvas de Fuerza-Extensión	76
5.3. Análisis de las curvas de Fuerza - Extensión	84
6. Discusión y conclusiones	89
A. Atados de ADN	101
A.1. Preparación de <i>buffers</i>	101
A.2. Preparación de soluciones concentradas	103
A.3. Limpieza de cubreobjetos	105
A.4. Protocolo de preparación de la muestra (atados de ADN)	106

Introducción

La manipulación de objetos a distancia a través de haces de luz es un tema que muchas personas consideran futurista y exclusivo de las películas de ciencia ficción. Sin embargo, éste ha dejado su exclusividad en el cine para convertirse en una posibilidad que está siendo utilizada en diversos laboratorios de biofísica, nanotecnología y física cuántica alrededor del mundo. Los dispositivos que están cerrando la brecha entre esa idea futurista y una realidad palpable son *las pinzas ópticas*.

Las pinzas ópticas usan un haz láser para capturar y manipular objetos de tamaños pequeños que van desde las decenas de micras (10^{-6} m) hasta fracciones de nanómetro (10^{-9} m). La fuerza que ejercen tiene su origen en la naturaleza electromagnética de la luz y con ellas es posible atrapar objetos en forma individual o en grupos, constituídos de materiales diversos, generalmente dieléctricos. También es posible capturar partículas líquidas y hasta átomos individuales, objetos inmersos en distintos medios como el agua y el aire, entre otros fluidos, además del vacío. Las aplicaciones de un instrumento tan versátil se han dejado ver en diferentes campos de la ciencia para estudiar temas tan diversos como la locomoción celular, nanomotores moleculares, formación de condensados de Bose-Einstein y propiedades físicas de polímeros, entre otros¹.

El atrapamiento de objetos con luz fue descubierto en 1970 por el

¹Una descripción general de todas estas aplicaciones puede encontrarse en [1].

físico norteamericano Arthur Ashkin mientras estudiaba las fuerzas de esparcimiento en los laboratorios Bell [1]. Para 1986 las pinzas ópticas eran una realidad y se reconocía su vasto potencial de aplicación. Ashkin tuvo la visión certera de que este fenómeno serviría para estudiar átomos y moléculas e inclusive pequeños organismos vivos como las bacterias, aunque se encontraba preocupado por el daño que la luz láser podría causarles.

A mediados de la década de los 90, otros estudios demostraron que el atrapamiento con luz infrarroja resulta inofensivo para las funciones de los sistemas biológicos [3]. Ésto resolvió la preocupación original de Ashkin: *Las pinzas ópticas con luz infrarroja no producen daño a los organismos vivos*. Desde entonces se ha venido desarrollando una serie de métodos para estudiar a los sistemas biológicos, sus componentes y sus funciones a través de las pinzas ópticas.

Por los mismos años, pero en una dirección muy diferente, el atrapamiento con luz dió lugar a las técnicas de enfriamiento y atrapamiento de átomos con las cuales es posible enfriar partículas con una temperatura de 500 Kelvin (K)-1000 K y llevarlas hasta las milésimas de Kelvin. Steven Chu, William Phillips y Claude Cohen-Tannoudji recibieron el premio Nobel en 1997 por desarrollarlas [2].

En cuanto al estudio de los sistemas biológicos, las pinzas ópticas no sólo constituyen una técnica de atrapamiento que permite capturar y mover componentes biológicos, además, es posible rastrear su movimiento con precisión subnanométrica ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$) [11], aplicar y detectar pequeñas fuerzas en el orden de los piconewtons ($1 \text{ pN} = 10^{-12} \text{ m}$) [5] y alterar estructuras más grandes como las membranas celulares [6]. Se habla de las pinzas ópticas como *las delicadas manos de la luz* debido a que es posible manipular componentes biológicos de una manera muy fina, como ninguna otra técnica de micromanipulación lo ha conseguido, al grado de ser posible estudiar *una molécula a la vez* [7], el equivalente a manipular un objeto un millón de veces más pequeño que un grano de arena.

Los organismos vivos son sistemas complejos, constituídos por millones de componentes diferentes, entonces: ¿Por qué podría resultar intere-

sante estudiar una sola molécula?

En un experimento típico de bioquímica, las muestras están constituidas por $\sim 10^{10} - 10^{23}$ partículas, cuyo comportamiento y características han sido promediados en la escala macroscópica. Promediar las características de una población para obtener una única característica global puede conducir al grave error de afirmar que ésta corresponde a todos los elementos de la población.

Considérese un ejemplo sencillo como el número de reacciones N que cataliza una enzima por cada unidad de energía que consume. Supóngase que en un ensayo en bulto ($\sim 10^{23}$ moléculas) se encuentra que este número es fraccional, digamos $N = 0.95$. En tales condiciones se concluiría que esta enzima necesita un poco más de una unidad de energía para llevar a cabo la catálisis de una reacción. Si por el contrario se estudia el comportamiento de cada enzima, podría encontrarse que, debido a las fluctuaciones térmicas del medio, 5 % de las veces la enzima simplemente fue incapaz de catalizar la reacción y el 95 % de las veces restantes consumió exactamente una unidad de energía en cada reacción.

En este ejemplo, el promedio esconde la naturaleza estocástica de las reacciones moleculares. De sus resultados podría concluirse algo que se aleja del entendimiento correcto del funcionamiento de esta enzima. Ésta es la respuesta a la pregunta que formulé antes: *los promedios esconden el comportamiento estocástico que siguen cada uno de los componentes celulares a nivel molecular* [8].

Una de las razones por las cuales las pinzas ópticas han tenido éxito en el estudio de los sistemas biológicos es que son dispositivos con una alta plasticidad en los esquemas de atrapamiento. Los esquemas de atrapamiento pueden ser muy diferentes entre sí dependiendo de las necesidades del estudio: éstos pueden ser de una única trampa o de varias en paralelo, cada trampa puede estar constituida por uno o varios láseres para conseguir el atrapamiento del objeto y la detección de su movimiento [9]. Además, es posible manipular los objetos de forma directa o indirecta.

En particular, se ha utilizado ampliamente la configuración de las *mani-*

jas^2 , [4, 5, 10], las cuales son objetos micrométricos, típicamente esferas de poliestireno. En un medio acuoso es difícil atrapar y mantener en equilibrio objetos nanométricos debido a las fluctuaciones térmicas del medio, en cambio, es relativamente fácil hacerlo con objetos micrométricos. Una molécula de ADN tiene un tamaño de 2 a 3 nm de ancho mientras que una esfera manija tienen un diámetro de aproximadamente $1 \mu\text{m}$. Los componentes biológicos que se desean estudiar, tales como proteínas o moléculas de ADN, son sujetos por las manijas en puntos estratégicos. Los ensayos con manijas consisten en aplicar a éstos objetos una fuerza conocida y medir su respuesta. Las manijas típicamente son de un material rígido de forma que una respuesta elástica necesariamente proviene de la molécula a la que se encuentran sujetas. Con la fuerza aplicada y la posición de la esfera es posible formar las llamadas *curvas de fuerza-extensión*. Además de contener las características poliméricas de la macromolécula que se está estudiando, a partir de estas curvas también es posible inferir información acerca de sus funciones biológicas [7, 9].

Los estudios a nivel de moléculas individuales han demostrado ser métodos complementarios a los métodos estándar en biología molecular. Entre las muchas cosas interesantes y relevantes que se han podido realizar, se encuentra el seguimiento en tiempo real del funcionamiento de proteínas motoras³ involucradas en los procesos fundamentales del dogma central de la biología molecular: la replicación [11], la transcripción [12] y la traducción [13]. Estas proteínas se desplazan, o traslocan, a lo largo de otros biopolímeros mientras convierten la energía química liberada en la hidrólisis de moléculas de ATP en trabajo mecánico. Se han logrado medir traslocaciones del orden de unos pocos nanómetros [4, 13] hasta fracciones de éstos [11] utilizando dispositivos de pinzas ópticas diseñados para obtener alta resolución espacial.

Estos estudios también han permitido establecer modelos para los ciclos mecanoquímicos mediante los cuales la energía química es transformada en trabajo mecánico por los motores moleculares [14, 15]. Algunos de los diversos temas que se están estudiando actualmente también incluyen:

²En inglés *handles*

³Proteínas capaces de transformar energía química en trabajo mecánico. También se les conoce comúnmente como motores moleculares.

estequiometrías en reacciones mediadas por catálisis [4], fuerzas ejercidas por los motores moleculares, [4, 14, 16], cooperatividad entre varias moléculas [17], cambios conformacionales [18] y plegamiento de proteínas [19].

En conclusión, las pinzas ópticas son instrumentos versátiles que han permitido el desarrollo de nuevas técnicas de estudio para los sistemas biológicos. El estudio de moléculas individuales complementa a las técnicas tradicionales de la biología molecular, pues establecen nuevas aproximaciones que van desde lo individual a lo global, de lo simple a lo complejo.

Todas estas características motivaron mi participación en el proyecto que presento en esta tesis. Los objetivos de este trabajo fueron: participar en la construcción y caracterización de una pinza óptica para manipulación de moléculas individuales y probar el dispositivo en un ensayo donde se examinaron las propiedades poliméricas de moléculas individuales de ADN.

Esta tesis se divide en 5 capítulos. En el primero de ellos describo la pinza óptica y cuál fue mi participación en la construcción de la misma. En la segunda parte se presentan los métodos de calibración del fotodetector de posición (que permite detectar los desplazamientos de las esferas de poliestireno) y de la trampa óptica (lo cual permite aplicar fuerzas conocidas a los objetos atrapados). En la tercera parte se describen los procedimientos y protocolos que se siguieron para obtener las moléculas de ADN. En la cuarta sección se describe la construcción del ensayo, la preparación de las muestras, la obtención de los datos y el análisis de los mismos y los resultados. Finalmente, en el quinto capítulo presento una discusión de los resultados obtenidos y las conclusiones generales del proyecto.

Pinzas ópticas: teoría y construcción

2.1. Teoría de las pinzas ópticas

Es común pensar que la luz incidente sobre un objeto transparente no produce efecto alguno sobre éste. En la escala de nuestra percepción vemos que la luz lo atraviesa pero no induce el movimiento del objeto. Quizás esta visión cotidiana es la razón por la cual nos parece fascinante la idea de manipular objetos a distancia a través de haces de luz.

El mecanismo por el cual funcionan las pinzas ópticas es, en esencia, interacción de luz con materia. Contrario a lo que nuestra experiencia cotidiana nos dice, en esta interacción ocurren fenómenos físicos que dan origen a fuerzas: *la luz ejerce fuerza sobre la materia*. En una trampa óptica, los objetos son atrapados debido a que la luz ejerce dos tipos de fuerza sobre éstos: fuerzas de esparcimiento y fuerzas de gradiente.

Cuando un haz de luz incide sobre un objeto, la luz puede ser reflejada, absorbida o transmitida. Estos fenómenos implican un cambio de momento de la luz y por ende una fuerza. La absorción y la reflexión dan lugar a una fuerza que se conoce como fuerza de esparcimiento y es proporcional a la intensidad del haz. Aunque en una pinza óptica convencional están presentes las fuerzas de esparcimiento, es notable que no son éstas las que dan lugar al atrapamiento. Son las fuerzas de gradiente

CAPÍTULO 2. PINZAS ÓPTICAS: TEORÍA Y CONSTRUCCIÓN

las que originan la trampa óptica en las tres coordenadas espaciales. Su naturaleza es diferente ya que resultan de las inhomogeneidades en la distribución de la intensidad de la luz, es decir, son proporcionales a su gradiente.

Para tener una mejor idea del mecanismo mediante el cual ocurre el atrapamiento, revisaré con mayor detalle la interacción de la luz con el objeto atrapado. En la discusión siguiente supondré que este objeto es una esfera dieléctrica de radio r , índice de refracción $n \approx 1.5$ e inmersa en agua.

Las descripciones de la interacción luz-materia se dividen de acuerdo al tamaño de la partícula relativo a la longitud de onda de la luz. Un tratamiento formal puede encontrarse en la Referencia [22].

1. **Régimen de Mie** ($r \gg \lambda$): Este régimen corresponde al de la óptica geométrica, donde la esfera atrapada actúa como una lente capaz de enfocar y desviar el haz láser. En este régimen una descripción de rayos es suficiente para entender de manera cualitativa los mecanismos que generan las fuerzas de atrapamiento.

Considérese un rayo incidiendo a una distancia d respecto al centro de la esfera (Figura 2.1). De acuerdo a la ley de Snell, el rayo se refracta al atravesar las interfaces de la esfera con el medio. La refracción del haz ocurre porque hubo un cambio en la dirección de propagación del rayo. Este cambio en la dirección del rayo produce un cambio en el momento lineal de la luz. Por conservación de momento total, la luz imparte un momento a la esfera de igual magnitud pero en dirección contraria.

Considérese ahora una esfera sobre la que está incidiendo un haz de rayos con una distribución de intensidad gaussiana centrada al origen como se ve en la Figura 2.2. Por simplicidad, en este ejemplo se considera que el gradiente de la intensidad en el eje longitudinal es despreciable.

Si la esfera se desplaza una distancia d hacia la izquierda, al igual que en el caso anterior, la luz ejercerá diversas fuerzas debido a la refracción de cada uno de los rayos. Dado que la distribución de la intensidad no es uniforme, los rayos a la derecha del nuevo

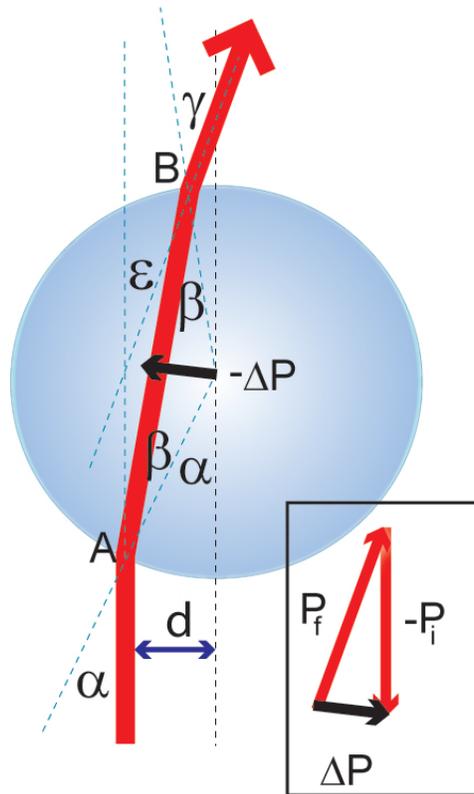


Figura 2.1: Refracción de la luz por la esfera. Un rayo incide en la esfera a una distancia d de su centro con un ángulo α y un momento inicial P_i . Después de entrar por el punto A y salir por el punto B, el rayo es refractado dos veces en las interfaces, primero a un ángulo β y después a un ángulo γ . Sale con un momento final P_f . El ángulo entre la dirección de entrada y la dirección de salida está dado como: $\varepsilon = 2(\alpha - \beta)$. El cambio en la dirección de propagación implica un cambio total ΔP en el momento de la luz (vector negro en el recuadro). Por conservación de momento, la luz imparte un momento a la esfera de igual magnitud pero de signo contrario (vector negro en el centro de la esfera).

centro, en conjunto, tendrán un cambio de momento mayor que los rayos de la izquierda. Aplicando el criterio de conservación de momento total, la esfera sufrirá un cambio de momento en la dirección opuesta y tenderá a ser restituida a su posición original. Un comportamiento idéntico pero en sentido contrario ocurre si la esfera se mueve una distancia d hacia la derecha: la luz ejercerá una fuerza de restitución sobre la esfera hacia la izquierda. Si la esfera se encuentra en el centro de la distribución, el cambio de momento es simétrico y por lo tanto se mantiene el equilibrio en el plano trasversal.

En el eje longitudinal, en cambio, existe una fuerza neta en la di-

CAPÍTULO 2. PINZAS ÓPTICAS: TEORÍA Y CONSTRUCCIÓN

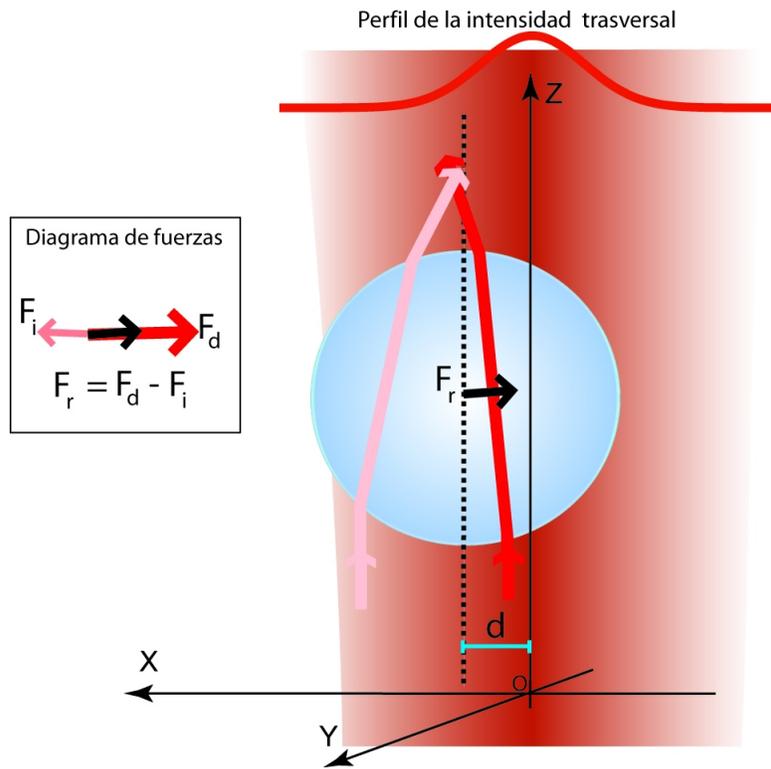


Figura 2.2: Las fuerzas de gradiente son originadas por una distribución inhomogénea de la intensidad de la luz. Sobre una esfera incide un haz con una distribución de intensidad gaussiana. Cuando la esfera es desplazada una distancia d del origen, los rayos son refractados y hay un cambio en su momento. Por simplicidad se considera un rayo representativo en la izquierda y otro en la derecha. El rayo rojo representa a la luz más intensa y el rayo rosa a la menos intensa. El rayo en la derecha es refractado y produce una fuerza F_d sobre la esfera. El rayo de la izquierda es refractado y produce una fuerza F_i sobre la misma. Puesto que la intensidad del rayo rojo es mayor se tiene que: $F_d > F_i$. La fuerza resultante F_r tiene una componente en el plano transversal (ejes x y y) en dirección al origen. La componente axial es muy pequeña y es despreciable para los efectos que se quieren describir.

rección de la propagación de la luz debida principalmente a la luz reflejada por la esfera. Para un material transparente, una pequeña fracción de la luz es reflejada en la interfaz de la esfera con el medio en el que se encuentra inmersa; en la reflexión, los rayos de luz sufren el mayor cambio de momento posible: la inversión de la dirección de la propagación. Por tercera ley de Newton, este cambio de momento da lugar a las fuerzas de esparcimiento las cuales son ejercidas sobre la esfera en la dirección de propagación del haz. Como se verá más adelante, un gradiente en el eje longitudinal creado por medio de una lente objetivo, compensa el empuje de las fuerzas de esparcimiento y establece un punto de equilibrio en una posición

asimétrica, veáse la Figura 2.3.

2. **Régimen de Rayleigh** ($r \ll \lambda$): Este régimen nos permite realizar una descripción cuantitativa de las fuerzas de atrapamiento debido a que el campo electromagnético de la luz se aproxima a una distribución homogénea. En este régimen, la esfera es descrita como un dipolo eléctrico oscilante inducido por el campo electromagnético.

A continuación presento los resultados esenciales de un análisis realizado desde la teoría electromagnética de la luz.

Por un lado se tiene la fuerza debida a la presión de radiación de la luz, F_e . El promedio temporal de la presión de radiación $\langle P(t) \rangle_T$, en un intervalo de tiempo T , está dado como [22]:

$$\langle P(t) \rangle_T = \frac{I}{v} \quad (2.1)$$

donde I es igual a la intensidad del haz, v es la velocidad de la luz en el medio en el que se encuentra inmersa la esfera (en este caso agua).

Por lo tanto, la fuerza ejercida sobre la esfera será igual a esta presión multiplicada por el área trasversal de la esfera:

$$F_e = n_m \frac{I\sigma}{c} \quad (2.2)$$

donde n_m es el índice de refracción del agua, c es la velocidad de la luz en el vacío y σ es la sección eficaz de la esfera, la cual está dada como [10]:

$$\sigma = \frac{128\pi^5 r^6}{3\lambda^4} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 1} \right)^2 \quad (2.3)$$

CAPÍTULO 2. PINZAS ÓPTICAS: TEORÍA Y CONSTRUCCIÓN

en donde $m = n/n_m$ es el índice de refracción relativo y λ es la longitud de onda de la luz. Nótese que si la esfera atrapada tiene el mismo índice de refracción que el medio, entonces la sección eficaz es cero y no hay fuerza de esparcimiento.

Por otro lado, la fuerza de gradiente es el resultado del promedio en el tiempo de las fuerzas ejercidas por el campo eléctrico sobre el dipolo. La energía de interacción está dada como $U = -\mathbf{p} \cdot \mathbf{E}$, donde \mathbf{E} es el campo eléctrico externo y \mathbf{p} es el dipolo eléctrico [28]. La fuerza se define como la derivada espacial de la energía o bien $F = -\nabla U$, de manera que

$$\mathbf{F} = -\nabla U = \nabla(\mathbf{p} \cdot \mathbf{E}) \quad (2.4)$$

El dipolo eléctrico inducido es proporcional al campo que lo indujo: $\mathbf{p} = \alpha \mathbf{E}$, donde α es la polarizabilidad del material, la cual está dada como [10]:

$$\alpha = n_m^2 r^3 \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) \quad (2.5)$$

Dado que la intensidad de la luz es proporcional al módulo cuadrado del campo eléctrico, de las expresiones anteriores se tiene que la fuerza de interacción dipolo-campo eléctrico es:

$$\mathbf{F}_g = \nabla(\mathbf{p} \cdot \mathbf{E}) = \alpha \nabla(\mathbf{E}^2) = \frac{2\pi\alpha}{cn_m^2} \nabla I \quad (2.6)$$

Esta forma funcional hace evidente que la fuerza resultante de este tipo de interacción es *proporcional al gradiente de la intensidad de la luz*, en contraste a la fuerza de esparcimiento la cual es *proporcional a la intensidad*.

Cabe mencionar que aunque estas descripciones proporcionan una muy buena idea de lo que ocurre en el atrapamiento de objetos con luz, en realidad son aproximaciones el caso que concierne. En los ensayos

de moléculas individuales, las esferas mayormente utilizadas tienen un diámetro ($\sim 1 \mu\text{m}$) del orden de la longitud de onda de la luz láser (1064 nm, infrarrojo). Ésto quiere decir que las partículas que atrapamos no pertenecen a ninguno de los regímenes discutidos aquí. Las pinzas ópticas se encuentran en un régimen intermedio conocido como el régimen de Mie-Rayleigh. La descripción cuantitativa de lo que ocurre en este régimen es todavía un tema de investigación y sus resultados van más allá del propósito de esta Tesis [29].

El atrapamiento por una pinza óptica.

Para aplicaciones biológicas los láseres que se utilizan mayormente tienen un modo gaussiano (TEM_{00}). Este modo presenta un gradiente de intensidad en el plano transversal debido al perfil gaussiano, por lo tanto puede ejercer una fuerza de gradiente en esta dirección. Por otra parte, en el eje longitudinal el haz diverge de forma natural por lo que también existe un gradiente en esta dirección, aunque es generalmente mucho más pequeño que en la dirección transversal. Como acabo de revisar, tanto las fuerzas de gradiente como las de esparcimiento, son intrínsecas a la interacción del haz láser con una partícula coloidal. Cabe preguntar entonces si únicamente un haz láser (por ejemplo, como el de un apuntador) puede ejercer fuerzas tales que atrapen una partícula coloidal. La respuesta a la pregunta anterior es: no, ya que los gradientes intrínsecos del láser son tan pequeños que las fuerzas ejercidas sobre la partícula son despreciables.

Por lo tanto, en la construcción de una pinza óptica la primera consideración a realizar es incrementar los gradientes de intensidad tanto como sea posible. Ésto se logra haciendo incidir el haz láser en una lente objetivo de apertura numérica (AN) alta (Figura 2.3). Al enfocar el haz con esta lente se vuelve más pronunciado el gradiente en el plano transversal y se forma un gradiente longitudinal alrededor del punto focal.

Es importante mencionar que los gradientes creados de esta forma no se pueden incrementar de forma arbitraria debido a la difracción. La distribución transversal de la intensidad de la luz en el foco es muy próxima a una función de Airy, y por ello el tamaño mínimo de la mancha del haz está dado como $2l$, donde l es la posición del primer cero de la función,

CAPÍTULO 2. PINZAS ÓPTICAS: TEORÍA Y CONSTRUCCIÓN

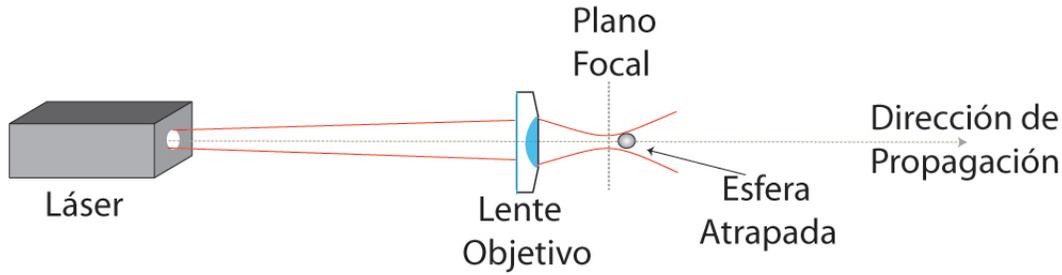


Figura 2.3: Componentes necesarios para atrapar objetos microscópicos. Un láser gaussiano tiene gradientes en la intensidad tanto transversales como longitudinales. Sin embargo, no es posible atrapar objetos micrométricos debido a que las fuerzas de gradiente son muy débiles como para compensar las fuerzas de esparcimiento. Una lente de apertura numérica amplia ($\sim 1.2 - 1.4$) se utiliza para enfocar el haz hasta el límite de la difracción. La disminución del tamaño de la mancha produce un incremento en el gradiente transversal y alrededor del foco se produce un gradiente en el eje longitudinal. La fuerza de gradiente atrapa a la esfera en el foco, sin embargo es desplazada fuera de éste por la fuerza de esparcimiento que la empuja en la dirección de propagación del láser. El punto de equilibrio entre éstas dos fuerzas se establece en una posición asimétrica en el eje axial.

el cual está dado por [22]:

$$l \approx \frac{\lambda}{2 AN} \quad (2.7)$$

La apertura numérica se define como:

$$AN = n_m \text{sen}(\theta_{max}) \quad (2.8)$$

Donde n_m es el índice de refracción del medio inmediato a la lente y $2\theta_{max}$ es el ángulo de recolección de luz de la lente. En una pinza óptica típica se utilizan objetivos de microscopio con $AN \approx 1.3$, por lo que el tamaño mínimo del haz que se alcanza con un haz láser infrarrojo ($\lambda = 1064 \text{ nm}$) es $2l \approx 800 \text{ nm}$.

2.2. Caracterización del láser

El componente esencial de una pinza óptica es el láser de atrapamiento. Como se verá en esta sección y la siguiente, caracterizar el láser es fundamental para planear la construcción del dispositivo de manipulación ya que permite elegir adecuadamente la posición y características de otros componentes ópticos. Si el láser de atrapamiento funciona además

como láser de detección, es necesario caracterizar su estabilidad para conocer la resolución del método de detección¹.

El láser que se utilizó es un láser de Yterbio (Yb), con una longitud de onda en el infrarrojo de $\lambda = 1064$ nm, linealmente polarizado y con una potencia máxima de salida de 10W en onda continua (IPG-Photonics, modelo YLR-10-1064-LP).

Cintura y Distancia de Rayleigh

El tamaño de la mancha de un haz gaussiano se define como $2w(z)$, donde $w(z)$ es el radio para el cual la intensidad ha decaído por un factor igual a $1/e$. Es dependiente de la posición en el eje axial z debido a la divergencia del haz y está determinada en cualquier punto por la siguiente relación [20]:

$$w(z) = w_0 \sqrt{1 + \left(\frac{z}{z_R}\right)^2} \quad (2.9)$$

donde w_0 es el valor mínimo de $w(z)$ y se conoce como la cintura del haz; sin pérdida de generalidad en esta ecuación se define al origen ($z = 0$) como el punto donde se ubica w_0 . La distancia de Rayleigh, z_R , se define como $w(z_R) = \sqrt{2}w_0$ y satisface la siguiente relación:

$$z_R = \frac{\pi w_0^2}{\lambda} \quad (2.10)$$

La cintura del haz y la distancia de Rayleigh determinan completamente el valor del tamaño de la mancha del haz en cualquier otro punto del eje axial.

Para caracterizar el haz del láser utilizado en la pinza, se determinó el tamaño de la mancha del haz en 5 posiciones diferentes a lo largo del eje axial utilizando el método de la navaja. A los valores obtenidos posteriormente se les ajustó la función de la ecuación 2.9 (Figura 2.4C). Los valores obtenidos son: $w_0 = (0.74 \pm 0.001)$ mm y $z_R = (178 \pm 6)$ cm

¹Para ver el método de detección veáse el capítulo *Calibración de la pinza óptica*.

CAPÍTULO 2. PINZAS ÓPTICAS: TEORÍA Y CONSTRUCCIÓN

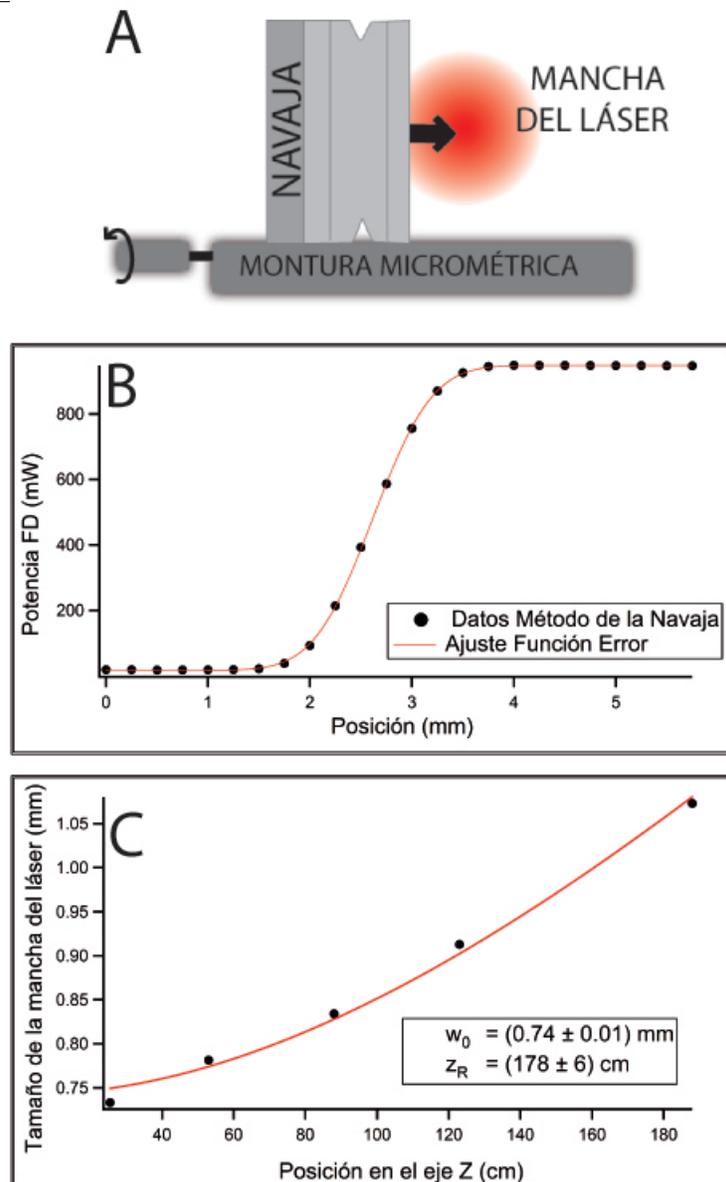


Figura 2.4: Método de la navaja para caracterizar un haz gaussiano. **A**, Método de la navaja. Una navaja de afeitar es sujeta a una montura micrométrica y se coloca en el camino óptico del haz. Inicialmente la navaja se desliza hacia la orilla con los tornillos micrométricos de forma que el haz pasa completamente. Se toma una medición con el medidor de potencia. La navaja se desliza transversalmente por intervalos conocidos en uno de los ejes y en cada pausa se toma una nueva lectura en el medidor de potencia. Este procedimiento se repite hasta que el haz es bloqueado completamente por la navaja. **B**, Resultado del método de la navaja para una separación de 188 cm (distancia entre el láser y el medidor de potencia) con intervalos de 200 μm , línea sólida y marcadores en negro. La potencia registrada va disminuyendo conforme bloqueamos el haz. A la derecha se encuentra la potencia cuando el haz pasa completamente. A la izquierda, la potencia cuando el haz es bloqueado completamente. El ajuste es una función de error complementaria que determina el valor de $w(z)$, para $z = 188$ cm, línea sólida en rojo. **C**, El valor de $w(z)$ se determina para 5 separaciones diferentes, a los cuales se ajusta la función de la ecuación 2.9.

(valor del parámetro de ajuste \pm error del ajuste).

El método de la navaja consiste en registrar la potencia del haz con un medidor de potencia (Newport, 1918-C) mientras va siendo sistemáticamente bloqueado con una navaja de afeitar sujeta a una montura micrométrica. El proceso consisten en aplicar un desplazamiento conocido en la montura micrométrica y registrar la lectura del medidor de la potencia en la nueva posición de la navaja. El proceso se repite hasta que el haz es bloqueado completamente (Figura 2.4A).

La potencia se define como la integral de la distribución de la intensidad sobre la superficie donde se encuentra incidiendo el haz láser. Por lo tanto, lo que detecta el medidor de potencia dada una posición del borde de la navaja x equivale a la función error complementaria evaluada en ese punto:

$$\int_x^\infty I(z)dz = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_x^\infty e^{-(z-z_0)^2/2w^2(z)} dz + a_0 \quad (2.11)$$

donde a_0 es un valor residual (*offset*) del medidor de potencia, $I(z)$ es la distribución de la intensidad del láser y z_0 es el centro de la misma. En la Figura 2.4B se muestra un ejemplo de este procedimiento.

Estabilidad del láser

Para medir la estabilidad del láser se utilizó un fotodetector de posición (Pacific Silicon Sensor, modelo DL100-7PCBA2). El fotodetector de posición (FDP) es un dispositivo que proporciona una señal en volts por cada eje trasversal proporcional a la posición del centro de masa de la intensidad del haz (V_x y V_y , correspondientes a las direcciones x y y perpendiculares a la dirección z de propagación del láser) y una tercera señal voltáica V_z que es proporcional a la potencia del láser incidente.

La fuente del láser se colocó a una distancia conocida R respecto del FDP y se alineó de forma que la mancha del láser coincidiera con el centro de la placa fotodetectora. Se sujetó firmemente el cable de transmisión del láser a una mesa óptica (I-2000 Newport) para evitar cualquier inestabilidad adicional. Una vez hecho ésto, se registró la señal del FDP

CAPÍTULO 2. PINZAS ÓPTICAS: TEORÍA Y CONSTRUCCIÓN

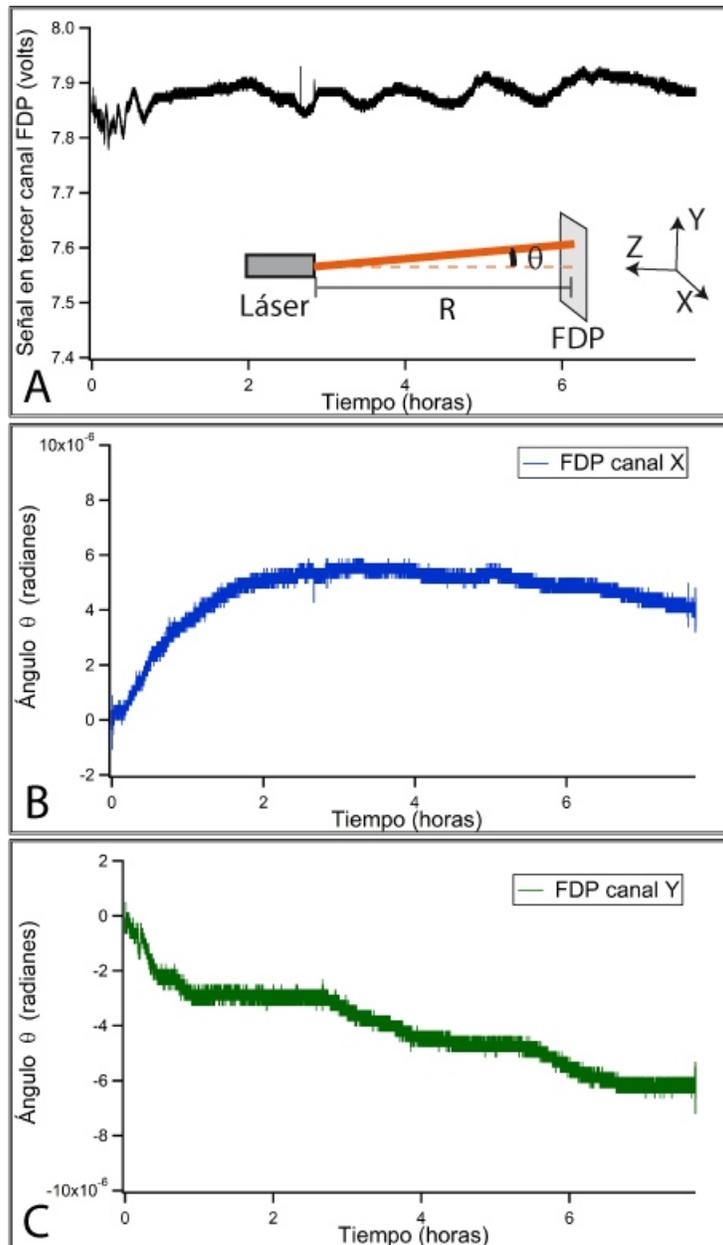


Figura 2.5: Caracterización de la inestabilidad de la potencia y apunte del láser. **Esquema:** La inestabilidad del láser se mide en términos de la desviación angular θ . El láser se sujetó a una mesa y se colocó a una distancia $R=2.71$ m del fotodetector de posición. El láser se alinea para que la mancha del láser inicialmente se encuentre en la posición del FDP. **A**, La señal del tercer canal registra las variaciones en la potencia del láser. En esta serie de tiempo las variaciones son del orden del 1%. **B** y **C**, Las desviaciones angulares del láser son determinadas por la siguiente relación: $\theta \approx \text{CatetoOpuesto}(C.O.)/\text{CatetoAdyacente}(C.A.)$, donde se ha hecho la aproximación para ángulos pequeños $\text{sen}(\theta) \approx \theta$. C.O. es la posición del láser detectada por el FDP y C.A. es la distancia R entre el láser y el FDP. Las desviaciones angulares máximas en estas series de tiempo son de $\approx 6 \mu\text{rad}$. Panel B en azul, señal en x . Panel C en verde, señal en y .

CAPÍTULO 2. PINZAS ÓPTICAS: TEORÍA Y CONSTRUCCIÓN

durante aproximadamente ocho horas (Figura 2.5).

Al tiempo $t = 0$, la lectura del fotodetector es: $V_x = 0$, $V_y = 0$ y $V_z = V_{z0} \neq 0$ al ser proporcional a la potencia del láser. Para cualquier tiempo t posterior, cualquier inestabilidad en el láser se reflejará en valores $V_x \neq 0$, $V_y \neq 0$ y $V_z \neq V_{z0}$. Los valores de V_x y V_y proporcionan información acerca de la estabilidad de apunte del láser mientras que V_z proporciona información acerca de la estabilidad de la potencia.

Para determinar la estabilidad de apunte en términos angulares, se requiere una calibración previa para convertir los voltajes del FDP en x y y a desplazamientos. La calibración de volts a milímetros se realizó sujetando el FDP sobre una montura micrométrica. El fotodetector se desplazó sistemáticamente en un eje dado (x o y) y en cada nueva posición se registró la lectura del FDP en el eje correspondiente. La respuesta del FDP fue lineal para los desplazamientos realizados. Finalmente, a los datos V_x vs. x y V_y vs. y , se les ajustaron rectas cuya pendiente es igual al coeficiente de conversión de unidades buscado. Los valores obtenidos² fueron $(\mathbf{0.49} \pm \mathbf{0.01}) \text{ V} \cdot \text{nm}^{-1}$ en el eje x y $(\mathbf{0.520} \pm \mathbf{0.002}) \text{ V} \cdot \text{nm}^{-1}$ en el eje y . Estas mediciones se muestran en las Figuras 2.5B y 2.5C, respectivamente. En un lapso de ~ 8 horas, la desviación máxima de la dirección de apunte original fue de ~ 6 microradianes tanto para el eje x como para el eje y . Estos valores se encuentran dentro del rango aceptable, ya que para un sistema de pinzas ópticas estándar, estas desviaciones equivaldrían a un desplazamiento en el plano de la muestra de unos pocos nanómetros [26].

La estabilidad en la potencia del láser se obtuvo a partir de la lectura de V_z . En esta medición la variación fue $\sim 1\%$ con respecto a su valor inicial (Figura 2.5A). En los ensayos de moléculas individuales es altamente deseable tener la menor variación posible en la potencia del láser para determinar la fuerza con exactitud ya que está directamente relacionada con la magnitud de las fuerzas que podemos ejercer sobre un objeto atrapado [10]. Por esta razón, la estabilidad del láser se mejoró después de la

²Valor de ajuste \pm error de ajuste

construcción de la pinza utilizando un mecanismo de retroalimentación que permite mantener la potencia constante con variaciones del orden del 0.01 %, véase la subsección *Control automatizado del sistema*.

2.3. Esquema de la pinza óptica.

El esquema más simple de una pinza óptica consiste en un láser y una lente objetivo como se muestra en la Figura 2.3. Aunque estrictamente esta configuración constituye una trampa, en realidad la apertura numérica efectiva del objetivo se vería altamente reducida debido a que el tamaño de la mancha del láser (para nuestro láser ~ 1.5 mm) no llena completamente la apertura trasera del objetivo (ATO, para nuestro objetivo ~ 6 mm). Supóngase que la AN del objetivo especificada por el fabricante es de 1.4. En estas condiciones el ángulo θ en la relación para la apertura numérica es más pequeño y la apertura numérica efectiva es aproximadamente 0.34. Este hecho ya sugiere la existencia de otras consideraciones necesarias para la construcción de una pinza óptica que no se incluyeron en este esquema tan simplificado.

En efecto, las pinzas ópticas son dispositivos relativamente complejos. A continuación describo cómo se construyó nuestro dispositivo y cada uno de sus componentes. Un esquema general se muestra en la Figura 2.6.

La construcción se realizó sobre una mesa óptica estabilizadora de flujo laminar (Newport, modelo I-2000), el láser de atrapamiento es un láser infrarrojo de Yterbio (Yb) previamente caracterizado (véase sección *Caracterización del láser*) y el objetivo es un Plan-Neofluar, 100x de inmersión de aceite (Carl Zeiss) con apertura numérica de 1.3. Para asegurar la estabilidad de la potencia del láser³ es necesario operarlo a potencias alrededor de ~ 4.2 W, lo cual se encuentra muy por encima de lo necesario para ensayos típicos de moléculas individuales ($\sim 80 - 100$ mW) [10, 47]. Para disminuir la potencia se utilizó una lámina retardadora de

³El fabricante (IPG-Photonics) únicamente garantiza la estabilidad de la potencia para valores mayores a 4 W.

CAPÍTULO 2. PINZAS ÓPTICAS: TEORÍA Y CONSTRUCCIÓN

cuarto de onda $\lambda/2$ seguida por un cubo polarizador (los componentes LR1 y CP1 en el esquema 2.6, respectivamente). El cubo polarizador da lugar a dos haces cuya potencia depende de la posición del eje principal de la lámina retardadora con respecto a la polarización original del láser. Girando la lámina polarizadora se obtuvo un haz con $\sim 90\%$ de la potencia original y otro con el $\sim 10\%$ restante. El haz con el 90% de luz, aproximadamente 3.8 W , es desechado al enviarlo a un absorbedor (en el esquema 2.6 representado por el componente ABS). El haz con los 420 mW restantes es dividido por segunda ocasión utilizando nuevamente una lámina retardadora $\lambda/2$ seguida por un cubo polarizador (componentes LR2 y CP2 respectivamente). Los nuevos haces son enviados por trayectorias distintas y eventualmente producirán dos trampas ópticas. El primer haz es enviado a un deflector acusto-óptico, lo cual nos permitirá desplazar el haz láser en el plano de muestra, formando una trampa móvil. El segundo haz conformará una trampa fija (esta última no será utilizada en nuestros ensayos).

A partir de este punto es posible dividir la construcción de la pinza en 3 secciones principales: **1.-** Alineación de la óptica para conformar la trampa móvil. **2.-** Construcción e implementación de la trampa en un microscopio invertido. **3.-** Control automatizado del sistema.

Alineación de la óptica para conformar la trampa móvil.

Los deflectores acusto-ópticos (DAO) son dispositivos que permiten deflectar un láser por un cierto ángulo. Están compuestos de un cristal, típicamente de dióxido de Telurio (TeO_2), unido a un transductor piezoeléctrico al cual se le aplica un voltaje de radio frecuencia. El transductor genera una onda acústica en el material que a su vez produce variaciones periódicas en el índice de refracción. Éstas funcionan como una rejilla de difracción que dan lugar a diferentes órdenes de difracción del haz. El primer orden de difracción puede contener típicamente hasta el 80% de la luz y es deflectado por un ángulo ϕ . El resto de la luz permanece sin ser difractada o bien se encuentra en otros órdenes de difracción. El ángulo de deflexión puede modificarse cambiando la frecuencia de la onda acústica. De hecho, un incremento en la frecuencia Δf es linealmente

CAPÍTULO 2. PINZAS ÓPTICAS: TEORÍA Y CONSTRUCCIÓN

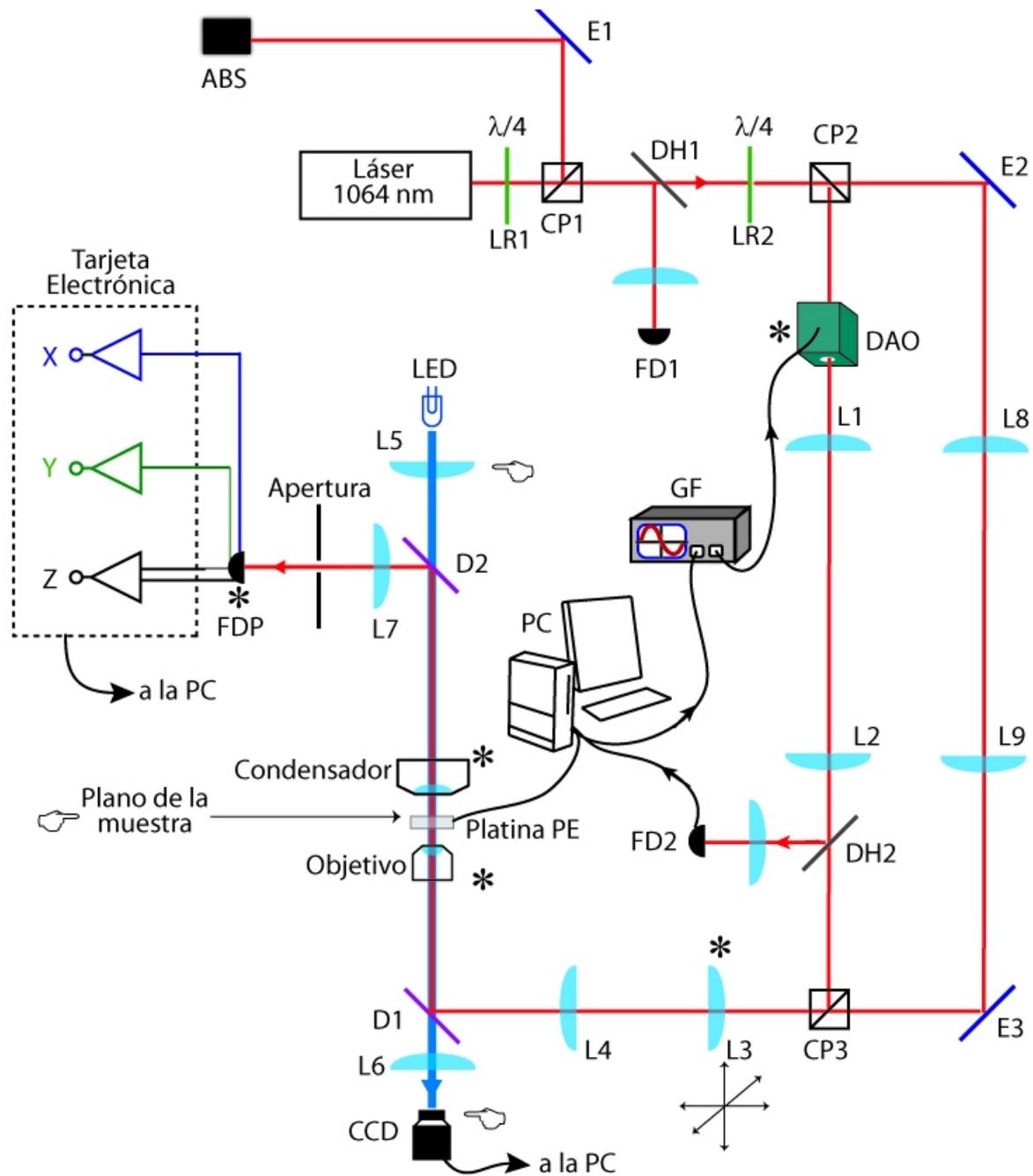


Figura 2.6: Esquema de la pinza óptica. Las líneas en rojo muestran la trayectoria óptica del láser. En azul, la luz de iluminación del LED. Los asteriscos (*) denotan planos conjugados entre sí. Los símbolos (R) denotan otro conjunto de planos conjugados. La caja con líneas punteadas representa la tarjeta electrónica de acoplamiento de impedancias. Las líneas curvas negras denotan cables de conexión a la PC. El sistema de retroalimentación se esquematiza con el circuito cerrado con flechas de flujo. Para más información de los componentes veáse el texto principal.

proporcional al incremento del ángulo $\Delta\phi$ si éste es pequeño [27]:

$$\Delta\phi \approx \lambda \frac{\Delta f}{V_a} \quad (2.12)$$

donde λ es la longitud de onda del láser y V_a es la velocidad de propagación de la onda en el cristal.

Por otro lado, la intensidad de la mancha en el primer orden de difracción (I') se modifica cambiando la amplitud de la onda de radiofrecuencia, de acuerdo a la siguiente relación [27]:

$$I' = I \sin(\sqrt{\alpha P}) \quad (2.13)$$

donde,

$$\alpha = \frac{\pi^2}{2\lambda^2} M \frac{L}{H} \quad (2.14)$$

para la cual, M es un parámetro que depende del material, P es la potencia de la onda acústica, L y H son la altura y el ancho de la misma.

En nuestra pinza se utilizó un DAO (IntraAction, modelo DTD-274HD6M) para modular la amplitud y dirección del haz en los ejes transversales x y y . El haz incide en la apertura trasera del DAO con una potencia de ~ 420 mW⁴. En ambos ejes se aplicó una onda de radiofrecuencia⁵ de 25 MHz y 525 mV de amplitud. Se conservó el orden de difracción (1,1), esta nomenclatura equivale a (primer orden en el eje x , primer orden en el eje y). Los demás órdenes de difracción fueron bloqueados con un diafragma. En nuestras calibraciones y en nuestros experimentos con ADN el haz deflectado tiene una potencia de unos ~ 90 mW justo antes de entrar al objetivo.

Cabe notar que el DAO permite realizar deflexiones angulares con respecto a la dirección original del haz. Sin embargo, en los ensayos de moléculas individuales lo que interesa es tener movimientos traslacionales en el plano de la muestra⁶ para poder aplicar tensión y deformación a

⁴La potencia en el brazo óptico de la trampa fija es igual a 0.

⁵Veáse subsección *Control automatizado del sistema* para más información.

⁶El plano de la muestra se ubica justo encima de la platina (Figura 2.6).

CAPÍTULO 2. PINZAS ÓPTICAS: TEORÍA Y CONSTRUCCIÓN

los biopolímeros. Para obtener movimientos traslacionales a partir de las deflexiones angulares del DAO se introdujeron otros componentes ópticos, los cuales se describen a continuación.

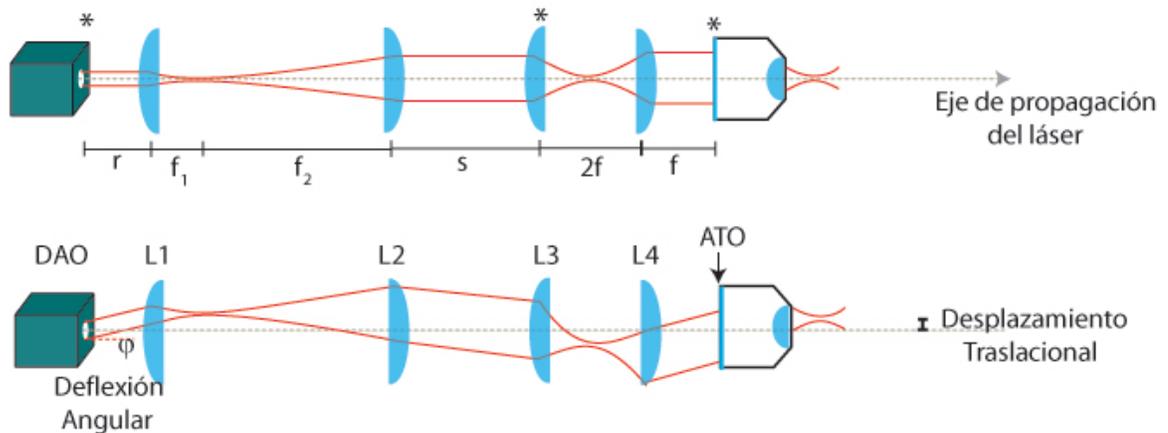


Figura 2.7: Esquema de una trampa móvil. **A**, Para obtener desplazamientos traslacionales a partir de las deflexiones angulares es necesario colocar el DAO y la apertura trasera del objetivo en planos conjugados (denotados con asteriscos (*)). Para que ésto ocurra los componentes ópticos deben encontrarse a distancias específicas. Algunas de ellas quedan determinadas por las distancias focales de las lentes. Las distancias r y s quedan completamente determinadas al elegir el valor de una de ellas. En este mismo esquema se muestra la propagación de un haz gaussiano a través de las lentes cuando éste no ha sido deflectado por el DAO. **B**, Una deflexión angular se convierte en un desplazamiento traslacional cuando atraviesa el conjunto de lentes.

Primero se introdujo un telescopio kepleriano 1:3.33 para expandir el haz (componentes L1 y L2 en la Figura 2.6). Como ya mencioné al inicio de esta sección, el tamaño de la mancha del haz es muy pequeño en comparación a la ATO. De acuerdo a la sección *Caracterización del láser*, a la salida de la fibra óptica, el tamaño de la mancha es tal que w es igual a 0.74 mm. Después de implementar este telescopio el valor de w se incrementa a $w = 2.47$ mm, es decir, el tamaño de la mancha, definido como $2w$ es de ~ 5 mm. Puesto que nuestro objetivo tiene una apertura trasera de 6 mm, la fracción de la potencia total colectada es aproximadamente del 91%. Ésto garantiza que ocupamos la apertura numérica del objetivo sin perder una fracción significativa de la potencia del láser.

El telescopio de expansión del haz forma cualquier imagen que se

CAPÍTULO 2. PINZAS ÓPTICAS: TEORÍA Y CONSTRUCCIÓN

encuentre en el plano del DAO⁷ en un plano cuya posición se encuentra a una distancia s de la lente L2, la cual depende de la distancia r del DAO a la lente L1. Las distancias s y r se determinan entre sí mediante la siguiente relación, obtenida a partir de la ecuación para lentes delgadas [22]:

$$r = \frac{1}{\frac{1}{f_1} - \frac{1}{(f_1 + f_2) - \frac{1}{\frac{1}{f_2} - \frac{1}{s}}}} \quad (2.15)$$

Si la distancia r se elige como $r = f_1$, entonces el valor de s queda determinado como $s = f_2$ (Figura 2.7A).

En nuestra configuración, el plano del DAO y el plano focal de la lente L2 son conjugados debido a que el primero es el plano objeto y es el segundo el plano imagen. Esto significa que la imagen en el plano del DAO es siempre la mancha del láser centrada, sin importar el ángulo de deflexión del haz. Asimismo, la imagen en el plano focal de L2 es también la mancha del láser centrada sin importar cuál es la dirección con la que incide el haz. A estos planos se les conoce como planos pivote del haz.

En la construcción de una pinza óptica es útil introducir un segundo telescopio denominado comúnmente telescopio de dirección (L3 y L4 en la Figura 2.6) [?]. Este telescopio es kepleriano 1:1 y una de sus funciones es crear un tercer plano conjugado al plano del DAO, donde se colocará la apertura trasera del objetivo (Figura 2.7). Para ello, una lente L3 se coloca en el plano focal de L2. Para formar el telescopio 1:1 se coloca una lente L4 a una distancia $2f$ con respecto a la posición de L3, donde f es igual a la distancia focal de L3 y L4. Las imágenes formadas en el plano de L3 se formarán a una distancia f de L4. El plano focal de L4 es conjugado al plano donde se ubica L3 y al plano del AOD. Por esta razón también es un plano pivote del haz y resulta una ubicación adecuada para que el haz incida en el objetivo. En este plano se coloca

⁷En realidad, justo a la salida del DAO.

CAPÍTULO 2. PINZAS ÓPTICAS: TEORÍA Y CONSTRUCCIÓN

la apertura trasera del objetivo (ATO).

El telescopio de dirección también facilita la alineación de la trampa (Figura 2.6). Como ya mencioné, la posición de la lente L3 es crucial para que se forme el plano conjugado donde se ubica la ATO. Por lo tanto, esta lente se sujeta a una montura micrométrica con movilidad en los 3 ejes lo cual permite realizar una alineación fina de la trampa.

El esquema descrito anteriormente permite entender cómo las deflexiones angulares del haz producidas por el DAO se transforman en movimientos traslacionales de la trampa: Puesto que los planos del deflector acusto-óptico y de la apertura trasera del objetivo son ópticamente conjugados, el haz incide en la ATO siempre en el mismo punto sin importar el ángulo de deflexión producido por el DAO. Ésto no sólo asegura que el haz no es obstruido por la ATO al cambiar el ángulo de incidencia, sino que también permite desplazar el punto focal traslacionalmente en el plano de la muestra como se muestra en la Figura 2.7.

La manipulación de objetos con el haz láser ahora es posible. Para desplazar objetos a voluntad en el plano transversal sólo es necesario aplicar deflexiones angulares a la dirección de propagación del láser a través del DAO.

Construcción e implementación de la trampa en un telescopio invertido

El objetivo es el componente más importante de la trampa debido a que la elección de éste determina completamente su eficiencia (rigidez en función de la potencia de entrada). La eficiencia de la trampa depende de la transmitancia, de la apertura numérica efectiva del objetivo y de correcciones para posibles aberraciones ópticas. La transmitancia se define como la fracción de la potencia de incidencia que es transmitida a través de las múltiples lentes que conforman a este dispositivo. En nuestro caso, el fabricante (Carl Zeiss) especifica que para una longitud de onda de 1064 nm, la potencia transmitida es de $\sim 30\%$. El objetivo plan-Neofluar, está corregido para aberraciones esféricas y cromáticas.

Con esta información se puede estimar la potencia del haz láser en la

CAPÍTULO 2. PINZAS ÓPTICAS: TEORÍA Y CONSTRUCCIÓN

trampa. Recuérdesse que la potencia del haz antes de entrar al objetivo es de ~ 90 mW. Si la luz colectada por el ATO corresponde al 91 % de la potencia total, aproximadamente ~ 82 mW entran al objetivo, de los cuales sólo ~ 25 mW son transmitidos por el objetivo.

El objetivo se integró a una configuración de microscopio invertido el cual incluye un sistema de iluminación y de video para la captura de imágenes. El microscopio invertido consta de los mismos componentes que un microscopio vertical pero se encuentran en orden inverso con respecto a la mesa de trabajo: un objetivo, una superficie de soporte para la muestra (platina), una lente condensadora y un sistema de iluminación y adquisición de imagen (Figura 2.6).

El sistema de iluminación consiste en lo siguiente: la muestra es iluminada con un sistema compuesto por un LED azul y una lente colectora que produce una imagen invertida y magnificada de la fuente de iluminación en la apertura trasera del condensador (ATC) (en la Figura 2.6, componentes L5 y LED). La luz emana de la lente condensadora como rayos paralelos con frente de onda plano y así atraviesa el plano de la muestra, o plano del espécimen, dando lugar a una iluminación brillante y homogénea. Lo anterior ocurre debido a que el plano de ubicación del LED es conjugado al plano de la ATC y recíproco al plano de la muestra [23]. A esta disposición de los componentes de iluminación se le conoce como iluminación de Köehler [23].

Después de atravesar la muestra, la luz de iluminación es colectada por el objetivo y enviada a una lente de proyección (L6 en la Figura 2.6). La lente forma la imagen del plano del espécimen en una cámara digital (CCD⁸) la cual produce una señal de video.

La trayectoria óptica del láser de atrapamiento se acopla con la de iluminación del microscopio mediante un espejo dicróico D1, el cual refleja la luz infrarroja y permite pasar la luz azul. Después de pasar por el condensador el haz del láser se desacopla del microscopio con un segundo

⁸Por sus siglas en inglés *Charged Coupled Device*

CAPÍTULO 2. PINZAS ÓPTICAS: TEORÍA Y CONSTRUCCIÓN

espejo dicroico D2.

La posición de los componentes del microscopio se calcularon de forma que el haz láser se enfoca justo después de la superficie de la platina, por lo que la trampa se forma encima del cubreobjeto y debajo del portaobjeto. El medio de inmersión del objetivo, en este caso aceite, determina en gran parte la distancia de trabajo de la trampa en el eje axial. Debido a la diferencia en los índices de refracción con el medio de la muestra (típicamente agua) la eficiencia de la trampa disminuye conforme nos adentramos en la solución de la muestra. En la práctica, las distancias de trabajo donde la trampa funciona en forma óptima se encuentra entre las $5 \mu\text{m}$ y $20 \mu\text{m}$ de distancia en el eje axial, medidas desde la última superficie de vidrio (cubreobjeto).

Finalmente, después de ser desacoplada del microscopio, la luz del láser es enviada a otra lente que forma la imagen del ATC en el plano donde se ubica el FDP para detectar los desplazamientos de la partícula atrapada. El método de detección, basado en la interferencia de la luz esparcida por el objeto atrapado con la luz no esparcida, resulta sensible a la posición del objeto con respecto al centroide de la mancha del láser (para ver mayores detalles del sistema de detección veáse el capítulo *Calibración de la pinza*).

Control automatizado del sistema.

La pinza óptica es controlada completamente por un sistema automatizado a través de una computadora. Las rutinas fueron escritas en LabView 8.5 (National Instruments) el cual es un ambiente de programación gráfico⁹ que permite desarrollar sistemas de control de dispositivos, adquisición de video y datos, entre muchas otras cosas. Es fácil integrar diversos dispositivos debido a que es usual que los fabricantes proporcionen los controladores para LabView. En caso de que no se proporcionen, es posible importar librerías creadas con otros lenguajes de programación y ejecutarlos en el ambiente gráfico.

⁹Utiliza cajas conectadas por cables en lugar de las líneas de comando habituales en los lenguajes de programación estándar (C++, fortrand).

Como se verá a continuación, el control automatizado de nuestra pinza recae principalmente sobre la platina y sobre el deflector acusto-óptico.

Movimientos automatizados con la platina

La platina que se utilizó es una platina piezoeléctrica de nanoposicionamiento (Mad City Labs, LP100). Este dispositivo contiene actuadores piezoeléctricos que son utilizados para mover una bandeja interior de la platina en las 3 dimensiones por distancias de hasta $100\ \mu\text{m}$ en cada eje. También contiene un sistema de sensores de alta resolución para corregir la histéresis de los actuadores piezoeléctricos dando lugar a desplazamientos con resolución nanométrica.

Los controladores de la platina permiten leer su posición actual u ordenarle un desplazamiento. Con estas dos acciones es posible realizar desplazamientos periódicos de acuerdo a una cierta señal (por ejemplo, una señal triangular, cuadrada, etc), definir velocidades a las que se mueve la platina, escanear linealmente las 3 dimensiones, entre otras cosas.

En particular, para optimizar las búsquedas en la muestra se sincronizó una palanca de mando (*Joystick*, Logitech modelo Attack3) con la platina. Los movimientos hechos sobre la palanca de mando son convertidos a desplazamientos en la platina. Este sistema es muy útil para atrapar objetos ya que es posible posicionar rápidamente un objeto de la muestra en el láser de atrapamiento.

Modulación de la potencia del láser automatizada

Como ya mencioné en la sección *Esquema de la pinza óptica*, el deflector acusto-óptico requiere como entrada una señal de radio-frecuencia (RF) en cada eje. La potencia de entrada requerida por el fabricante es de $0.5\ \text{W}$ para obtener el máximo de trasmisión y $\sim 0.3\ \text{W}$ para obtener el 50% de esta.

Las señales de radiofrecuencia se proporcionan a través de un cable coaxial con conectores BNC y puede generarse con dispositivos tales como

CAPÍTULO 2. PINZAS ÓPTICAS: TEORÍA Y CONSTRUCCIÓN

una computadora con un Convertidor Digital-Analógico o un generador de señales. En general, estos dispositivos tienen la propiedad de generar ondas con poco ruido, sin embargo, no están diseñadas para proveer grandes potencias. Una señal típica producida en estos aparatos es de 25 MHz de frecuencia con 500 mV de amplitud pico a pico, la cual tiene una potencia menos de 1 mW (~ 0.6 mW). Para satisfacer los requerimientos del fabricante se utilizaron dos amplificadores de RF de alta ganancia (24dB) en cada eje. La ganancia en decibeles se define de acuerdo a la siguiente relación:

$$Ganancia = 10 \log \left(\frac{W_s}{W_e} \right) \quad (2.16)$$

Donde W_s es la potencia de salida y W_e es la potencia de entrada.

Se comprobó que la señal de radiofrecuencia así amplificada es suficiente para producir el orden de difracción deseado. Aunque el control automatizado del DAO no es necesario para su funcionamiento, como lo es en el caso de la platina, sin embargo es muy útil para realizar modulaciones de la deflexión del haz y de su intensidad de forma automatizada. La modificación automatizada de la intensidad fue de gran utilidad en nuestros ensayos para mejorar la estabilidad de la potencia del láser como veremos a continuación.

En la sección *Caracterización del Láser* se mostró que las variaciones de la potencia del láser son significativas para el tipo de ensayos que se quieren realizar (Figura 2.5). Estas fluctuaciones pueden ser debidas a cambios de temperatura en el medio ambiente, fluctuaciones en la corriente de alimentación del láser, entre otras cosas. Una posibilidad para mejorar la estabilidad del láser es controlar las condiciones que acabo de mencionar. La segunda posibilidad es implementar un sistema de retroalimentación que controle la potencia del láser para mantenerlo alrededor de un valor constante¹⁰. Dado que la implementación de esta última es más directa, se eligió la segunda opción. El sistema de retroalimentación que se implementó se muestra en la Figura 2.6. En nuestro caso, un

¹⁰El criterio es que las variaciones se encuentren del rango aceptable en este tipo de ensayos

CAPÍTULO 2. PINZAS ÓPTICAS: TEORÍA Y CONSTRUCCIÓN

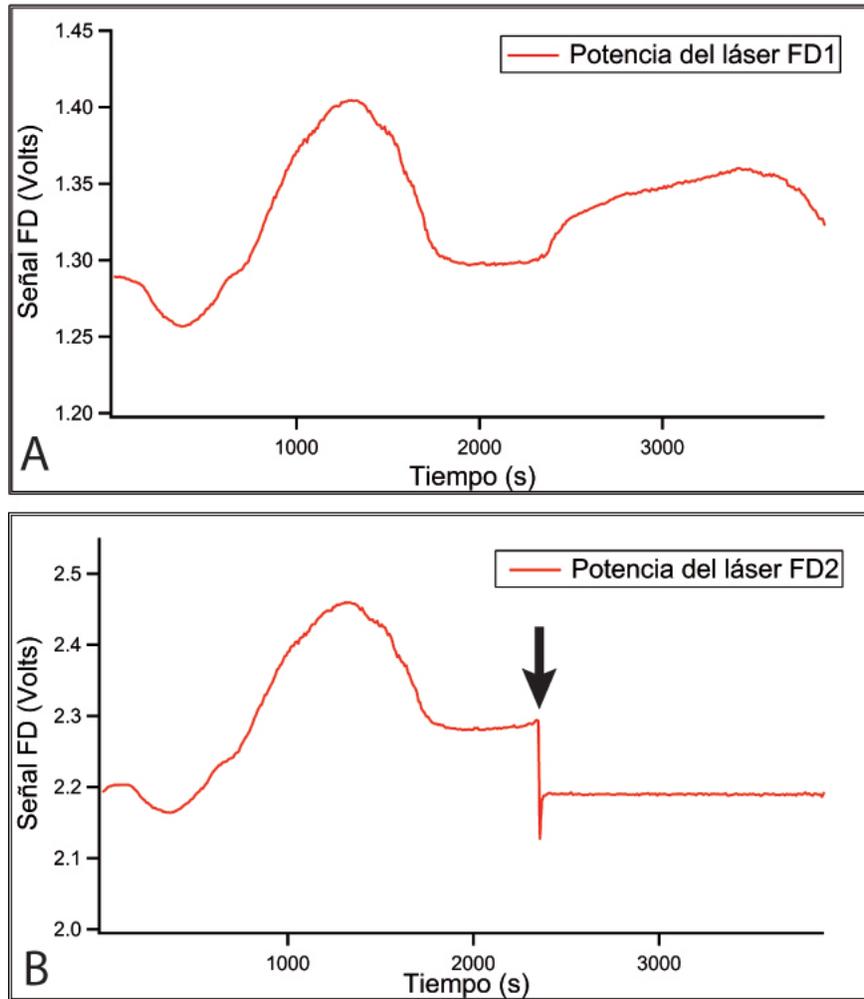


Figura 2.8: La potencia es estabilizada con un mecanismo de retroalimentación. **A**, La potencia del láser se monitorea con un FD (det110, thorlabs) antes de que incida en el DAO. En el esquema de la pinza éste corresponde al fotodetector FD1. En un lapso de un poco más de una hora, la señal del FD1 varía alrededor del $\sim 10\%$. **B**, La potencia es monitoreada después del DAO con otro FD al mismo tiempo que en el FD1 (en el esquema de la pinza, éste corresponde a FD2). Se inicia el mecanismo de retroalimentación (flecha negra). Las variaciones de la señal del FD2 disminuyen por debajo del 0.1% en un tiempo característico $\tau \approx 4\text{s}$. Este último se determinó ajustando una exponencial negativa a la señal inmediatamente después de iniciarse la retroalimentación. τ es el tiempo al cual la señal ha decaído por un factor $1/e$.

generador de funciones (GF), (AFG300, Tektronix) produce la señal de radiofrecuencia, la cual es enviada a la caja de amplificadores (ZHL-3A, 24dB) para obtener la potencia adecuada y finalmente se conectan al DAO. El generador de funciones a su vez es controlado por una computadora (vía una conexión USB) mediante una rutina implementada en

CAPÍTULO 2. PINZAS ÓPTICAS: TEORÍA Y CONSTRUCCIÓN

LabView. Esta rutina especifica la frecuencia y la amplitud que será enviada al DAO. El mecanismo de retroalimentación es muy simple: cuándo la potencia del láser varía, la computadora envía una señal al GF para que compense esta variación, ya sea aumentando o disminuyendo su amplitud de radiofrecuencia, lo cual tiene el efecto de aumentar o disminuir la potencia del láser de acuerdo a la ecuación 2.13.

La potencia del láser después del DAO se monitorea en todo momento con un fotodetector (DET110, Thorlabs), utilizando un divisor de haz a la salida del deflector (DH2 en la Figura 2.6). El haz principal sigue el curso normal de la trampa óptica. El haz reflejado por el divisor es enfocado en el FD (componentes L7 y FD2). Esta señal se envía a la computadora usando una tarjeta de adquisición de datos (Labjack, U12). Para implementar la retroalimentación, la computadora calcula la diferencia, ΔP , entre el valor de referencia y el valor de la potencia actual, y envía una señal determinada por un control PI al generador de funciones. Un control PI tiene una parte proporcional y una parte integral. En la parte proporcional, la computadora modifica el valor de la amplitud de la señal de radiofrecuencia por un valor proporcional a la diferencia ΔP y constituye un tipo de respuesta rápida a variaciones grandes en la potencia. La parte integral en cambio, es proporcional a la integración de las diferencias durante un cierto tiempo y esto permite hacer correcciones pequeñas y obtener un estado estacionario de la potencia.

Las constantes de proporcionalidad, k_P para la parte proporcional y k_I para la parte integral, se eligieron de forma que la respuesta a variaciones bruscas de la señal de entrada (en nuestro caso la señal del FD) sea suficientemente rápida, del orden de unos pocos segundos, y la razón de señal a ruido sea suficientemente buena (Figura 2.8) [24].

2.4. Tarjeta de Acoplamiento de impedancias

Como todo fotodiodo, el fotodetector de posición que se utilizó para detectar los desplazamientos de la esfera atrapada en nuestra pinza óptica, convierte una señal luminosa en una señal de corriente. Cuando un fotón con suficiente energía golpea la placa fotodetectora, excita a los electrones del material semiconductor y éstos pasan de la banda de valencia a la banda de conducción [25]. Generalmente, se convierte esta corriente eléctrica en voltajes para la captura y amplificación de la señal. En nuestro caso, la corriente del FDP es transformada en una señal de voltaje por medio de preamplificadores integrados al dispositivo. El FDP que se utilizó (Pacific Silicon Sensor, DL100-7PCBA2) tiene 4 señales de salida, las primeras dos corresponden a la posición del centroide del haz en los ejes x y y . Las últimas dos son proporcionales a la potencia con la que incide el haz y una es el negativo de la otra.

Por otro lado, en nuestro sistema se adquieren las señales mediante una tarjeta de adquisición de datos. Esta tarjeta captura señales analógicas de voltaje y las convierte a digitales mediante un convertidor analógico-digital (CAD). El modelo utilizado es el BNC-2090 (National Instruments).

Para conectar el fotodetector de posición a la tarjeta de adquisición de datos se debe tener en cuenta que, en general, cuando una señal es transmitida de un dispositivo 1 a un dispositivo 2 puede haber distorsiones debido a la diferencia de impedancias¹¹. La impedancia Z es una característica de cada dispositivo electrónico y es una medida de la oposición que presenta al paso de la corriente. Todo dispositivo electrónico tiene una impedancia de entrada Z_e y una impedancia de salida Z_s . Entonces, si se quiere transmitir la potencia de una señal, la impedancia de salida del dispositivo 1 debe ser igual a la impedancia de entrada del dispositivo 2 para que éste proceso sea óptimo. A diferencia del caso de la potencia,

¹¹En efecto, al conectar directamente el FDP a la TAD se vió una señal a ruido muy pequeña. La presencia de altas frecuencias sugirió que este ruido es debido a los dispositivos electrónicos.

CAPÍTULO 2. PINZAS ÓPTICAS: TEORÍA Y CONSTRUCCIÓN

la transmisión de una señal de voltaje es máxima cuando la impedancia de entrada Z_e del dispositivo 2 es mucho mayor que la impedancia de salida Z_s del dispositivo 1 ($Z_e \gg Z_s$).

Como ya mencioné, se requiere transmitir una señal de voltaje del FDP a la TAD. Para optimizar esta transmisión, fabriqué una tarjeta electrónica con amplificadores operacionales. Los amplificadores operacionales (Amp-Op) son circuitos electrónicos integrados que funcionan como amplificadores de voltaje de alta ganancia, veáse esquema la Figura 2.9A. Un Amp-Op tiene una impedancia de entrada Z_i muy grande ($\sim 1 \text{ M}\Omega$) y una impedancia de salida Z_o muy pequeña ($\sim 1 \Omega$). Se han elegido estos dispositivos ya que además de ser adecuados para la transmisión óptima del voltaje, también es posible realizar operaciones analógicas con las señales de entrada.

La tarjeta electrónica de acoplamiento de impedancias que fabriqué consiste en:

1. Un Amp-Op en configuración restadora, mediante el cual se realiza un promedio de las dos señales del FDP (V_{+p}, V_{-p}) proporcionales a la potencia. La configuración restadora (Figura 2.9B) proporciona un voltaje de salida que está dado como:

$$V_z = V_{+p} \left(\frac{(R_3 + R_1) R_4}{(R_4 + R_2) R_1} \right) - (-V_{-p}) \left(\frac{R_3}{R_1} \right) \quad (2.17)$$

Para obtener $V_z = V_{+p} - V_{-p}$, en la tarjeta se eligió $R_1 = R_2 = R_3 = R_4$. Como $V_{+p} = -V_{-p}$ este dispositivo opera una suma de los valores absolutos.

2. Tres Amp-Op en configuración inversora. Cada uno de ellos funciona como un amplificador para las señales V_x, V_y y V_z . La configuración inversora (Figura 2.9C) tiene un voltaje de salida está dado como:

$$V_s = -V_e \frac{R_f}{R_i} \quad (2.18)$$

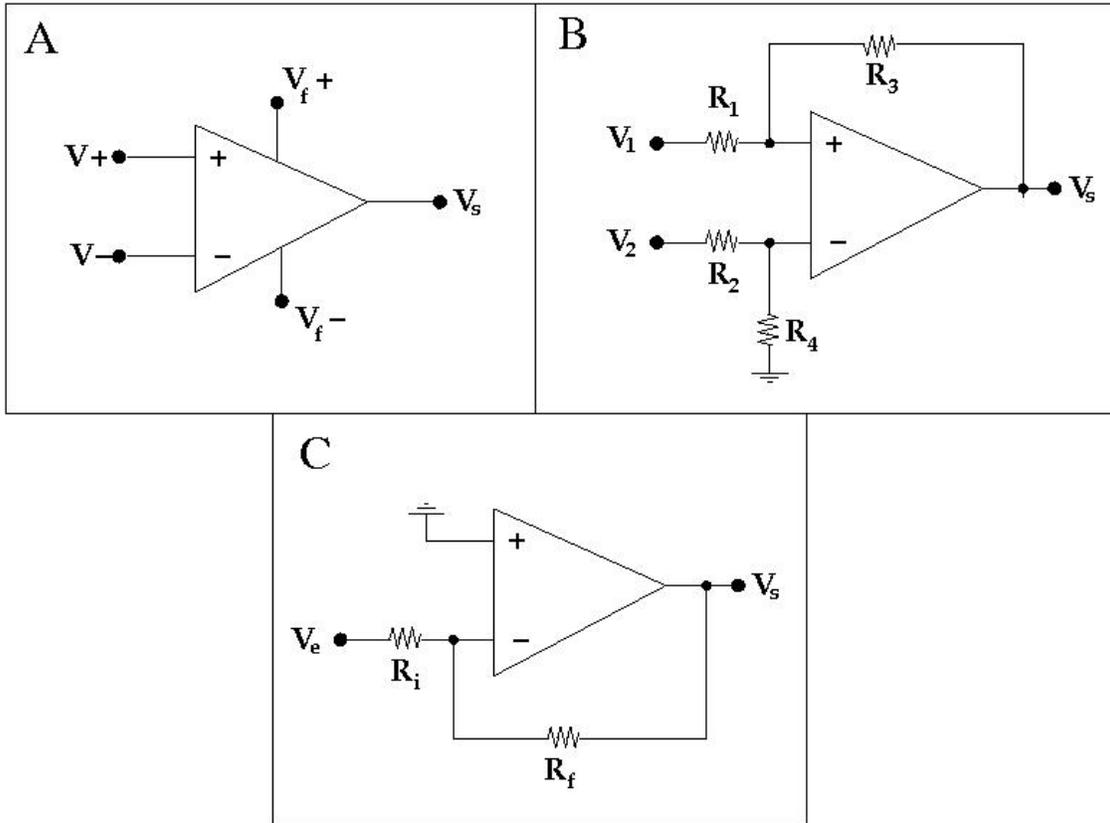


Figura 2.9: Amplificadores operacionales y configuraciones utilizadas. **A**, Un amplificador operacional es un circuito electrónico integrado compuesto por transistores. Tiene dos entradas: V_+ conocida como entrada no inversora y V_- conocida como entrada inversora. V_s es el voltaje de salida. Los Amp-Op funcionan con corriente continua de dos polaridades. En este esquema las entradas de alimentación son V_{f+} para la positiva y V_{f-} para la negativa. **B**, En la configuración restadora existen dos entradas para las señales que se van a operar: V_1 y V_2 . La impedancia de entrada es un impedancia diferencial que está dada por $Z_i = R_1 + R_2$. Este tipo de configuración es de baja impedancia de entrada comparada con otras configuraciones. El voltaje de salida es V_s y puede acoplarse con otras configuraciones más adecuadas para acoplamiento de impedancia. **C**, La configuración inversora tiene una única entrada V_e . Se denomina así debido a que el voltaje de salida V_s es igual a la de entrada pero invertida 180 grados. La impedancia de entrada Z_i es igual a R_i . Más información acerca de las configuraciones puede revisarse en la Referencia [33]

donde R_f/R_i es la ganancia. Las amplificaciones del voltaje de entrada se obtienen al elegir valores para las resistencias tales que $R_f > R_i$. En nuestro caso, la ganancia de cada uno de estas configuraciones se hizo variable. Para ello se acoplaron 4 resistencias R_f en paralelo por cada configuración inversora. A un tiempo dado, un interruptor de encapsulado en línea permite que sólo una de ellas esté conectada físicamente al circuito. Los 4 valores posibles de la

CAPÍTULO 2. PINZAS ÓPTICAS: TEORÍA Y CONSTRUCCIÓN

ganancia fueron: 1, 3.92, 8.33 y 39.6. En todas las mediciones la ganancia de operación fue de 3.92.

3. Proporcionar la energía de alimentación para el FDP. Una fuente de dos polaridades a +12V y -12V es la alimentación recomendada por el fabricante del FDP. Los amplificadores operacionales requieren alimentación de dos polaridades: +15V y -15V, véase la Figura 2.9A. Estos voltajes conectados a la tarjeta electrónica se convierten con dos reguladores de voltaje a los +12V y -12V requeridos para alimentar al FDP .

La tarjeta electrónica se diseñó con Software de diseño para tarjetas electrónicas de circuito impreso (*Printed Circuit Board* en inglés.) EAGLE y se imprimió con una máquina de desvastado para impresión de circuitos electrónicos (Protomat-M60, LPKF) en una tarjeta de fibra de vidrio con recubrimientos de cobre a doble cara. El diagrama de la conexión de los componentes electrónicos se muestra en la Figura 2.10. En la Figura 2.11A se muestra el esquema de las pistas que se imprimieron en ambas caras. En la Figura 2.11B se muestra una fotografía de la tarjeta electrónica terminada.

CAPÍTULO 2. PINZAS ÓPTICAS: TEORÍA Y CONSTRUCCIÓN

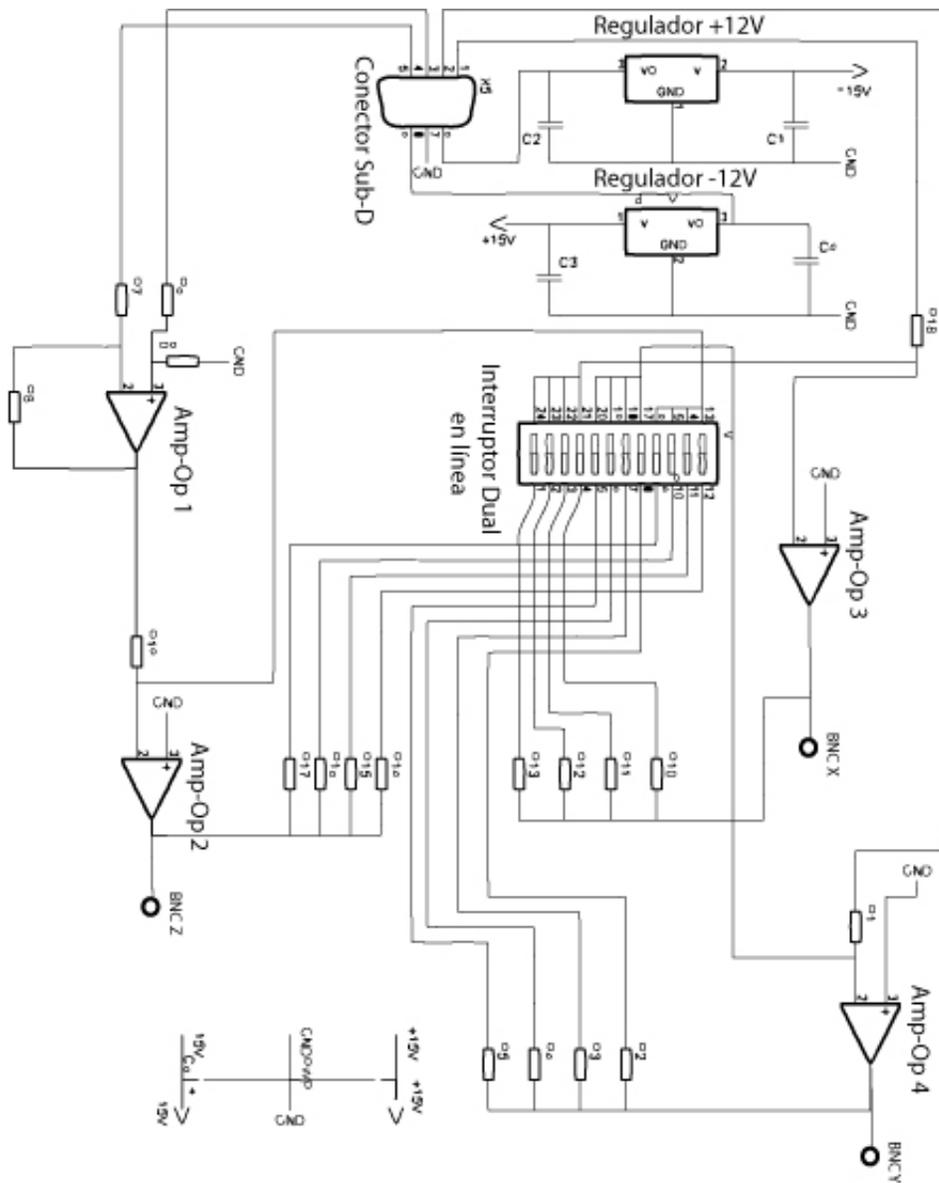


Figura 2.10: Diagrama de conexiones para los distintos componentes de la tarjeta de acoplamiento de impedancias. Todos los Amp-Op son modelo TL081CN (ST Microelectronics). La configuración restadora está conformada por Amp-Op1. Las configuraciones inversoras están conformadas por Amp-Op2 para el promedio de los canales 3 y 4, Amp-Op3 para el canal X y Amp-Op4 para el canal Y. El interruptor dual en línea controla las resistencias que estarán conectadas al circuito y con ello controla las ganancias en la amplificación de las señales. Los reguladores de voltaje se utilizaron con capacitores de $0.33\mu F$, +12V modelo L7812V (ST Microelectronics), -12V modelo L7912CV (ST Microelectronics). La conexión del FDP a la tarjeta de acoplamiento de impedancias se realiza a través de un conector sub-D. Con éste se alimenta al FDP y se reciben las señales del mismo. Los conectores BNC transmiten los datos a la tarjeta de adquisición de datos. La alimentación de +15V y -15V fue filtrada con capacitores cerámicos de $470\mu F$.

CAPÍTULO 2. PINZAS ÓPTICAS: TEORÍA Y CONSTRUCCIÓN

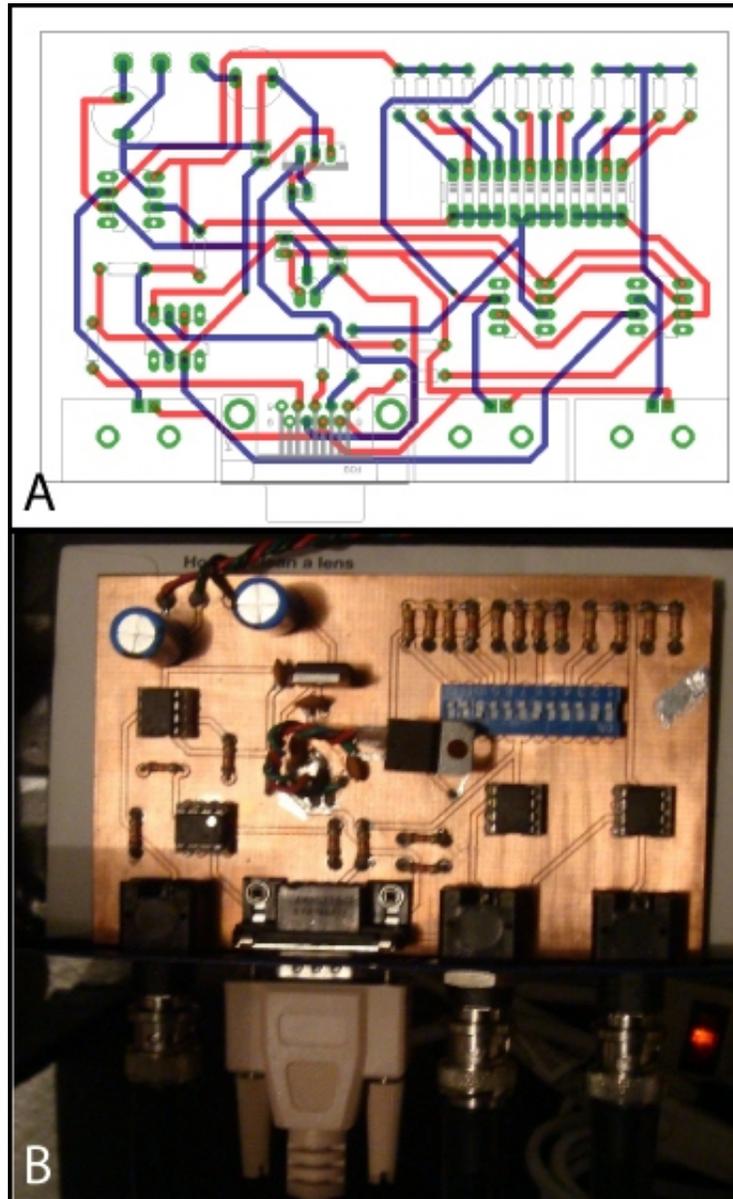


Figura 2.11: Tarjeta electrónica de circuito impreso. **A**, Esquemático de las pistas de conducción para la tarjeta de circuito impreso. En azul las pistas a imprimir sobre la cara superior de la tarjeta. En rojo las pistas a imprimir sobre la cara inferior de la misma. Los dispositivos electrónicos se esquematizan en líneas delgadas en color verde. Los círculos con línea verde ancha son almohadillas para contener la soldadura de los componentes. **B**, Fotografía de la tarjeta de acoplamiento de impedancias. Se adaptó dentro de una caja metálica para disminuir el ruido debido a otras ondas electromagnéticas presentes en el ambiente. Aquí se muestra conectada al FDP a través del conector sub-D y a la TAD a través de los conectores BNC.

Calibración de la pinza óptica

Para obtener las curvas de fuerza-extensión de macromoléculas biológicas por medio de la técnica de pinzas ópticas es necesario determinar las fuerzas que la pinza ejerce sobre el objeto que se atrapa (en nuestro caso esferas de poliestireno). De acuerdo a la teoría discutida en el capítulo anterior, el atrapamiento ocurre debido a que las fuerzas de gradiente y de esparcimiento producen un punto de equilibrio estable que corresponde a un mínimo del potencial de la trampa. Localmente este mínimo puede aproximarse a un potencial armónico y por lo tanto existe una región donde la fuerza es proporcional al desplazamiento. Si se conocen los desplazamientos con respecto al punto de equilibrio \mathbf{r}_0 , la fuerza puede ser completamente caracterizada en cada eje por medio de una constante κ análoga a la que caracteriza a los resortes en la ley de Hooke: $F_x = -\kappa_x x$, en el eje x y similares expresiones para los ejes y y z .

Para conocer las fuerzas que la trampa ejerce sobre el objeto atrapado es necesario calibrar:

1. Los desplazamientos del objeto con respecto al centro de la trampa.
2. La constante de proporcionalidad κ en cada eje.

Como expliqué en la sección *Esquema de la pinza óptica*, la detección de la posición del objeto atrapado se realiza a través del láser de atrapamiento que además funciona como láser de detección al incidir en el FDP. Pero, ¿cómo recuperamos los desplazamientos de la esfera a partir

CAPÍTULO 3. CALIBRACIÓN DE LA PINZA ÓPTICA

de la señal del FDP?

Como ya describí en el capítulo anterior, después de atravesar una esfera dieléctrica, la luz sufre un cambio en la dirección de propagación. Este hecho nos permite conocer los movimientos en x y y de la esfera si registramos los cambios de dirección del haz. En la condición de equilibrio la esfera se encuentra en el centro de la trampa, por lo que el haz emergente del otro lado de la esfera no cambia su dirección de propagación. El FDP se alinea de forma que el centroide¹ del haz se encuentra justo en el centro del fotodetector, véase Figura 3.1. El FDP da una lectura en volts que refleja esta condición: $V_x = 0$, $V_y = 0$, indican que la posición del centroide se encuentra en el centro de la placa fotodetectora y la tercera señal, $V_z \neq 0$, es un voltaje proporcional a la potencia. Cualquier desplazamiento² de la esfera desvía el haz debido a la diferencia entre los índices de refracción de ésta y el medio en el que se encuentra (Figura 2.1). El centroide del haz ahora se encuentra en un punto diferente como se esquematiza en la Figura 3.1. La lectura en el FDP refleja la nueva posición fuera del equilibrio: $V_x \neq 0$, $V_y \neq 0$.

La discusión anterior permite entender cómo es posible medir desplazamientos transversales. Los desplazamientos en el eje z se detectan a través del tercer canal del FDP por un método diferente al de los ejes x y y . Recuérdese que las esferas funcionan como una pequeña lente que puede enfocar el haz. Los desplazamientos en el eje z con respecto al punto de equilibrio producen que el haz se enfoque antes o después del punto donde lo hacía originalmente. La trayectoria del haz hasta llegar al fotodetector será más larga o más corta según la posición del nuevo foco. Debido a la divergencia del haz, la mancha del láser incidente en el FDP será más grande o más pequeña. Dado que la potencia en todos los casos es la misma, la intensidad de la mancha es mayor cuando la mancha es pequeña y menor cuando la mancha es grande. La señal del tercer canal es proporcional a la potencia y por ello no depende del tamaño de la mancha si se colecta toda la luz. Es decir, no es sensible al movimiento

¹En realidad el centro de masa de la distribución de la intensidad. Para distribuciones con simetría radial, ésta corresponde al centro geométrico o centroide.

²Sin pérdida de generalidad considérese una desviación en ambos ejes simultáneamente.

CAPÍTULO 3. CALIBRACIÓN DE LA PINZA ÓPTICA

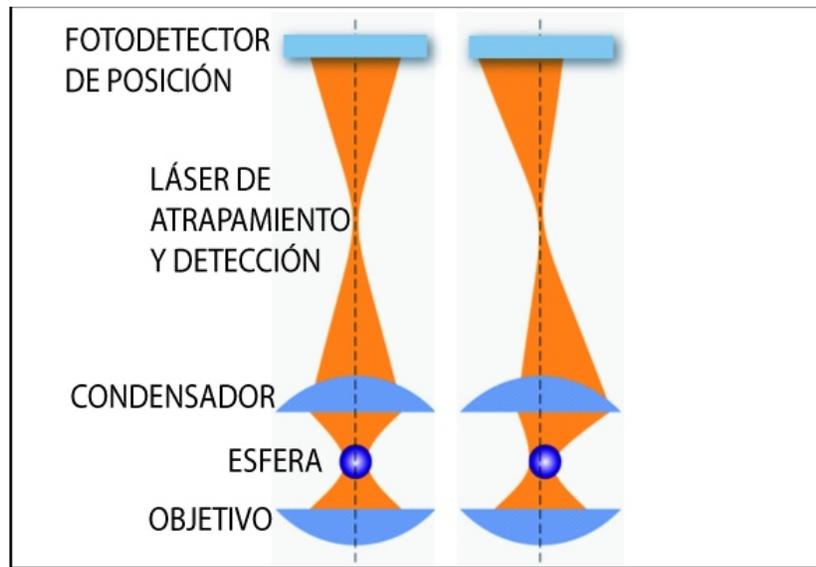


Figura 3.1: Detección del desplazamiento en los ejes x y y . El fotodetector de posición registra el centro de masa de la distribución de intensidad del haz láser. Cuando se encuentra en el punto de equilibrio el haz incide directamente en el centro de la placa fotodetectora. El cambio en la posición de la esfera produce una desviación del haz de su trayectoria original (línea punteada) de forma que el centroide se encuentra en una nueva posición. El FDP no mide los desplazamientos del centroide con respecto al centro del FDP en unidades de distancia. En cambio entrega una señal en volts que refleja su posición en los ejes x y y . La tercera señal del FDP es la misma en ambos casos ya que es proporcional a la potencia del haz incidente y ésta no es dependiente del lugar donde incide. La posición en z se determina con otro método descrito en el texto principal.

de la esfera en el eje axial. Para tener sensibilidad a los desplazamientos en z se introdujo un diafragma justo antes del fotodetector (Figura 2.6) el cual permite colectar sólo un cierto cono de luz (Figura 3.2). Si la apertura del diafragma se cierra mucho, la sensibilidad en el eje z aumenta, sin embargo, una buena porción de la información de lo que ocurre en el plano transversal se está perdiendo en la luz que no colectamos. El tamaño de la apertura del diafragma se elige de forma que exista un buen compromiso entre la calidad de las señales en x y y y la de ésta última [10].

Hasta ahora se ha descrito cómo se detectan los desplazamientos de la esfera en el plano transversal (eje x y y) y en el eje axial (z). Como ya mencioné, el FDP da una lectura de los desplazamientos de la esfera en unidades de voltaje (Volts), sin embargo, lo que interesa es conocerlos en unidades de distancia. Obtener los desplazamientos en unidades de distancia es directo si la respuesta del FDP es proporcional a los despla-

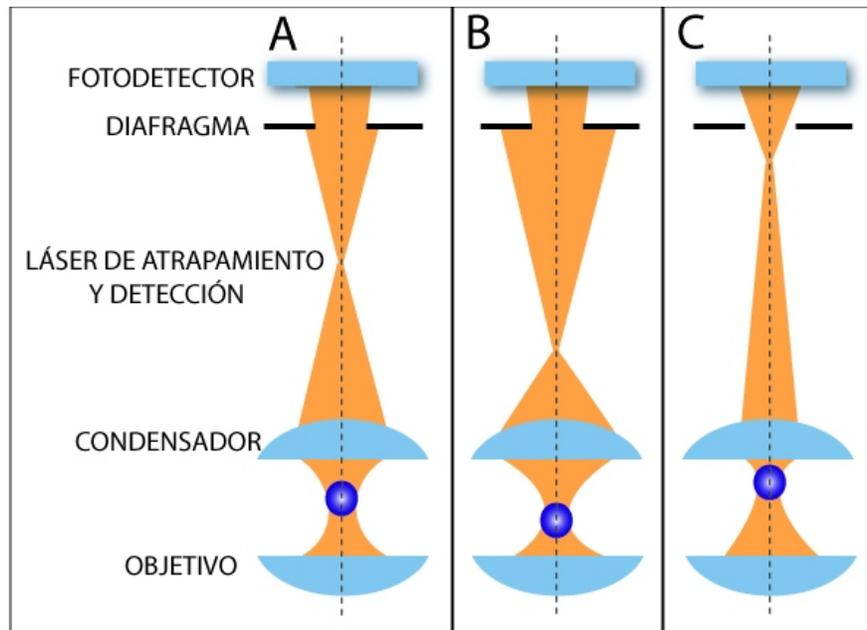


Figura 3.2: Esquema de detección de la posición en el eje axial. Para tener sensibilidad en la posición del eje axial se coloca un diafragma justo antes del fotodetector. **A**, Cuando la esfera se encuentra en la posición de equilibrio una cierta fracción del total del haz pasa por el diafragma e incide en el fotodetector. El FDP da una respuesta proporcional a la potencia de la fracción del haz incidente. **B**, El haz es enfocado por debajo del foco original si la esfera es desplazada por una fuerza externa hacia abajo de la posición de equilibrio. Ésto produce una mayor divergencia del haz y la distrución de la intensidad es más amplia. Para la misma apertura en el diafragma, la potencia del haz incidente es menor debido a que la intensidad de la luz es menor. **C**, Si la esfera es desplazada por encima de la posición de equilibrio el haz es enfocado después del foco original y por ello la divergencia del haz es menor. Al llegar al diafragma, el ancho del haz es suficientemente pequeño y toda la luz pasa por el diafragma. La cantidad de luz colectada es mayor y por ello la potencia del haz incidente es mayor.

zamientos ya que la conversión es tan simple como multiplicar por una constante.

Como se verá en seguida, el método de detección que se utilizó en la pinza no es completamente lineal, sin embargo hay una región alrededor del punto de equilibrio donde la respuesta del FDP es proporcional al desplazamiento. A continuación describiré el método que se utilizó para calibrar al FDP.

3.1. Calibración del FDP

El método de calibración del FDP consiste, básicamente, en desplazar un objeto a distancias conocidas alrededor del punto de equilibrio y medir

CAPÍTULO 3. CALIBRACIÓN DE LA PINZA ÓPTICA

la respuesta del FDP. Una vez determinada la región donde la respuesta del FDP es lineal, se encuentra el coeficiente de proporcionalidad de conversión de unidades de Volts a nanómetros. Este procedimiento se dividió en tres secciones u objetivos:

1. Determinación del punto de equilibrio o centro de la trampa.
2. Determinación del tamaño de la región lineal del FDP.
3. Determinación de los coeficientes de proporcionalidad para la conversión de unidades.

Actualmente existen procedimientos convencionales para llevar a cabo la calibración del FDP y pueden revisarse más extensamente en [9], [10].

3.1.1. Determinación del punto de equilibrio

Las esferas de poliestireno que utilizamos para la calibración son de dos tipos: **1.-** Esferas sin movimiento unidas de manera no específica a la superficie de vidrio (cubreobjeto). **2.-** Esferas que se encuentran difundiendo en solución.

Las esferas unidas al cubreobjeto son ideales para realizar desplazamientos conocidos de una forma controlada a través de la platina piezoeléctrica (veáse sección *Control automatizado del sistema*). A diferencia de las esferas atrapadas en solución, donde encontrar el punto de equilibrio es trivial³, en las esferas unidas al cubreobjeto éste es un proceso iterativo que consiste en encontrar el centro de la trampa en los ejes transversales, seguido de un proceso análogo para el eje axial. El proceso se repite hasta que las trazas en cada eje son simétricas. En general, es suficiente aplicar el procedimiento 3 veces.

Determinación del centro de la trampa en el plano transversal

³Basta con posicionarla en el haz del láser para que las fuerzas de gradiente y esparcimiento la atrapen ubicándola en el punto de equilibrio.

CAPÍTULO 3. CALIBRACIÓN DE LA PINZA ÓPTICA

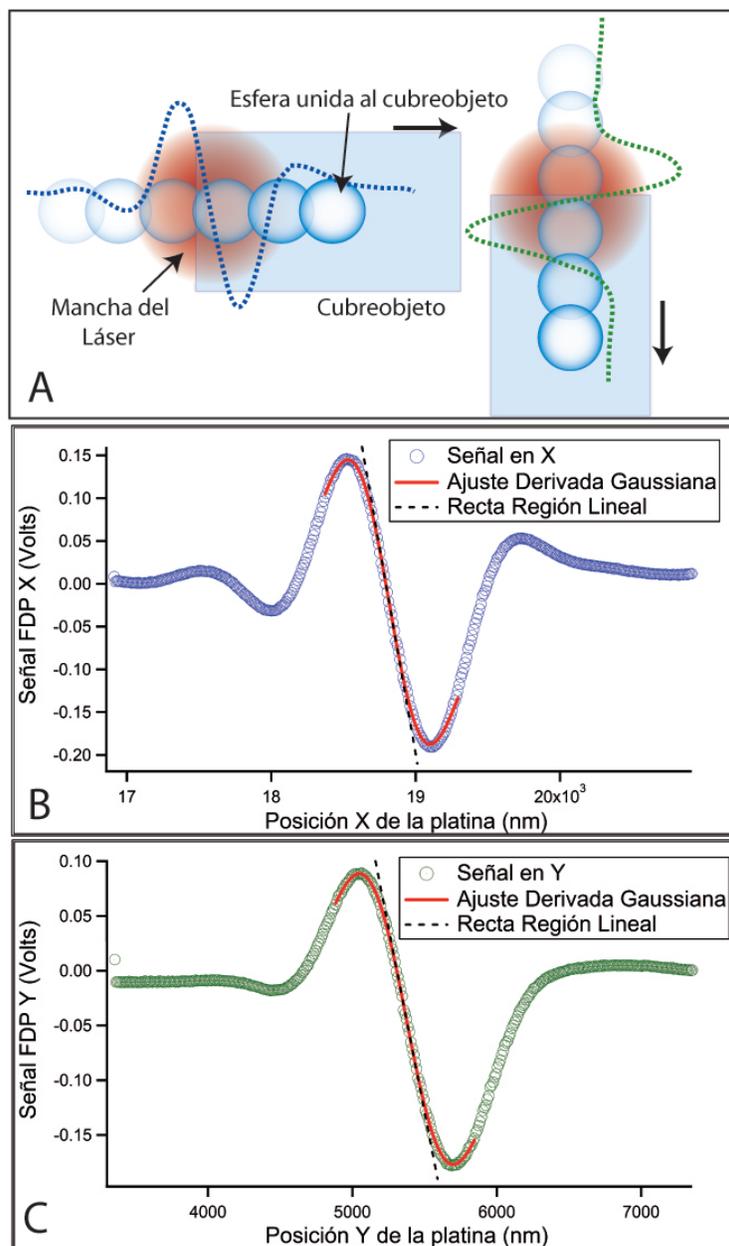


Figura 3.3: Determinación del centro de la trampa en el plano transversal. **A**, La esfera unida al cubreobjeto es trasladada a través de la mancha del láser. Mientras la esfera se desplaza en un eje, la computadora va registrando la señal del canal correspondiente del FDP. Una rutina escrita en LabView automatiza el proceso y ajusta la función derivada de la Gaussiana a las trazas resultantes. **B**, y **C**, Trazas resultantes de trasladar la esfera a través de la mancha del haz en los ejes x y y respectivamente; Marcadores redondos en azul para la señal del FDP en el eje x y en verde para el eje y . El ajuste (ecuación 3.1), se muestra como una línea sólida en rojo en ambos casos. Este ajuste además define una recta que pasa por su centro con pendiente $\frac{a}{\sigma^2}$ (línea punteada en negro).

CAPÍTULO 3. CALIBRACIÓN DE LA PINZA ÓPTICA

La esfera se coloca con la palanca de mando en el lugar donde se encuentra la mancha del láser. La esfera se traslada a través de la mancha del láser moviendo la platina una distancia d conocida en los ejes x y y como se muestra en la Figura 3.3A. Este proceso se hace completamente automatizado con una rutina escrita en LabView. Una corrida típica en el eje x se comienza desplazando la esfera $1.6 \mu\text{m}$ hacia la izquierda de la posición inicial de la esfera. La platina se desplaza en intervalos de 10 nm y se registra la lectura del canal x del FDP en cada nueva posición durante 1 ms . Esta acción se repite hasta que la esfera se encuentra a $1.6 \mu\text{m}$ a la derecha de la posición inicial. El proceso completo dura unos 5 s y se repite enseguida para el eje y .

A las trazas resultantes⁴ de este proceso se les ajusta la función derivada de una Gaussiana para determinar el centroide de la mancha como se ve en las Figuras 3.3B y 3.3C. Para el eje x , la función derivada de la Gaussiana está dada como:

$$f(x) = v_0 + \frac{A}{\sigma^2}(x - x_0)e^{-(x-x_0)^2/2\sigma^2} \quad (3.1)$$

El parámetro de ajuste x_0 corresponde al centro de la función. El centro de la trampa es el centroide de la mancha y por ello x_0 es la posición de equilibrio en el eje x . El caso para y es completamente análogo. Finalmente, la platina es desplazada al centro encontrado con coordenadas (x_0, y_0) .

Determinación del centro de la trampa en el eje axial

En un proceso similar al ya descrito para los ejes x y y , la esfera unida al cubreobjeto también es trasladada una distancia d pero esta vez a lo largo del eje axial (Figura 3.4A). Este procedimiento se encuentra incorporado en la rutina para encontrar el centro en el plano trasversal y es idéntico salvo que en este caso comienza desplazándose hacia abajo $1.6 \mu\text{m}$ y termina a $1.6 \mu\text{m}$ por encima de la posición original de la platina. La traza así obtenida se muestra en la Figura 3.4B. Se realiza un ajuste Gaussiano para encontrar el centro de la función, su máximo y su

⁴Todas las rutinas escritas en Labview despliegan la traza y el ajuste en forma superpuesta en una ventana de la interfaz gráfica. Los datos son guardados en un archivo de texto.

CAPÍTULO 3. CALIBRACIÓN DE LA PINZA ÓPTICA

mínimo, sin embargo la posición de equilibrio no corresponde al centro de la misma. La posición de equilibrio se determina como la posición en z para la cual el voltaje es el 91 % del valor máximo (Figura 3.4A).

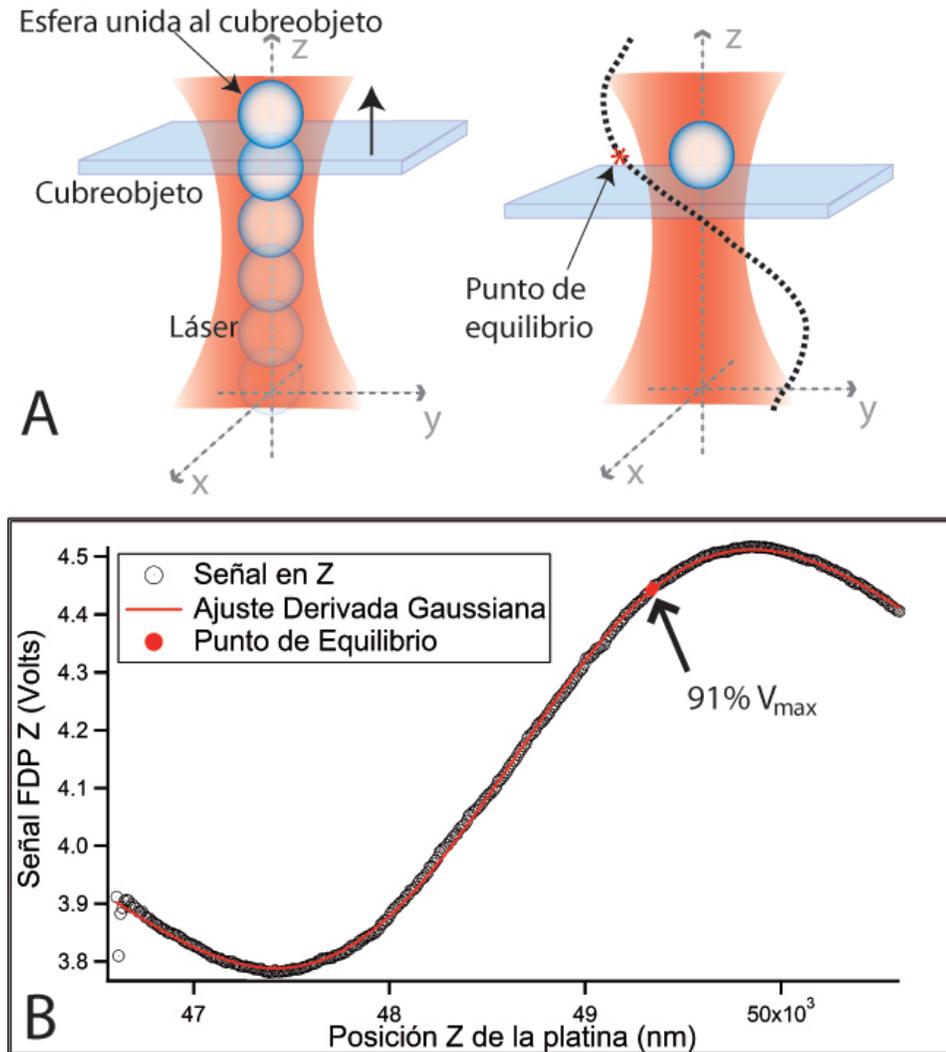


Figura 3.4: Procedimiento para determinar la posición de equilibrio en el eje axial. **A**, izquierda Una esfera unida al cubreobjeto es desplazada en el eje axial alrededor del foco. derecha La computadora registra la señal del canal z del FDP. Se determina la posición de equilibrio como la posición para la cual se tiene el 91 % del valor máximo del voltaje, denotado aquí con un asterisco rojo. Finalmente la platina se lleva a esta posición. **B**, Traza obtenida al trasladar la esfera en el eje z alrededor del foco, marcadores redondos en negro. Se determina los valores del voltaje mínimo y máximo mediante el ajuste de la derivada de la función Gaussiana, línea sólida en rojo. La posición de equilibrio corresponde a la posición para la cual la señal es el 91 % del voltaje máximo V_{max} .

Pero, ¿Cómo se determinó que la posición de equilibrio es la corres-

CAPÍTULO 3. CALIBRACIÓN DE LA PINZA ÓPTICA

pondiente al 91 % del valor máximo del voltaje? A diferencia del plano transversal, donde el punto de equilibrio es trivial ya que corresponde al centroide de la mancha del láser, en el eje axial la posición de equilibrio es menos obvia debido a que la fuerza de esparcimiento empuja a la esfera más allá del foco situándola en una posición asimétrica en el eje axial.

Esta nueva posición de equilibrio se determinó por comparación con una esfera atrapada en solución de acuerdo al siguiente procedimiento:

1. Con la palanca de mando atrapamos una esfera en solución. La platina se desplaza verticalmente (veáse la Figura 3.5A) hasta que el cubreobjeto hace contacto con la esfera atrapada y es acarreada por la superficie de vidrio, como se esquematiza en la Figura 3.5B. Este proceso se realiza de forma automatizada con una rutina escrita en LabView. En una corrida típica, la platina se desplaza 10 nm hacia arriba (partiendo de la posición inicial de la platina) y se registra la lectura del canal z del FDP en esa nueva posición. Esta acción se repite hasta completar una distancia total L de muestreo que se define en la interfaz gráfica de la rutina (típicamente $2 \mu\text{m}$ - $4 \mu\text{m}$). La traza obtenida con este procedimiento se denomina *Perfil en z de la esfera atrapada*, veáse la Figura 3.5D.
2. Es común que al hacer contacto con el cubreobjeto la esfera se quede unida a la superficie de vidrio. En este caso, cuando la platina es retraída a su posición original se lleva consigo a la esfera ahora unida al cubreobjeto, veáse la Figura 3.5C.
3. La platina se desplaza nuevamente hacia arriba con la rutina descrita en el punto 1. La traza que se obtiene en esta ocasión se denomina *Perfil en z de la esfera unida al cubreobjeto* (Figura 3.5D).
4. Ambas trazas se superponen. Coinciden a partir del punto donde la esfera atrapada es acarreada por el cubreobjeto. Este primer punto de intersección de las trazas (yendo de la izquierda hacia la derecha en la Figura 3.5D) es el punto de equilibrio en z .
5. Este punto define el porcentaje p del voltaje máximo en el *Perfil en*

CAPÍTULO 3. CALIBRACIÓN DE LA PINZA ÓPTICA

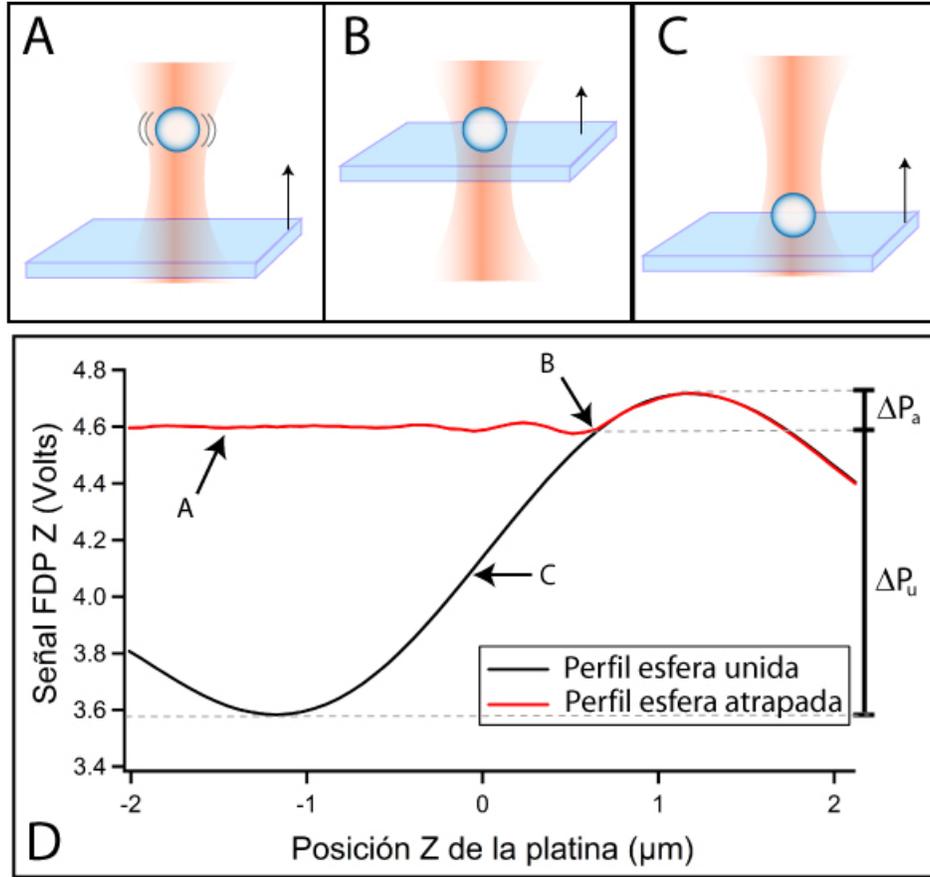


Figura 3.5: Determinación de la posición de atrapamiento en el eje z . **A**, Se atrapa una esfera en solución. La platina se mueve hacia arriba a lo largo de una distancia L de muestreo. **B**, La superficie de vidrio choca con la esfera y la acarrea el resto de la distancia de muestreo. En algunos casos la esfera se une de forma inespecífica a la superficie del cubreobjeto. **C**, La platina es retraída a su posición original llevándose consigo a la esfera unida al cubreobjeto. La platina se desplaza nuevamente hacia arriba la misma distancia L que en el muestreo anterior. **D**, La línea sólida en rojo corresponde al *Perfil en z de la esfera atrapada*. La letra A con flecha en negro indica la sección de la traza obtenida con el procedimiento descrito en el panel A. La letra B con flecha en negro indica el punto donde la esfera comienza a ser acarreada por el cubreobjeto después de haber chocado con él. Este punto define la posición de equilibrio en z para una esfera unida al cubreobjeto. La línea sólida en negro corresponde al *Perfil en z de la esfera unida al cubreobjeto*. La letra C con flecha en negro indica la traza obtenida con el procedimiento esquematizado en el panel C.

z de la esfera unida al cubreobjeto, el cual corresponde a la posición de equilibrio de una esfera atrapada. Se define como sigue:

$$p = 100 \times \left(1 - \frac{\Delta P_a}{\Delta P_p} \right) \quad (3.2)$$

CAPÍTULO 3. CALIBRACIÓN DE LA PINZA ÓPTICA

donde ΔP_p es el voltaje de diferencia entre el valor máximo y mínimo del perfil de la esfera unida al cubreobjeto, ΔP_a es el voltaje de diferencia entre el valor máximo y el valor del punto de intersección del perfil de la esfera atrapada (Figura 3.5D).

6. El procedimiento descrito en los puntos 1-5 se realizó para 8 esferas diferentes de $730 \mu\text{m}$ de diámetro que es el tamaño de las esferas utilizadas posteriormente en el ensayo con las moléculas de ADN. Los porcentajes obtenidos se promediaron y se obtuvo como resultado $p = (91 \pm 5) \%$.

3.1.2. Determinación del tamaño de la región lineal del FDP

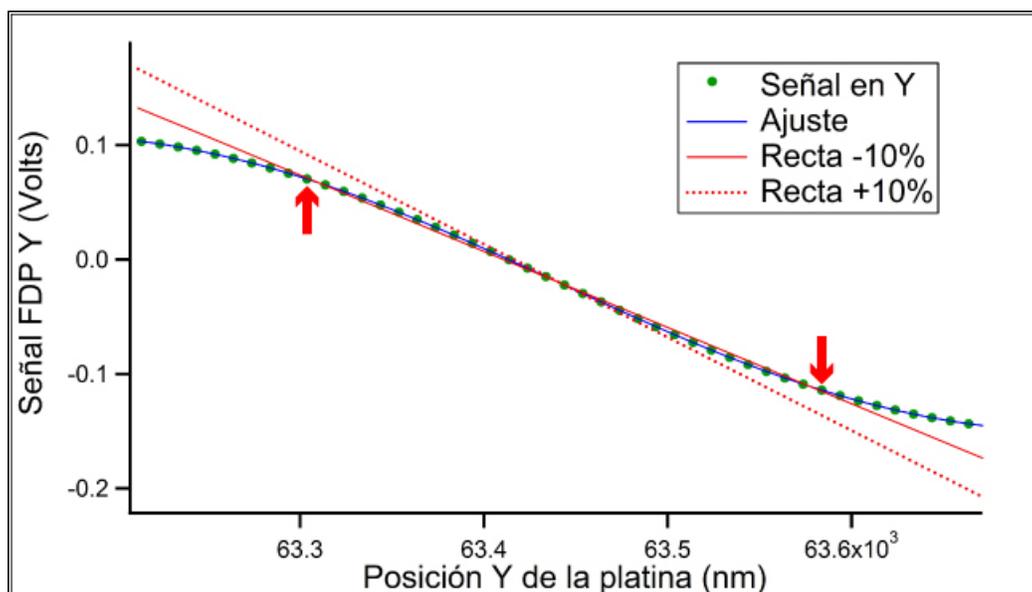


Figura 3.6: El ajuste Gaussiano define una recta que pasa por el centro de la trampa con pendiente a/σ^2 . Los puntos de la región lineal se definen como aquellos que caen entre las dos rectas cuya pendiente es 10% mayor y 10% menor que la primera. En esta Figura la región lineal es de $290 \pm 10\text{nm}$ y sus límites se indican con las flechas en rojo. Acercamiento de una traza resultante de trasladar una esfera unida al cubreobjeto a través de la mancha el eje y .

Las trazas obtenidas en la sección anterior muestran que la respuesta del FDP tiene un comportamiento no-lineal hacia la periferia y un

CAPÍTULO 3. CALIBRACIÓN DE LA PINZA ÓPTICA

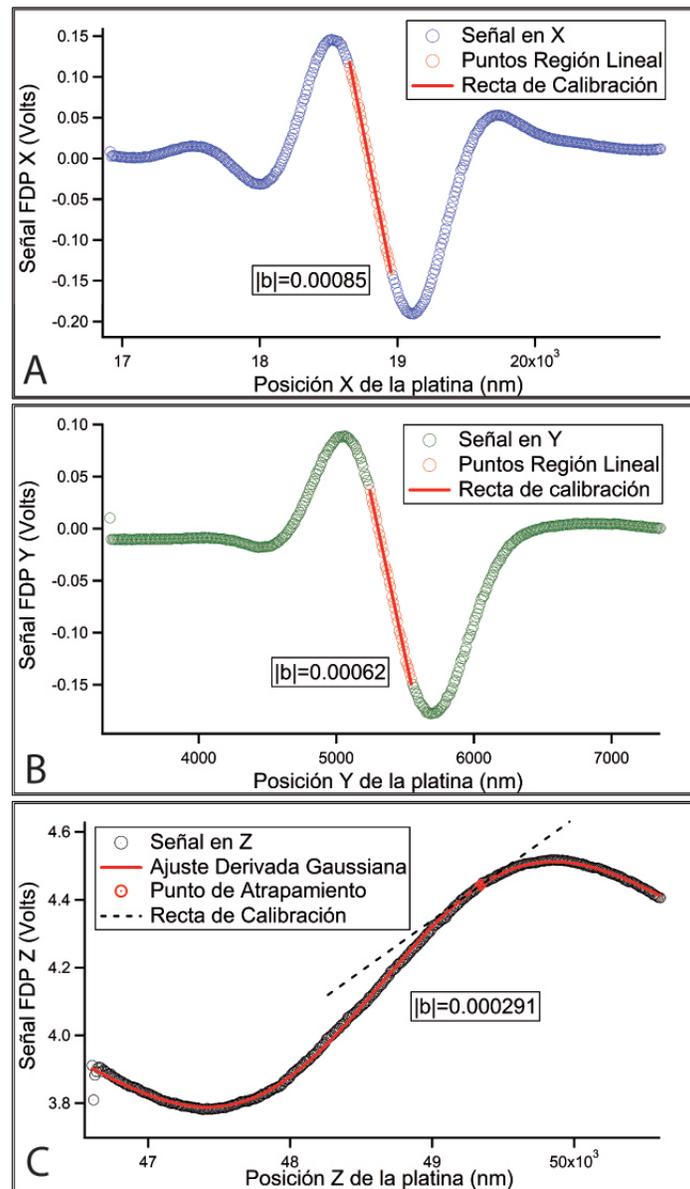


Figura 3.7: Determinación del coeficiente de conversión de unidades $C_{v/nm}$. En todos los casos, la región de respuesta lineal para el FDP se determinan de acuerdo al criterio definido en el texto principal. **A**, Traza correspondiente al eje x , Marcadores redondos en azul. Los desplazamientos para los que la respuesta es lineal se muestran como marcadores redondos en rojo. El coeficiente de conversión de unidades se encuentra ajustando una recta a este conjunto de puntos, el ajuste corresponde a la línea sólida roja. El valor absoluto de la pendiente $|b|$ es igual al coeficiente $C_{x-v/nm}$. **B**, Traza correspondiente al eje y , marcadores redondos en verde. EL coeficiente $C_{y-v/nm}$ se obtiene de la misma forma que en el panel A. **C**, Traza correspondiente al eje z . La recta tangente (línea punteada en negro) al punto de equilibrio (marcador redondo en rojo) define la región de la respuesta lineal del FDP. Su pendiente es igual al coeficiente de conversión de unidades $C_{z-v/nm}$ para el eje axial.

comportamiento lineal hacia el centro. Para determinar los límites de la región donde el comportamiento es lineal se definió el siguiente criterio: Considérese una recta que pasa por la posición de equilibrio en cada eje y que aproxima localmente a la traza obtenida con el FDP. Para x y y la elección obvia es la recta definida por el ajuste de la derivada de la Gaussiana. Esta recta pasa por el centro de la función y tiene una pendiente a/σ^2 (Figura 3.3). Para el eje z , se considera la recta tangente a la derivada de la Gaussiana en la posición de equilibrio (Figura 3.7C). Esta recta tiene una pendiente igual a la segunda derivada de la Gaussiana evaluada en z_0 , donde z_0 es el punto de equilibrio en el eje axial.

Enseguida, se consideran 2 rectas más que pasan por la posición de equilibrio pero que se desvían de la primera recta por un 10 % en la pendiente: $1.1(a/\sigma^2)$ y $0.9(a/\sigma^2)$ para los ejes x y y . En z , se toma más 10 % y -10 % del valor obtenido al evaluar en la segunda derivada de la Gaussiana. Los puntos que caen entre las dos rectas corresponden a las posiciones de la esfera para los cuales la respuesta del método de detección de desplazamientos es lineal (Figura 3.6).

Se determinó la región lineal del FDP en cada eje tomando las trazas correspondientes a varias esferas diferentes con el mismo radio $r = 730\mu\text{m}$. Estimamos que el tamaño de la región lineal es de $\sim 280\text{ nm}$ en el eje x y $\sim 300\text{ nm}$ en el eje y . En ambos casos esta región es simétrica con respecto a las posiciones de equilibrio. Para el eje z la región lineal es de $\sim 240\text{ nm}$ y es asimétrica con aproximadamente $\frac{2}{3}$ partes en la dirección de propagación del láser y $\frac{1}{3}$ parte en la dirección opuesta. Como veremos más adelante los desplazamientos que se realizaron para estirar las moléculas de ADN caen siempre dentro de estos rangos.

3.1.3. Determinación de los coeficientes de proporcionalidad para la conversión de unidades.

Una vez determinados en las trazas los puntos correspondientes a una respuesta lineal del FDP, se torna inmediato encontrar las constantes de proporcionalidad para convertir las unidades de volts a nanómetros.

CAPÍTULO 3. CALIBRACIÓN DE LA PINZA ÓPTICA

El procedimiento es simple, a estos puntos se les ajusta una recta, $f(x) = a + bx$, y el valor absoluto de la pendiente es el coeficiente de conversión de unidades: $|b| = C_{v/nm}$ (Figura 3.7).

La calibración del FDP se realizó al inicio de cada ensayo con moléculas de ADN. Para ello se implementó una rutina en LabView que determina el valor del coeficiente de conversión de unidades en los tres ejes para cada esfera. En cada ensayo se tomaron al menos 10 esferas diferentes del mismo radio y se realizó un promedio de los coeficientes obtenidos. Los valores resultantes de esta calibración se guardan en un archivo llamado *Parámetros globales de la trampa*. Todas las rutinas de LabView que requieren de mediciones de los desplazamientos de la esfera cargan los valores de la calibración directamente desde este archivo.

Valores típicos para los coeficientes $C_{v/nm}$ en una calibración sobre 20 esferas se presentan en el cuadro 3.1.

Coeficiente de proporcionalidad	Valor característico $V \cdot nm^{-1}$
$C_{x-v/nm}$	0.00084 ± 0.00003
$C_{y-v/nm}$	0.00060 ± 0.00006
$C_{z-v/nm}$	0.00024 ± 0.00002

Cuadro 3.1: Valores característicos para los coeficientes de conversión de unidades. Valor promedio \pm desviación estándar.

3.2. Métodos para determinar la rigidez de la trampa

Una esfera en solución se encuentra en constante movimiento debido a la energía térmica del medio en el que se encuentra; a este fenómeno se le conoce como *movimiento Browniano*. Decimos que una esfera es atrapada por el haz láser debido a que vemos que el movimiento difusivo de la esfera cesa, sin embargo, decir que su movimiento se detiene com-

CAPÍTULO 3. CALIBRACIÓN DE LA PINZA ÓPTICA

pletamente no es correcto. Aunque el movimiento difusivo de la esfera se reduce una vez que ha sido atrapada, la esfera continua moviéndose alrededor del punto de equilibrio. Las características de estas fluctuaciones están determinadas por el movimiento Browniano en presencia de un potencial externo (el potencial de la pinza óptica).

Al inicio de esta sección insistí en que la fuerza que ejerce la trampa tiene un comportamiento similar a la de un resorte. Para entender cómo determinamos la rigidez de la trampa a través del movimiento Browniano apelaré a la experiencia que todos tenemos con estos aparatos de respuesta mecánica. Supóngase que en todos los casos se aplica la misma fuerza constante.

Cuando se jala un resorte muy duro, o dicho de otra forma, con una constante de rigidez κ muy grande, y después se suelta, éste se mueve sólo un poco alrededor del punto de equilibrio con desplazamientos muy pequeños. Si por el contrario el resorte es muy flojo, o su constante de rigidez κ es pequeña, cuando se suelta el resorte decimos coloquialmente que se mueve más que en el caso anterior pues los desplazamientos son más pronunciados.

Un comportamiento muy similar ocurre con la trampa óptica. La energía térmica del medio en el que se encuentra inmerso el objeto constantemente aplica una fuerza. Cuando la trampa es muy rígida, las amplitudes del movimiento Browniano son pequeñas y, viceversa, cuando la trampa es muy poco rígida, el movimiento Browniano tiene amplitudes mayores [34].

Debido a esta relación entre la constante κ y el movimiento Browniano, se han propuesto diferentes métodos que usan la información contenida en las fluctuaciones térmicas de una esfera atrapada para obtener el valor de la rigidez de la trampa. Actualmente estos métodos ya son convencionales y pueden revisarse en [10].

A continuación describiré los métodos que se implementaron para la calibración de nuestra pinza.

1. **Equipartición:** Este método está basado en el Teorema de equi-

CAPÍTULO 3. CALIBRACIÓN DE LA PINZA ÓPTICA

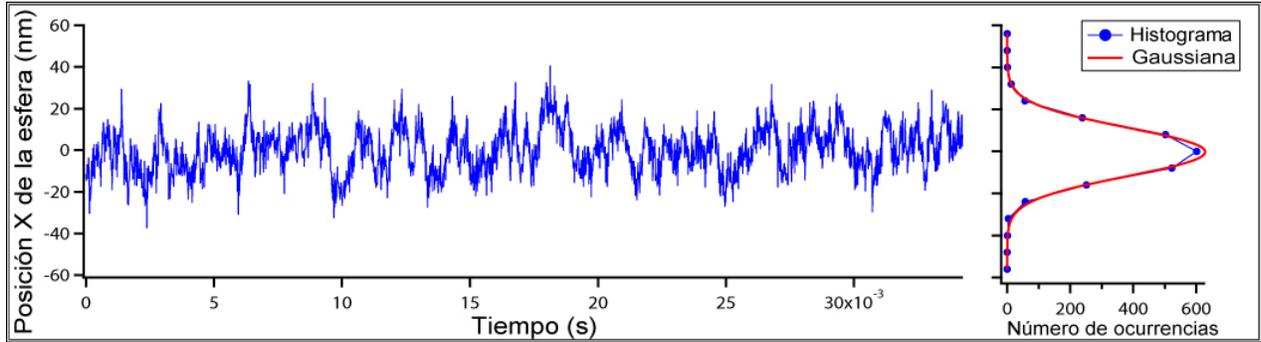


Figura 3.8: Se registran las posiciones de la esfera medidas desde el centro de la trampa como función del tiempo. La distribución de los desplazamientos se ajusta muy bien a una distribución Gaussiana con desviación estándar σ , donde $\sigma = \sqrt{\langle x^2 \rangle}$, tomando la posición de equilibrio $x_0 = 0$. La varianza de la serie de tiempo es inversamente proporcional a la rigidez de la trampa. Esta serie de tiempo fue tomada en el eje x y la rigidez de la trampa es de $(0.03 \pm 0.01) \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$.

partición de la mecánica estadística clásica, el cual establece que cada grado de libertad que contribuye con un término cuadrático a la energía total de un sistema, en promedio, posee una energía igual a $\frac{1}{2}k_B T$, siendo k_B la constante de Boltzmann y T la temperatura absoluta. En nuestro caso, la energía potencial de la trampa en la región lineal es similar a la de un resorte, $\frac{1}{2}\kappa\langle x^2 \rangle$, donde $\langle x^2 \rangle$ es la varianza tomando el punto de equilibrio $x_0 = 0$. Igualando las dos expresiones anteriores se tiene una expresión para la rigidez de la trampa:

$$\kappa = \frac{k_B T}{\langle x^2 \rangle} \quad (3.3)$$

La varianza se determina a partir de una serie de datos de la posición de la esfera como función del tiempo, como la que se muestra en la Figura 3.8. Para esta serie de tiempo se muestra la distribución de los desplazamientos de la esfera en un histograma. Esta distribución se ajusta muy bien a una función Gaussiana y su desviación estándar σ es la raíz cuadrada de la varianza de los desplazamientos.

Para obtener la serie de tiempo se implementó una rutina en Lab-View que permite realizar la calibración de la trampa. El procedimiento es el siguiente: con la palanca de mando se atrapa una esfera en solución y se aleja de toda superficie para evitar efectos

espurios tales como: flujos no-laminares, efectos electrostáticos, entre otros. Se adquieren los datos durante 0.5 s a través de la TAD que tiene una tasa de muestreo de 65568 datos por segundo. Esta información es almacenada en un archivo como una serie de tiempo para los desplazamientos de la esfera.

Se toma un número n (típicamente 20) de series de tiempo en cada uno de los tres ejes coordenados. Se calcula la varianza para cada serie de datos y después se obtiene un promedio de las varianzas. Las series de tiempo se promedian para disminuir el ruido. En la interfaz gráfica el usuario especifica la temperatura del medio ambiente y con ésto determina completamente la rigidez de la trampa por éste método.

2. **Espectro de potencias:** La rigidez de la trampa no sólo determina la amplitud de los desplazamientos de una esfera atrapada, también afecta las frecuencias a las que ocurrirán estos movimientos. El espectro de potencias⁵ o densidad espectral $G_x(f)$ describe cómo la energía de la serie de tiempo está distribuída en el espacio de frecuencias. La varianza, como ya se vió, es una medida indirecta de la energía térmica y la energía potencial de la trampa, ecuación 3.3. El espectro de potencias se define de forma que $G_x(f) \cdot \Delta f$ es la varianza de la señal en el rango de frecuencias $(f, \Delta f)$. El espectro de potencias se obtiene a través de la transformada de Fourier. Para una serie de tiempo, la transformada de Fourier discreta⁶ (TFD) consiste en determinar los coeficientes a_n y b_n de la serie de Fourier, los cuales determinan completamente a una función en el espacio de las frecuencias.

El espectro de potencias es tal que para un intervalo de frecuencias, $\Delta f = 1/T$, donde T es la ventana de tiempo utilizada en la TFD, se satisface la siguiente relación:

$$G_x(f) \cdot \Delta f = \frac{1}{2} (a_n^2 + b_n^2) \quad (3.4)$$

⁵Sin pérdida de generalidad considérese el eje x en esta descripción.

⁶La señal que se obtiene es una serie de tiempo y por lo tanto se debe calcular la transformada de Fourier continua

CAPÍTULO 3. CALIBRACIÓN DE LA PINZA ÓPTICA

Donde a_n son los coeficientes de las funciones cosenoidales y b_n son los coeficientes de las funciones senoidales de la serie de Fourier.

En particular, la densidad espectral del movimiento Browniano de un objeto en un potencial cuadrático se comporta como una función Lorentziana, la cual está dada como sigue [34]:

$$G_x(f) = \frac{k_B T}{\pi^2 \beta (f_0^2 + f^2)} \quad (3.5)$$

Donde $G_x(f)$ tiene unidades de $\text{nm}^2 \cdot \text{Hz}^{-1}$, k_B y T tienen el mismo significado que en el método de la varianza, β es el coeficiente de arrastre hidrodinámico y f_0 es la llamada frecuencia de corte. El coeficiente de arrastre β para una esfera de radio r alejada de cualquier superficie es $\beta = 6\pi\eta r$, donde η es la viscosidad del medio en el que se encuentra. Por su parte, la frecuencia de corte f_0 se define como la frecuencia para la cual la densidad espectral ha disminuído por un factor igual a $1/\sqrt{2}$ respecto al valor a $f = 0$ y se encuentra relacionada con la constante κ de la siguiente forma:

$$\kappa = f_0 2\pi\beta \quad (3.6)$$

Dicho de otra forma, el método del espectro de potencias permite determinar la constante de rigidez de la trampa analizando que tan rápido disminuye la densidad espectral para el movimiento Browniano de una esfera atrapada.

Para determinar κ por este método, se implementó un algoritmo para calcular el espectro de potencias en la rutina de calibración de la trampa descrita en el punto 1. Esta rutina retoma las series de tiempo ya obtenidas para el método de la varianza (para ver los detalles de la obtención de las mismas véase el punto 1), a las cuales se les calcula directamente su espectro de potencias. El algoritmo utilizado es una paquetería convencional de LabView que calcula el espectro de potencias unilateral. Al espectro de potencias se le

CAPÍTULO 3. CALIBRACIÓN DE LA PINZA ÓPTICA

Método	κ_x (pN · nm ⁻¹)	κ_y (pN · nm ⁻¹)	κ_z (pN · nm ⁻¹)
Varianza	0.031 ± 0.001	0.025 ± 0.001	0.004 ± 0.0003
Frecuencia de Corte	0.057 ± 0.002	0.054 ± 0.001	0.005 ± 0.0005
Amplitud	0.033 ± 0.001	0.031 ± 0.001	0.005 ± 0.0006
GLOBAL	0.041 ± 0.012	0.036 ± 0.013	0.005 ± 0.0008

Cuadro 3.2: Valores característicos para la rigidez de la trampa. Valor promedio ± desviación estándar. El valor global se refiere al que se obtiene al hacer un promedio de los tres métodos.

ajusta enseguida una función Lorentziana, cuya forma funcional está dada como sigue:

$$L(f) = A \frac{f_0}{f_0^2 + f^2} \quad (3.7)$$

Nótese que esta relación difiere de la ecuación 3.5 sólo en la definición de los parámetros de ajuste f_0 y A . Lo hemos hecho de esta forma ya que nos permite encontrar κ a través de los dos parámetros. Si la relación que f_0 guarda con κ es la que se ha descrito arriba, ecuación 3.6, entonces la constante κ en términos del parámetro A está dada como sigue:

$$\kappa = \frac{k_B T}{2\pi A} \quad (3.8)$$

Antes de cada uno de nuestros experimentos se determinó la rigidez de la trampa en los tres ejes con al menos 5 esferas distintas tanto por el método de la varianza y por el método del espectro de potencias. Los valores obtenidos fueron promediados de acuerdo al método con el cual se determinaron. Para conocer las fuerzas ejercidas sobre una esfera, se utiliza el promedio de los valores obtenidos con los dos métodos.

En el cuadro 3.2 se muestran valores típicos para la rigidez de la trampa en los tres ejes.

CAPÍTULO 3. CALIBRACIÓN DE LA PINZA ÓPTICA

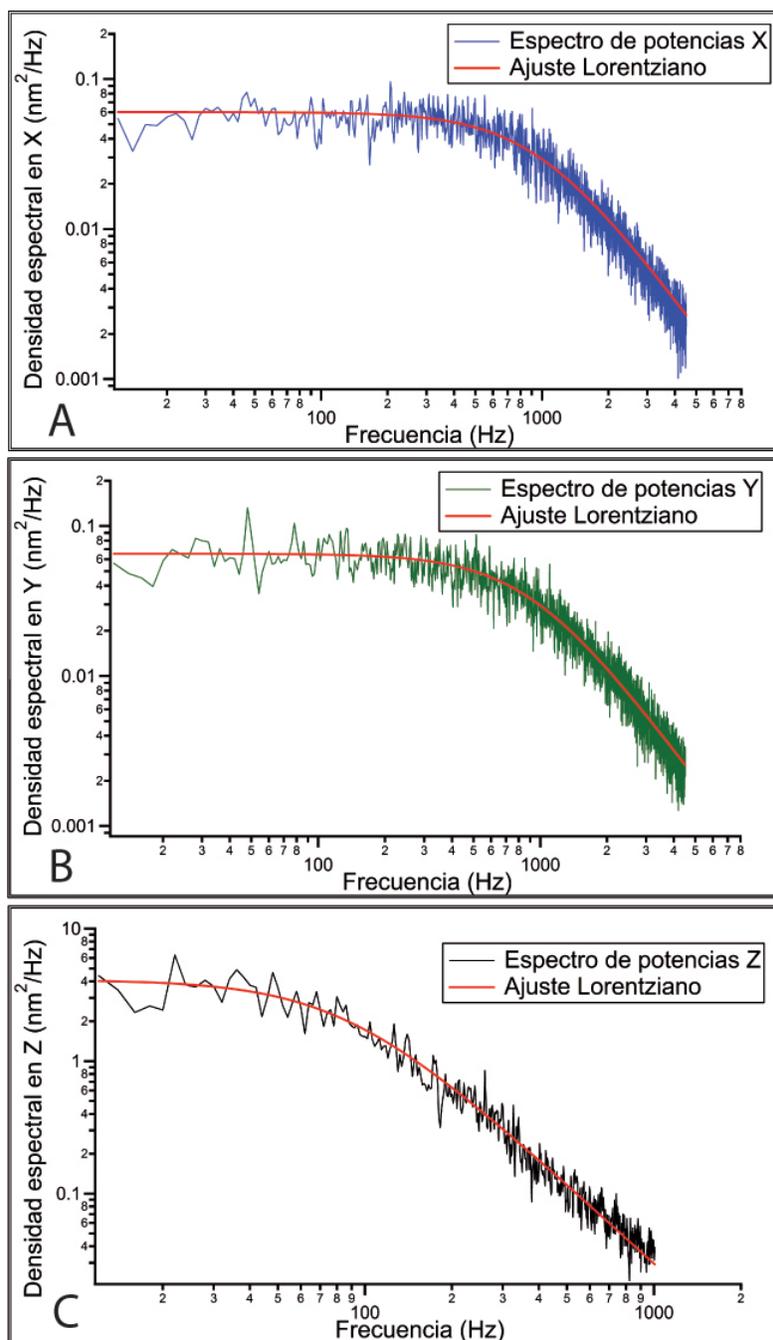


Figura 3.9: Determinación de la rigidez de la trampa κ por el método de espectro de potencias. Se determina el espectro de potencias a partir de una serie de tiempo de los desplazamientos de la esfera atrapada. Se ajusta una lorentziana, ecuación 3.7, de donde se obtienen los parámetros de ajuste f_0 y A . La constante κ se puede calcular directamente a partir de éstos. En esta Figura se muestran espectros de potencias típicos en cada uno de los ejes. En el panel superior izquierdo, en azul, se muestra el eje x . En el panel superior derecho, en verde, se muestra el eje y . En el panel inferior izquierdo, en negro se muestra el eje z .

Sistema biológico: Moléculas de ADN

En los ensayos de moléculas individuales de ADN se requiere un extracto de moléculas purificadas, de forma que la unión de una o muy pocas moléculas de ADN con una esfera de poliestireno ocurra con alta probabilidad y en ausencia de otros componentes biológicos. Para describir el proceso mediante el cual se obtuvo el extracto, a continuación introduzco algunos conceptos preliminares que facilitan la lectura de los procedimientos, los cuales se presentan enseguida.

4.1. Conceptos preliminares

La estructura del ADN.

Una molécula de ADN consiste de dos cadenas polinucleótidas conformadas por 4 tipos de subunidades denominadas nucleótidos: Adenina (**A**), Timina (**T**), Guanina (**G**) y Citosina (**C**) [35], [36]. Los nucleótidos que las constituyen son moléculas compuestas por un azúcar desoxirribosa 5-carbono unida a un grupo fosfato y a una base nitrogenada. Los nucleótidos se unen mediante un enlace covalente conocido como enlace fosfodiéster a través del grupo hidroxilo (OH) 3' del azúcar y el fosfato (P) que se encuentra en la posición 5'. El resultado del enlace de varios nucleótidos forma un esqueleto alternado (azúcar-fosfato-azúcar-fosfato)

CAPÍTULO 4. SISTEMA BIOLÓGICO: MOLÉCULAS DE ADN

que da lugar a un polímero con cadenas laterales de bases nitrogenadas y una polaridad definida por los grupos que se encuentran en los extremos, véase la Figura 4.1.

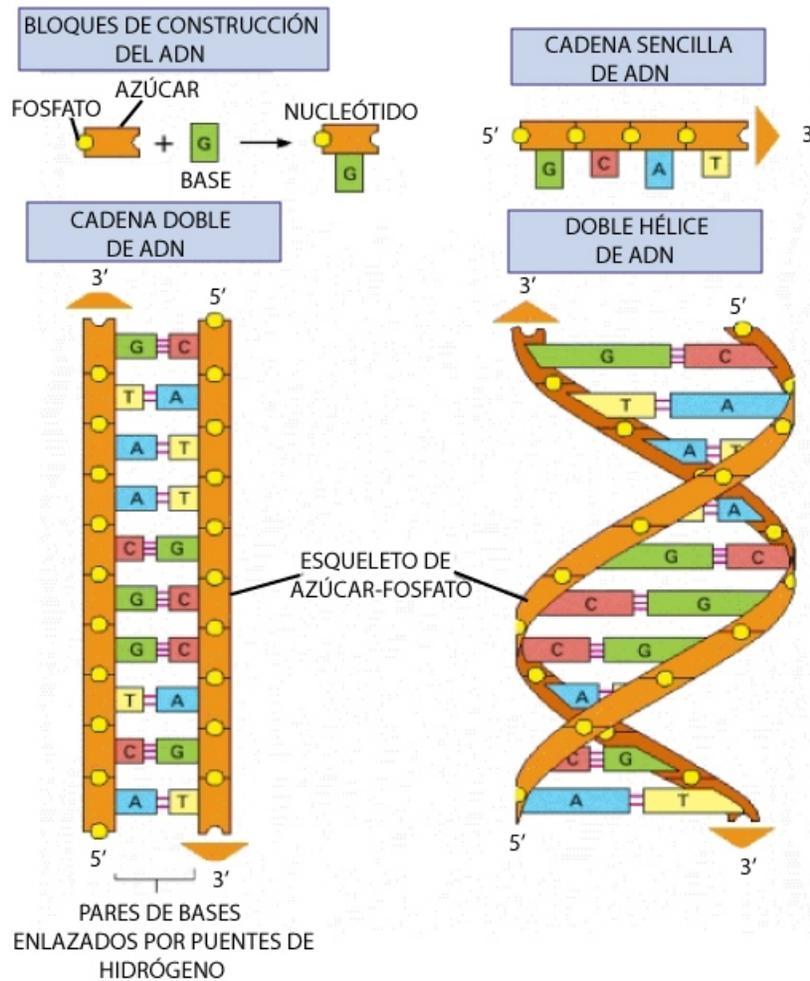


Figura 4.1: El ADN está constituido por 4 tipos de subunidades conformadas por un azúcar, un fosfato y una base denominadas nucleótidos. Las bases Adenina, Timina, Guanina y Citosina son grupos que diferencian a estas subunidades. Los nucleótidos forman una cadena polimérica cuyo esqueleto está compuesto por azúcares y fosfatos. Dos cadenas forman puentes de hidrógeno entre sus bases para conformar una molécula de ADN. Las flechas indican la dirección en la que es leída la molécula. En la izquierda se muestra el ADN estirado para mayor claridad. En los sistemas vivos el ADN forma una doble hélice como la que se muestra en el esquema de la derecha. Figura tomada y adaptada de [36].

La unión de dos cadenas ocurre debido a la formación de puentes de hidrógeno entre pares de bases específicos conocidos como complementarios: la Adenina se aparea con la Timina y la Guanina con la Citosina.

La doble cadena forma una estructura helicoidal que mide de 22 a 26 Å de ancho, con un tamaño de vuelta de 10.4 pares de bases (pb) y una distancia entre nucleótidos adyacentes de 3.4 Å.

La función del ADN y su replicación.

El ADN codifica la información genética utilizada en el desarrollo y funcionamiento de todos los seres vivos¹. El orden, o secuencia, de los nucleótidos en cada cadena específica cómo se llevará a cabo la síntesis de proteínas. Cada tres nucleótidos, conocidos en conjunto como un codón, codifican para uno de los 20 aminoácidos que constituyen a las proteínas [36].

Algunos procesos en la célula dependen de la posibilidad de transferir esta información a otras moléculas. Por ejemplo, en la reproducción celular mitótica una célula se divide para dar lugar a dos células nuevas. Tras la división celular, ambas células hijas tienen una carga completa de material genético. Para que esto ocurra, es necesario duplicar el material genético de la célula madre mediante la transferencia de la información contenida en el ADN a una segunda molécula de ADN. La información contenida en el ADN se transfiere mediante bases complementarias en un proceso conocido como replicación. La molécula de ADN que es replicada se conoce como molde y su polaridad define el sentido en el que la molécula complementaria es sintetizada. El proceso de replicación comienza en un extremo 3' de la molécula molde donde se agrega una base complementaria con el azúcar y el fosfato en dirección opuesta a la primera. Un nuevo nucleótido une su grupo 5' al extremo 3' del anterior de forma que el crecimiento de la cadena sucede en dirección 5'-3', véase la Figura 4.2. El crecimiento de la cadena es un proceso que se encuentra catalizado por enzimas. La ADN-polimerasa cataliza la formación de enlaces fosfodiéster en la replicación del ADN.

¹Con excepción de los ARN-Virus

CAPÍTULO 4. SISTEMA BIOLÓGICO: MOLÉCULAS DE ADN

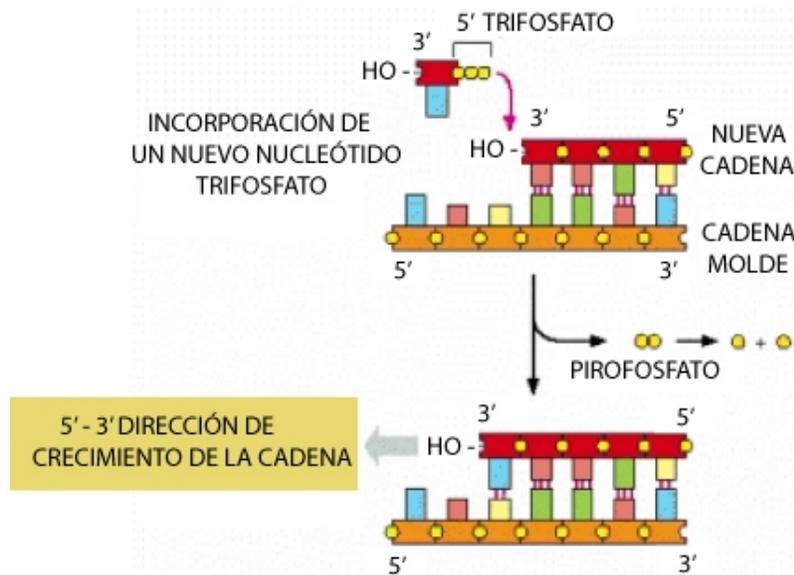


Figura 4.2: La enzima ADN-polimerasa cataliza la incorporación de un nuevo deoxyribonucleótido mediante la formación de un enlace del extremo 3'-HO de la nueva cadena al extremo 5'-fosfato del nucleótido. La cadena molde determina el tipo de nucleótido que va a ser incorporado a la cadena creciente, ya que sólo se puede agregar la base complementaria. La reacción ocurre en un panorama energético muy favorable causado por la liberación de un pirofosfato y su subsecuente hidrólisis en dos moléculas de fosfato inorgánico. Figura adaptada de [36].

4.2. Obtención del ADN

Las moléculas de ADN utilizadas en nuestros ensayos se obtuvieron mediante amplificación del gen *blr-1* del hongo *Trichoderma atroviride*, el cual mide 3063 pares de bases [37]. La amplificación se hizo con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa o PCR por sus siglas en inglés.

PCR es una técnica de biología molecular desarrollada en 1986 por Kary Mullis [38], cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un número pequeño de éstas. Los ensayos de PCR permiten amplificar una determinada región de un genoma y doblar el número de copias billones de veces. Aunque existen diversos tipos de PCR, el mecanismo que subyace a esta técnica es estándar y puede revisarse en la Referencia [39]. Los ensayos de PCR consisten en establecer ciclos térmicos de calentamiento y

CAPÍTULO 4. SISTEMA BIOLÓGICO: MOLÉCULAS DE ADN

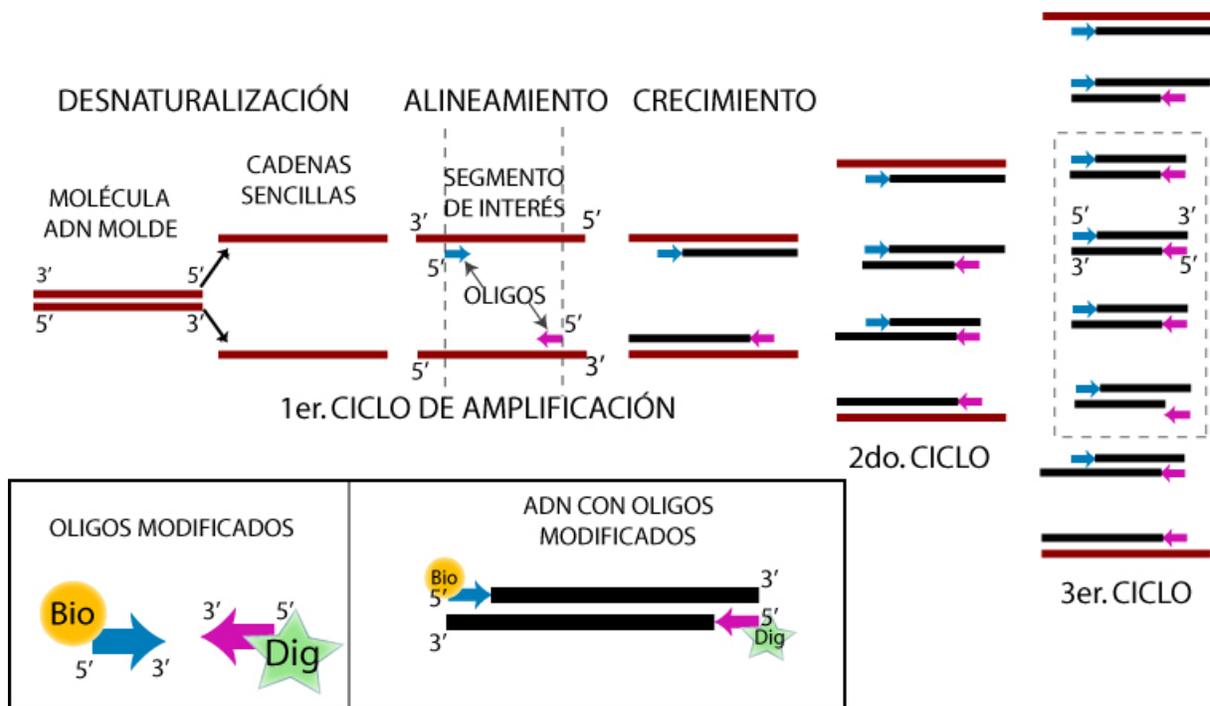


Figura 4.3: Mediante el conocimiento previo de la secuencia del segmento del genoma, se diseñan dos oligonucleótidos de ADN sintéticos que se aparean con la secuencia del ADN molde para flanquearlo. Estos oligonucleótidos sirven como cebadores para la síntesis de ADN *in vitro*. La PCR comienza con una doble cadena de ADN que es desnaturalizada mediante la aplicación de calor. Tras la separación, el enfriamiento del ADN molde en presencia de un excesivo número de *oligos* permite la hibridación de las secuencias complementarias. La incubación de las hibridaciones con la Taq-Polimerasa, a una temperatura adecuada y en presencia de dNTPs da lugar a la síntesis de una nueva cadena. En el segundo ciclo las nuevas cadenas sirven como moldes. Otros oligos se unen a éstas y producen copias únicamente del segmento de interés. Después de varios ciclos, las moléculas predominantes serán dobles cadenas con una extensión idéntica al sitio flanqueado por los oligos (recuadro punteado). En el recuadro se ilustra cómo se etiquetan los extremos de una molécula de ADN. Los oligos empleados en la PCR son modificados en su extremo 5' con la unión de otras moléculas, como la biotina y la antidigoxigenina. Al amplificar un segmento del genoma con estos oligos se obtendrán moléculas de ADN en cuyos extremos se encuentran las moléculas etiqueta.

enfriamiento para dar lugar a la desnaturalización de las moléculas de ADN (separación de las cadenas) al alineamiento y la replicación mediada por una enzima ADN-polimerasa. Debido a que este mecanismo requiere grandes variaciones en la temperatura, la reacción enzimática debe ser catalizada por una ADN-polimerasa que sea estable a altas temperaturas. La Taq-polimerasa² es utilizada ampliamente, ya que su temperatura

²Esta enzima fue extraída originalmente de *Thermus aquaticus*, una bacteria que puede tolerar altas temperaturas.

CAPÍTULO 4. SISTEMA BIOLÓGICO: MOLÉCULAS DE ADN

óptima de trabajo se encuentra alrededor de 70°C. La tasa de catálisis para esta enzima es aproximadamente 1000 pb por minuto.

Un ciclo de amplificación consiste en tres etapas: desnaturalización, alineamiento y crecimiento de la cadena, véase la Figura 4.3. En la etapa de desnaturalización se separan las dos cadenas mediante el calentamiento de la muestra (92 – 94°C). El segmento del genoma que interesa amplificar se flanquea con pequeños segmentos de ADN de entre 12 y 40 nucleótidos complementarios a la cadena molde. Estos segmentos funcionan como cebadores y se conocen con el nombre de oligonucleótidos o simplemente *oligos*³. Durante el alineamiento, la temperatura se disminuye (40 – 68°C) para dar lugar al apareamiento de bases entre las cadenas molde y los oligos. Finalmente la temperatura vuelve a elevarse (\approx 70°C) para alcanzar las condiciones óptimas de la Taq-polimerasa. Ésta se une a la molécula molde y el oligo y comienza el crecimiento uniendo nucleótidos (deoxynucleótidos trifosfato, dNTPs) que se introdujeron previamente. Para dar tiempo suficiente a que ocurra el crecimiento de las nuevas moléculas de ADN se toma un tiempo de crecimiento igual a 1 min por cada kilobase (kb).

Un ensayo de PCR se realiza en un aparato llamado termociclador y consiste en una sucesión de 20 a 35 ciclos de amplificación. Para optimizar el proceso, también se agrega una etapa inicial llamada desnaturalización inicial y otra final llamada extensión final. El crecimiento del número de moléculas es exponencial ya que las cadenas sintetizadas en un ciclo previo sirven como moldes de otra cadena. Esto significa que si partimos con una única molécula luego de 20 ciclos tendremos 2^{20} moléculas (ver la Figura 4.3).

En nuestro ensayo, la amplificación se realizó usando como molde moléculas de ADN complementario (ADNc) del gen *blr-1*. El ADNc se sintetiza a partir de una molécula de ARNm⁴ maduro en una reacción que es catalizada por la ADN-polimerasa y otra enzima llamada Reverso-transcriptasa.

³Es más común encontrar en los textos la palabra en inglés para denotar a los oligos: *primers*

⁴Las moléculas de ARN mensajero o ARNm son copias del genoma que son leídas fuera del núcleo para la síntesis de proteínas.

CAPÍTULO 4. SISTEMA BIOLÓGICO: MOLÉCULAS DE ADN

Los oligos que utilizamos (Integrated DNA Technologies) tienen 21 nucleótidos y fueron diseñados con modificaciones en los extremos 5' para sujetar el ADN al vidrio y unirlo a las esferas de poliestireno, véase recuadro inferior de la Figura 4.3. Su composición es la siguiente:

Oligo directo: biotina-5'-GGGCTTCTACCAGACAAACCA-3'

Oligo reverso: digoxigenina-5'-CGCTCTTCTCGTATTGAAGCC-3'

En esta representación 3' y 5' indican la posición de los grupos carbono que definen la orientación de la molécula.

La biotina es una vitamina estable al calor y soluble en agua y alcohol. Presenta una alta afinidad de interacción con la proteína tetramérica avidina. La unión avidina-biotina es uno de los enlaces biológicos no-covalente más fuerte que se conoce [39]. La digoxigenina es un esteroide y es considerado un hapteno⁵ por lo que pueden fabricarse anticuerpos que se unen a esta molécula [41]. Es una técnica común marcar moléculas de ADN con biotina y digoxigenina ya que éstas últimas no se desnaturalizan a temperaturas alcanzadas en la PCR y tampoco influyen en el mecanismo de amplificación. Una revisión de este tipo de técnicas puede encontrarse en la Referencia [42].

El protocolo para realizar una PCR estándar es bastante convencional y puede revisarse en la Referencia [40]. En nuestro ensayo de PCR todos los materiales son de Promega con excepción de los oligos (Integrated DNA Technologies) y los dNTP's (Bioline). El procedimiento que se siguió lo describo a continuación:

Mezcla de reacción de la PCR de 50 μ L:

⁵Los haptenos son moléculas pequeñas que no inducen por sí mismas la formación de anticuerpos pero que al unirse a una proteína transportadora (por ejemplo, albumina) estimulan una respuesta inmunológica.

⁶Los *buffers*, también conocidas como soluciones amortiguadoras, son soluciones acuosas con composiciones y pH específicos. Tienen la propiedad de que su pH cambia muy poco cuando se les agrega un ácido o una base muy fuerte.

CAPÍTULO 4. SISTEMA BIOLÓGICO: MOLÉCULAS DE ADN

Componente	Cantidad
<i>Buffer</i> ⁶ para PCR 10X	5 μ L
MgCl ₂ 25 mM	3 μ L
dNTPs	1 μ L
Oligo directo a 10 μ M	1 μ L
Oligo reverso a 10 μ M	1 μ L
Molde cDNA	1 μ L
Taq-Polimerasa	1 μ L
Agua bidestilada libre de nucleasas	37 μ L

1. En un tubo para PCR de 0.2 mL se realiza la mezcla de reacción de los componentes arriba descritos.
2. El tubo se coloca en el termociclador.
3. Se programa una PCR de 30 ciclos con las siguientes características:

Etapa	Temperatura	Duración
Desnaturalización inicial	94°C	5 min
Desnaturalización	94°C	30 s
Alineamiento	58°C	30 s
Crecimiento	72°C	3 min
Extensión final	72°C	10 min

4.3. Purificación del ADN

Se comprobó que el segmento de ADN amplificado es el de interés mediante una prueba de electroforesis en gel de agarosa al 1 %, la cual permite conocer el tamaño de las moléculas resultantes de la PCR con la ayuda de un marcador de peso molecular [43], [44].

La electroforesis en gel es un grupo de técnicas que se emplean para separar macromoléculas de acuerdo a su razón carga:masa. La mayoría de

CAPÍTULO 4. SISTEMA BIOLÓGICO: MOLÉCULAS DE ADN

los polímeros biológicos tiene carga eléctrica y por ello es posible hacerlos migrar en presencia de un campo eléctrico. La velocidad de propagación no es idéntica para todas las moléculas debido al medio de soporte en el que se encuentran. Este medio es un gel (material poroso) que deja pasar más fácilmente a las moléculas pequeñas.



Figura 4.4: La electroforesis en gel de agarosa permite separar moléculas de ADN de acuerdo a su tamaño. Se realiza en contenedores llamados cámaras de electroforesis donde se deposita el gel y se cubre con una solución acuosa amortiguadora. Las muestras de ADN son embebidas en el material poroso al ser depositadas en hendiduras del gel conocidas como pozos. Los pozos se fabrican cuando la solución de agarosa no ha gelificado completamente usando como molde los dientes de un peine. Las muestras se dispensan en los pozos y el gel se orienta de forma que los pozos se encuentren hacia el electrodo negativo. En esta imagen se observan en tonos azules debido a los colorantes del *buffer* de carga. El ADN tiene una carga neta negativa debido al fosfato que constituye su esqueleto y por ello las moléculas migran hacia el extremo positivo.

Las moléculas se depositan inicialmente en hendiduras del gel (hechas a propósito) denominadas pozos. Al aplicar una diferencia de potencial en los extremos del gel, las moléculas migran entre los poros del medio hacia el ánodo o el cátodo según su carga eléctrica. Después de un cierto tiempo las moléculas más pequeñas se habrán desplazado una distancia

CAPÍTULO 4. SISTEMA BIOLÓGICO: MOLÉCULAS DE ADN

mayor que aquellas que son más grandes. El resultado macroscópico que se obtiene son columnas de bandas en la dirección del campo eléctrico, (ver la Figura 4.5). Cada banda resulta de la migración simultánea de moléculas con características de carga y masa similares y es posible visualizarlas mediante diversas técnicas de tinción o marcadores radiactivos. Además, es común integrar en un mismo gel otras moléculas con pesos moleculares conocidos (marcadores de peso molecular) para identificar bandas con pesos moleculares específicos.

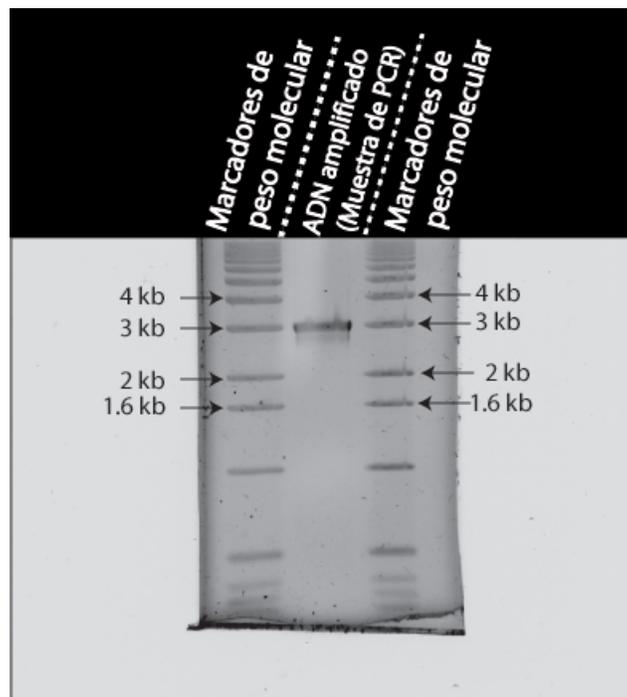


Figura 4.5: Al término de la electroforesis, el gel es teñido con BrEt durante 10 min. y revelado en una cámara de transiluminación con luz UV. Se depositaron marcadores de peso molecular en pozos contiguos a la muestra de PCR para comparar desde ambos lados. En la columna central se observa una única banda a la altura del peso molecular que equivale a 3kb. El segmento que nos interesa amplificar contiene 3063 (pb). La prueba electroforética indica que el segmento amplificado es el correcto.

Existen geles de diferentes materiales tales como el almidón, la poli-acrilamida, la agarosa y la agarosa-acrilamida. La electroforesis en gel de agarosa es de las más utilizadas para analizar y caracterizar ácidos nucleicos de distintas procedencias. La agarosa es un polímero que se funde a una temperatura de 80 – 90°C y forma un gel a unos 30°C. Se disuelve en una solución amortiguadora (*buffer* véase pie de página 6) a diferen-

tes concentraciones para lograr diferentes resoluciones de peso molecular. Las concentraciones pueden ir de 0.3 % para separar moléculas del orden de 5 a 60 kb, hasta 2 % para separar ácidos nucleicos de 0.1 a 0.2 kb. Es usual agregar a la muestra de ADN un buffer de carga que contiene colorantes y glicerol para sedimentar las moléculas. Los colorantes permiten visualizar su desplazamiento durante la electroforesis y parar la prueba cuando se considera que las separaciones entre las moléculas son adecuadas. Los marcadores de peso molecular son segmentos de ADN con un tamaño conocido, véase la Figura 4.5. La visualización del gel se hace mediante una tinción posterior a la electroforesis. Para este tipo de ensayos, el método de tinción más común es el que utiliza Bromuro de Etidio (BrEt), el cual es un agente intercalante que fluoresce al ser expuesto a la luz ultravioleta. Actualmente, existen diversos procedimientos estándar para electroforesis en gel de agarosa, los cuales pueden revisarse en la Referencia [45].

En la prueba de electroforesis que se realizó para nuestro extracto de ADN se obtuvo el gel que se muestra en la Figura 4.5. Esta imagen se obtuvo en una cámara de trasiluminación con luz ultravioleta (UV) y capturada con una cámara digital estándar. En ella se puede observar una única banda en la columna central que corresponde a la posición del marcador de peso molecular para 3 kb. Este resultado concuerda bastante bien para el segmento de ADN que interesaba amplificar, el cual está compuesto por 3063 pares de bases.

La prueba electroforética se realizó con material de Sigma-Aldrich de acuerdo al procedimiento que describo a continuación:

Protocolo para gel de agarosa y visualización de las bandas

1. Sellar con bordes de goma los bordes abiertos de la charola de electroforesis.
2. Diluir en un frasco de vidrio la agarosa en buffer TAE al 1 %:
1 g de agarosa
100 mL de TAE 1X

CAPÍTULO 4. SISTEMA BIOLÓGICO: MOLÉCULAS DE ADN

3. Calentar el frasco, con la tapa floja, en un microondas y dejarlo hervir durante 30 s. Dejar enfriar.
4. Servir la solución de agarosa en la charola cuando se encuentre a unos 45°C.
5. Eliminar todas las burbujas de aire con una punta de pipeta.
6. Colocar peines de plástico para formar los pozos en uno de los extremos del gel.
7. Dejar polimerizar el gel durante ~30 min.
8. Colocar la charola con el gel en la cámara de electroforesis.
9. Cubrir el gel con buffer TAE 1X.
10. Retirar los peines con cuidado para que los pozos queden bien formados.
11. Colocar las muestra en cada pozo.

	Muestra	Cantidad
Pozo 1	Marcadores de peso molecular	2 μ L
Pozo 2	Muestra de ADN (PCR)	5 μ L
Pozo 3	Marcadores de peso molecular	2 μ L

En cada caso se agrega 1 μ L de buffer de carga.

12. Aplicar 80 V durante 30 min.
13. Teñir el gel con BrEt a 1 μ g/mL durante 10 minutos.
14. Observar el gel en un trasiluminador de luz UV y fotodocumentar.

Una vez que se comprobó que el segmento amplificado es el de interés se prosiguió con la purificación para remover otros componentes como la Taq-Polimerasa, exceso de dNTPs, etc. La purificación se realizó directamente del tubo de PCR utilizando un kit de purificación (Kit Promega)

con el siguiente protocolo.

Purificación de ADN

1. Poner un volumen de *buffer de unión* igual al de la muestra de ADN a purificar en el mismo tubo de PCR.
2. Mezclar bien.
3. Transferir la mezcla a una columna de purificación e incubar durante 1 minuto a temperatura ambiente.
4. Centrifugar a 13000 rpm durante 1 min.
5. Desechar el líquido que se filtro a través de la columna.
6. Adicionar a la columna 700 μL de *buffer de lavado*.
7. Centrifugar a 13000 rpm durante 1 min.
8. Desechar el líquido que se filtró a través de la columna.
9. Adicionar 500 μL de *buffer de lavado*.
10. Centrifugar a 13000 rpm durante 6 min.
11. Transferir la columna a un tubo Eppendorf y agregar 30 μL de agua.
12. Incubar un minuto a temperatura ambiente.
13. Centrifugar a 13000 rpm durante 2 min.

CAPÍTULO 4. SISTEMA BIOLÓGICO: MOLÉCULAS DE ADN

Estiramiento de ADN y resultados

Para probar nuestro sistema de manipulación con pinzas ópticas, se realizó un ensayo en el cual se midieron las propiedades poliméricas de las moléculas de ADN a través de curvas de fuerza extensión (curvas FE). En particular, se determinó la longitud característica de la molécula y se caracterizó su elasticidad. A una molécula de ADN se le aplicaron fuerzas a lo largo de los ejes trasversales x y y (perpendiculares al eje de propagación del láser). Para ello se utilizó una geometría de manijas utilizando esferas de poliestireno de $730 \mu\text{m}$ de diámetro (Figura 5.1). Los detalles de la construcción de la geometría pueden entenderse fácilmente una vez que se han descrito las modificaciones de los extremos 5' del ADN (Figura 4.3). Los protocolos utilizados en esta sección se encuentran en el Apéndice A y fueron basados en procedimientos ya convencionales que pueden revisarse en las Referencias [10], [47].

5.1. Preparación del ensayo

1. Se construye un canal adhiriendo a un portaobjetos dos segmentos de cinta doble cara separados por una distancia de $\sim 2 \text{ mm}$ y cubriéndolo con un cubreobjeto limpio¹ como se muestra en la Figura

¹Véase la sección *Limpieza de cubreobjetos* en el apéndice A.

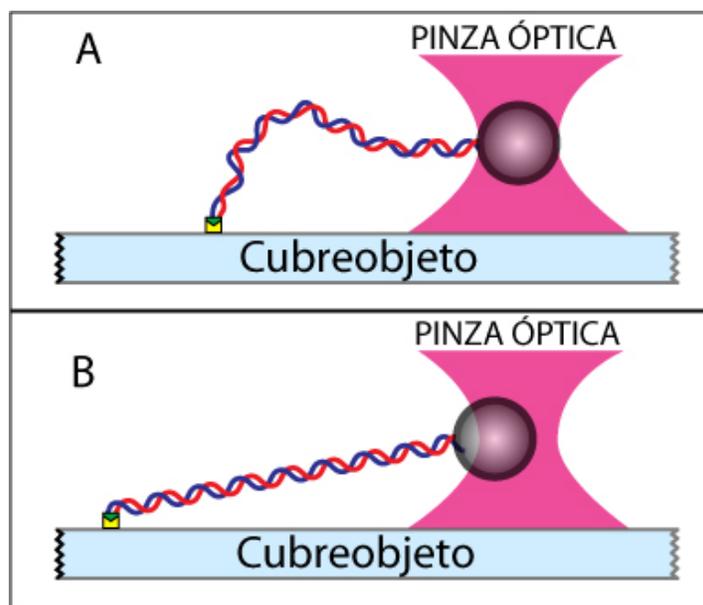


Figura 5.1: Geometría del ensayo para manipular moléculas individuales de ADN. **A**, Las moléculas de ADN se sujetan a la superficie de vidrio utilizando las moléculas que se unieron al ADN en el proceso de amplificación. La esfera unida a la molécula de ADN es atrapada por el láser. **B**, El cubreobjeto es desplazado con ayuda de la platina de forma que la molécula se tensa y jala a la esfera fuera del punto de equilibrio. La trampa ejerce una fuerza de restitución sobre la esfera que es transmitida a la molécula.

5.2. El flujo de las soluciones se realiza siempre sobre el cubreobjeto².

2. Se fluye el anticuerpo antidigoxigenina y se deja incubar durante 10 minutos. En este intervalo, la antidigoxigenina se difunde en la solución hasta alcanzar el cubreobjeto y se adhiere a éste de forma inespecífica.
3. Se fluye un buffer de lavado para retirar las moléculas de antidigoxigenina que no se hayan adherido a la superficie. Esta solución también contiene Albúmina Sérica Bovina³ para bloquear los sitios de interacción inespecífica que no han sido ocupados por el anticuerpo.

²En un microscopio convencional la superficie que sostiene a la muestra es el portaobjetos. En un microscopio invertido esta superficie es el cubreobjeto.

³BSA por sus siglas en inglés. Es una proteína de alto peso molecular utilizada ampliamente como agente bloqueador en diversos ensayos de biología molecular [46].

CAPÍTULO 5. ESTIRAMIENTO DE ADN Y RESULTADOS

4. Se fluyen las moléculas de ADN y se deja incubar durante 10 minutos. La digoxigenina en uno de los extremos del ADN interactúa de forma específica con el anticuerpo. La molécula de ADN queda sujeta al vidrio a través de esta interacción. El complejo que se tiene hasta ahora es *Vidrio+AntiDig* unido a la molécula *Dig+ADN+Bio*.
5. Se fluye nuevamente el buffer de lavado para retirar las moléculas de ADN que no estén sujetas al cubreobjeto. En general, las moléculas que resisten el lavado son aquellas que se unieron al vidrio a través del anticuerpo. Las interacciones inespecíficas del ADN con el vidrio se eliminan bloqueando la superficie con BSA (inciso número 2).
6. Se fluyen esferas de poliestireno previamente sonicadas⁴ y recubiertas de avidina. La avidina interactúa con la biotina que se encuentra en el extremo libre del ADN y así se forman los atados de ADN: *Vidrio+Antidig - Dig+ADN+Bio - Avi+Esfera*.
7. El canal se sella con barniz de uñas. Las esferas que no formaron un atado de ADN permanecen en solución y en algunos casos se pegan a la superficie en las regiones donde no se bloquearon los sitios de interacción inespecífica.

En una muestra realizada con este procedimiento hay 3 tipos de esferas: **i.-** Esferas sin movimiento unidas de forma inespecífica a la superficie. **ii.-** Esferas en solución, las cuales se difunden rápidamente. **iii.-** Esferas con movimiento Browniano restringido. Las esferas de tipo **iii** tienen desplazamientos del orden de 1 μm alrededor de un punto fijo. Este movimiento es típico de las esferas que se encuentran sujetas al vidrio a través de una o varias moléculas de ADN. Al complejo *ADN + esfera* que se encuentra unido a la superficie de vidrio se le denomina atado de ADN⁵.

⁴La sonicación es la aplicación de ondas acústicas para agitar las esferas y evitar que se encuentren aglomeradas.

⁵En inglés *DNA Tethering*

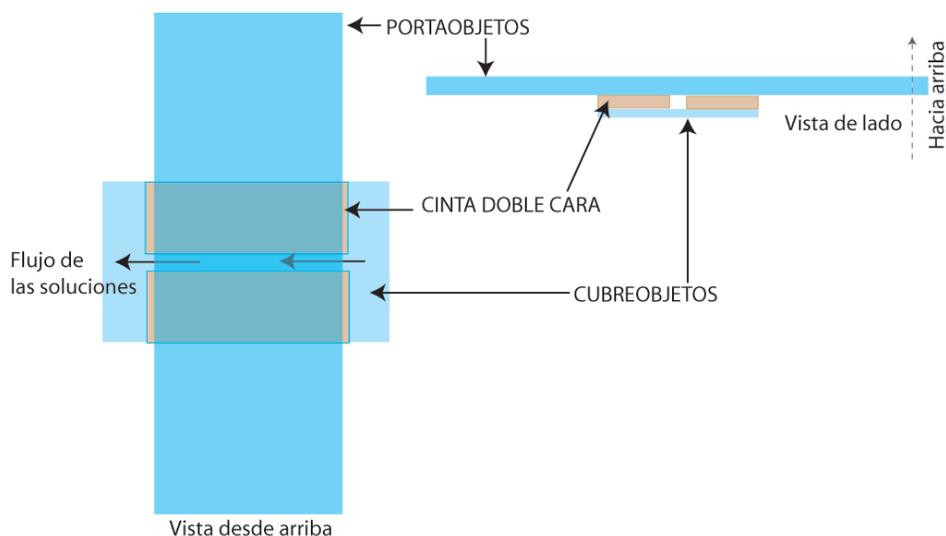


Figura 5.2: Preparación de un canal para contener la muestra. Sobre un portaobjetos se adhieren dos segmentos de cinta doble cara (Scotch). Sobre éstos se adhiere un cubreobjetos libre de otros residuos orgánicos. La limpieza de los cubreobjetos se realiza en un dispositivo de limpieza que remueve las impurezas a través de un plasma energético creado a partir de especies gaseosas (en nuestro caso aire) (Plasmacleaner). El cubreobjetos y el portaobjetos no pueden estar arbitrariamente cercanos debido al grosor de la cinta. El espacio entre las superficies de vidrio y los segmentos de cinta es una cavidad con los costados abiertos por la que posteriormente se fluyen las soluciones de la muestra. Una vez que se completa el protocolo para preparar la muestra, los costados abiertos son bloqueados por una capa de barniz de uñas para evitar que el líquido se evapore.

5.2. Curvas de Fuerza-Extensión

Las curvas de fuerza-extensión se obtienen realizando un procedimiento de 3 etapas.

1.-Calibración de la pinza óptica.

Se obtienen los coeficientes de conversión de unidades mediante el procedimiento descrito en la sección *Calibración del FDP* utilizando 10 esferas diferentes unidas al cubreobjetos⁶. Para determinar la rigidez de la trampa se sigue el procedimiento descrito en la sección *Métodos para determinar la rigidez de la trampa*. Este procedimiento se repite con al menos 5 esferas diferentes. Se toma un promedio de los valores y se almacena en los parámetros globales de la trampa.

⁶El número de esferas es el mínimo de esferas que se utilizaron. En general el número de esferas se eligió dependiendo de las condiciones de la muestra.

2.-Extensión de la molécula de ADN.

Las esferas con movimiento Browniano restringido son atrapadas utilizando la palanca de mando. En el plano trasversal, el centro de la esfera se posiciona directamente encima del punto de unión del ADN con el cubreobjeto. Ésto se realiza con un algoritmo bastante similar al que se utilizó para centrar a las esferas unidas al cubreobjeto en la mancha del láser (Figura 3.3). Notése que en esta ocasión las esferas están atrapadas en solución, pero se encuentran unidas al cubreobjeto a través de la molécula de ADN.

La platina se mueve de forma que el cubreobjeto se traslada a través de la mancha del láser. Las trazas resultantes en los ejes x y y tienen un aspecto significativamente diferente a las de una esfera unidas al cubreobjeto (Figura 5.3). De manera similar al caso de una esfera unida al cubreobjeto, el centro de la traza se determina ajustando una función, en este caso un polinomio de séptimo orden [54]. Dado que las trazas son asimétricas, se consideran sólo los términos impares de la expresión polinomial:

$$p(x) = a_1x + a_3x^3 + a_5x^5 + a_7x^7 \quad (5.1)$$

para el eje x . Una expresión similar se utiliza para el eje y .

Para automatizar el proceso de centrado se implementó una rutina en LabView. En una corrida típica en el eje x , la platina se desplaza inicialmente $2.0 \mu\text{m}$ a la izquierda. Se aplican desplazamientos de 10 nm y se registra la lectura de la señal del canal x del FDP. Este proceso se repite hasta que la posición de la esfera es $2.0 \mu\text{m}$ a la derecha de la posición original. La platina se desplaza a posición del centro encontrado. Un procedimiento completamente análogo se implementó para el eje y . El proceso se repite hasta que las trazas en ambos ejes son simétricas. Esto concluye el procedimiento de alineación.

Una vez que el centro de la esfera se encuentra justo encima del punto de unión con el vidrio, se inicia la captura de los datos, para lo cual se vuelve a desplazar la platina a través de la mancha del láser en los dos

CAPÍTULO 5. ESTIRAMIENTO DE ADN Y RESULTADOS

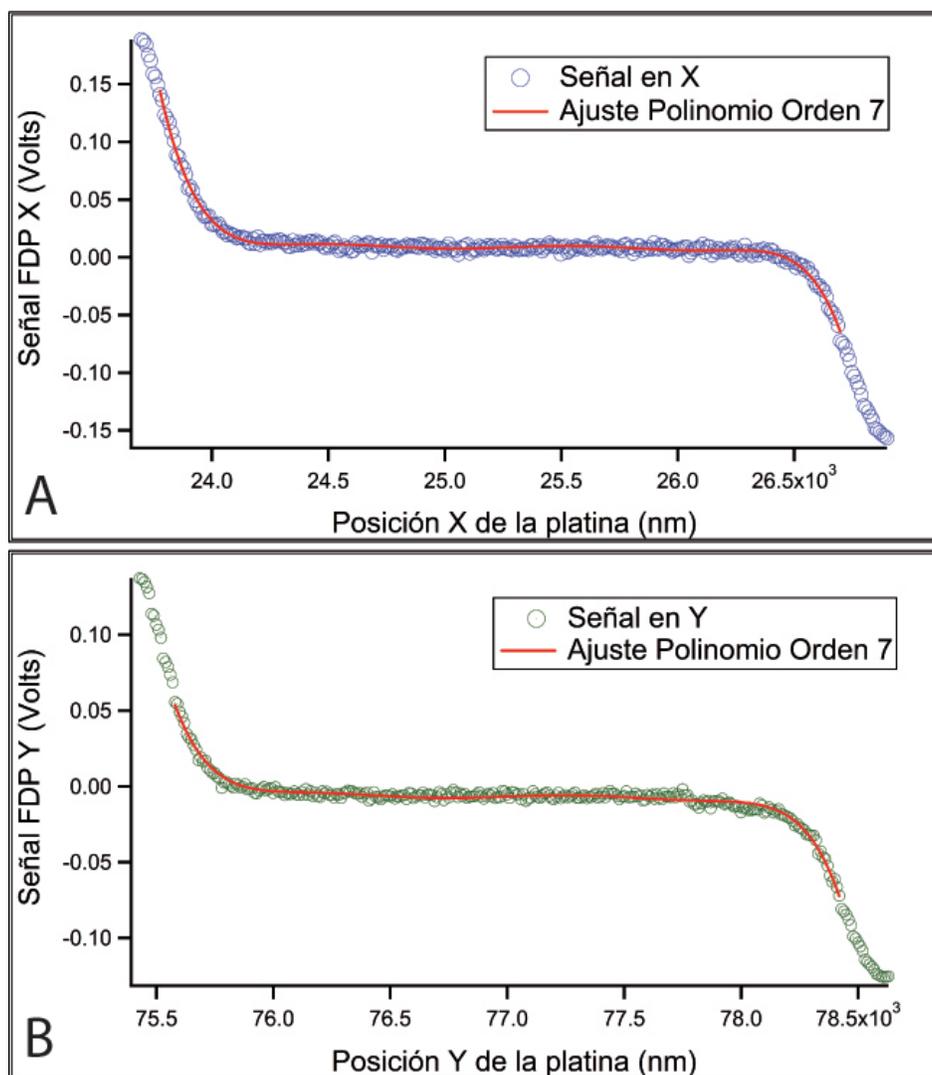


Figura 5.3: Trazas de extensión del ADN. Estas son el resultado de trasladar el cubreobjeto a través de la mancha del láser. En este proceso la molécula del ADN es estirada dos veces, a la derecha e izquierda del punto de equilibrio. Mientras el desplazamiento de la platina ocurre, la computadora adquiere la señal del FDP. **A**, línea sólida en azul. Señal del canal x del FDP al desplazar la platina en el eje x . El ajuste del polinomio de séptimo orden determina el centro de la traza y la divide en los dos procesos de estiramiento. **B**, Trazas resultante del desplazamiento en el eje Y , línea sólida en verde, y ajuste para encontrar el centro de la traza, línea sólida en rojo.

ejes trasversales. Esta vez los datos son almacenados para un análisis posterior. A las trazas resultantes les llamaré *trazas de extensión*.

Para desplazamientos de la platina suficientemente grandes, el ADN alcanza una tensión tal que jala a la esfera fuera de la posición de equili-

CAPÍTULO 5. ESTIRAMIENTO DE ADN Y RESULTADOS

brio, como se ve en la Figura 5.1B. La trampa a su vez ejerce una fuerza de restitución en la esfera y esta es transmitida al ADN. La respuesta de la molécula depende de sus características polimérica. Dado que la esfera y la superficie de vidrio muy rígidos en comparación con una molécula de ADN, lo que vemos en realidad es la respuesta del ADN [54].

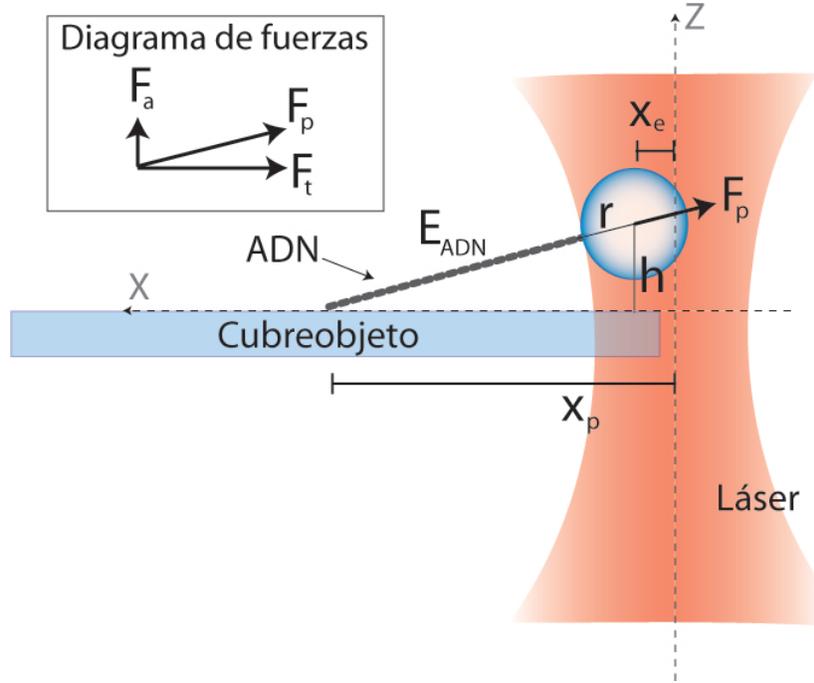


Figura 5.4: Cálculo de la extensión del ADN a partir de la extensión de la platina y de los desplazamientos de la esfera. A un tiempo dado, la platina se ha desplazado una distancia x_p llevándose consigo un extremo del ADN. El otro extremo del ADN se encuentra unido a la esfera y por ello ejerce una fuerza sobre la esfera desplazándola fuera de la posición de equilibrio una distancia x_e . La trampa óptica ejerce una fuerza de restitución sobre la esfera y a través de ella, ejerce una fuerza sobre el polímero. La extensión de la molécula puede ser calculada fácilmente a través del teorema de Pitágoras si además se conoce el radio r de la esfera y la altura h a la que se encuentra con respecto al cubreobjeto (ecuación 5.2).

Una geometría del ensayo y sus variables relevantes se muestran en la Figura 5.4. En el eje x , los desplazamientos de la esfera y la extensión de la molécula de ADN se encuentran relacionados a través de la siguiente expresión:

$$E_{ADN} = \sqrt{h^2 + (x_p - x_e)^2} - r \quad (5.2)$$

CAPÍTULO 5. ESTIRAMIENTO DE ADN Y RESULTADOS

donde E_{ADN} es la extensión del ADN, h es la altura medida desde el centro de la esfera, x_p es la posición del punto de anclaje del ADN al cubreobjeto con respecto al centro del láser (controlado con la platina), x_e es la posición de la esfera con respecto al centro del láser y r es el radio de la misma. Una expresión idéntica se obtiene para el eje y .

Para determinar las propiedades poliméricas del ADN no es necesario realizar un procedimiento de extensión en el eje axial. Sin embargo, como se puede apreciar en la ecuación 5.2, es importante conocer la altura h en la cual se obtienen las trazas de extensión.

La altura h a la que se toman las trazas de extensión se elige previamente a la medición mediante una rutina escrita en LabView. En esta rutina, la platina se desplaza en el eje axial de forma idéntica al proceso para determinar el punto de equilibrio en el mismo eje (Figura 3.4A), aunque con diferencias importantes.

Por debajo del punto de equilibrio, la platina y la esfera se desplazan prácticamente a la misma velocidad, separadas sólo por la longitud del polímero (Figura 5.5A). La traza en esta región es idéntica a la de una esfera unida al cubreobjeto. Este comportamiento continúa de la misma forma hasta que la esfera alcanza el punto de equilibrio y no se desplaza más en el eje axial. Por un tiempo muy corto, en realidad el tiempo que le lleva al cubreobjeto alcanzar el punto de equilibrio, los movimientos de la esfera son similares a los de una esfera atrapada en solución sin ADN (Figura 5.5B). Enseguida, el cubreobjeto alcanza el punto de equilibrio y acarrea a la esfera de la misma forma que si ésta se encontrase unida a la superficie de vidrio (Figura 5.5C).

La traza obtenida con este procedimiento presenta claramente los tres comportamientos descritos (Figura 5.5D). El punto donde la traza deja de ser aproximadamente la de una esfera en solución y se convierte en la de una esfera unida al cubreobjeto sirve para inferir la posición actual del cubreobjeto con respecto a la posición de la trampa. Finalmente, con una instrucción de movimiento de la platina en la rutina de LabView, se posiciona a la superficie a una distancia h del punto de equilibrio. En todos los ensayos, las trazas de extensión se tomaron a una distancia $h = r$, donde $r = 365 \mu\text{m}$ es el radio de las esferas utilizadas. El análisis de

CAPÍTULO 5. ESTIRAMIENTO DE ADN Y RESULTADOS

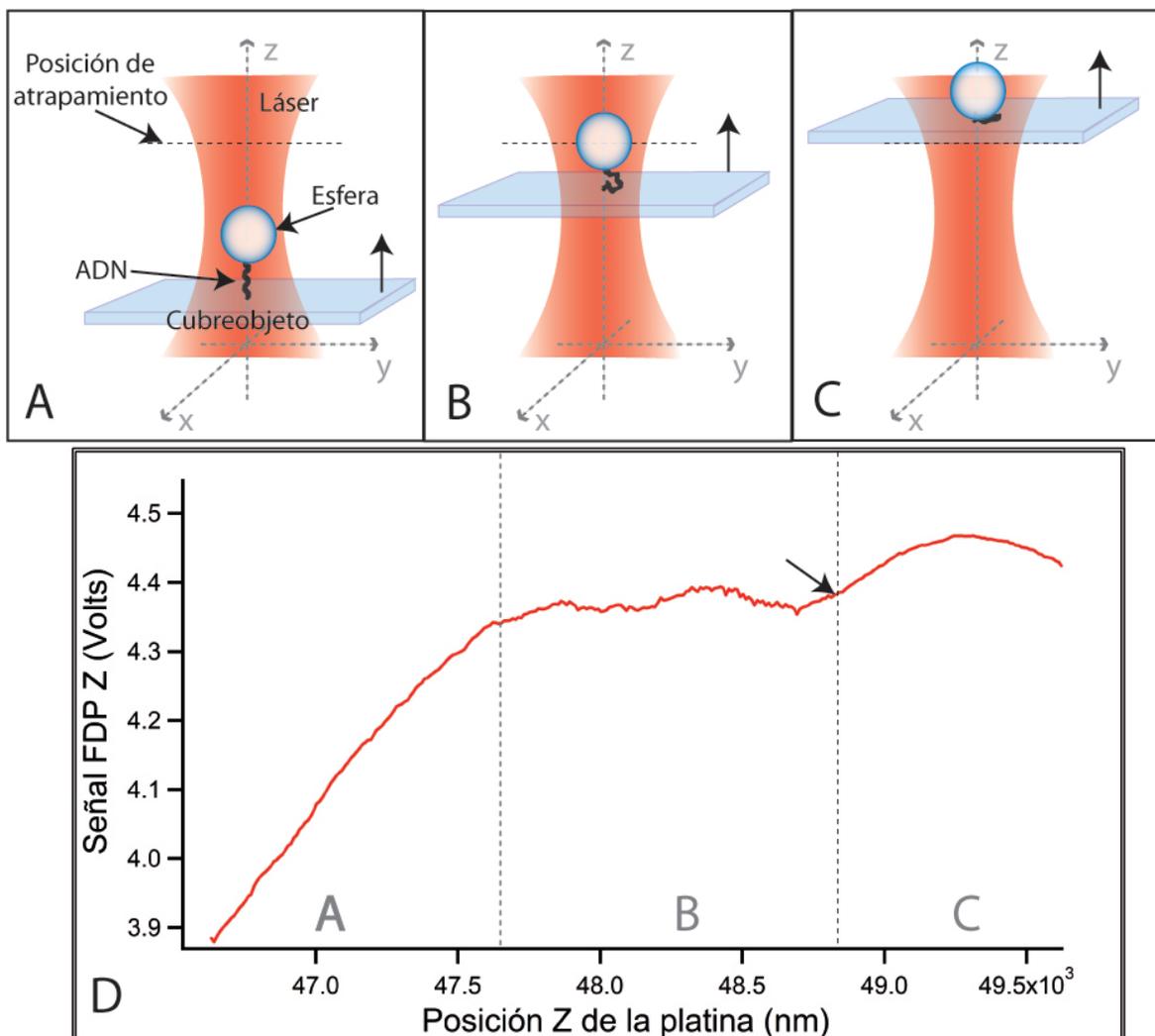


Figura 5.5: Determinación de la altura de una esfera con ADN. Se traslada la esfera en el eje axial. **A**, Cuando la esfera se encuentra por debajo del punto de equilibrio, la molécula de ADN se encuentra siempre elongada debido a que la esfera tiende a irse hacia el centro de la trampa. La esfera y el cubreobjeto se desplazan al mismo tiempo pero separados por la longitud de la molécula. **B**, La esfera alcanza el punto de equilibrio. Al cubreobjeto le toma un tiempo alcanzar este punto mientras cubre la distancia de separación con la esfera. **C**, El cubreobjeto alcanza el punto de equilibrio y acarrea a la esfera en la misma dirección de su desplazamiento. **D**, Señal del canal z del FDP. Los casos presentados en los paneles A, B y C definen tres regiones en la traza de una esfera con ADN, aquí señaladas con las letras correspondientes en gris y divisiones con líneas punteadas en gris. Para el caso del panel A, la traza de la esfera es similar a la de una esfera. Para el panel B se tiene que durante un tiempo muy corto, la esfera se comporta como una esfera sin ADN atrapada en solución. Finalmente, en el panel C la esfera vuelve a comportarse como una esfera unida al cubreobjeto. La flecha en negro señala el punto donde el cubreobjeto choca con la esfera. Este corresponde al punto de equilibrio de la trampa antes calculado.

CAPÍTULO 5. ESTIRAMIENTO DE ADN Y RESULTADOS

los datos se realiza considerando esta condición.

3.- Construcción de las curvas de fuerza - extensión

Una curva de fuerza-extensión, como su nombre lo indica, es una gráfica de la extensión de la molécula de ADN en función de las fuerzas aplicadas al polímero. La fuerza total que se ejerce sobre el polímero tiene una componente transversal y una longitudinal. Las fuerzas aplicadas transversalmente se calculan directamente de los desplazamientos de la esfera al multiplicar por la constante de rigidez de la trampa. Cuando el desplazamiento ocurre en el eje x la fuerza está determinada por la siguiente expresión⁷:

$$F_x = -\kappa_x x_e \quad (5.3)$$

donde F_x es la fuerza ejercida transversalmente en el eje x , κ_x y x_e como se definieron antes. Todos nuestros ensayos fueron realizados con la condición $h = r$, es decir la esfera estaba en contacto con la superficie. Esta geometría dicta la magnitud de la fuerza axial. El diagrama de fuerzas se esquematiza en la Figura 5.4. La fuerza total ejercida sobre el polímero (F_p) se encuentra relacionada con la fuerza ejercida transversalmente de la siguiente forma:

$$F_p = \frac{F_x}{\cos\theta} = \left(\frac{r + E_{ADN}}{x_p - x_e} \right) F_x \quad (5.4)$$

Las curvas de fuerza-extensión se calcularon en forma posterior a la adquisición de datos, utilizando un algoritmo escrito en Igor Pro, el cual es un *software* de análisis de datos científicos equipado con lenguaje de programación y ambiente de cómputo numérico. El algoritmo consiste en realizar las siguientes operaciones con los datos almacenados:

- Los desplazamientos de la esfera (en nanómetros) se obtienen multiplicando la señal del canal x del FDP (en volts) por el coeficiente de conversión de unidades $C_{x-v/nm}$.

⁷Sin pérdida de generalidad, en adelante se considerará el análisis para el eje x . El análisis es completamente análogo en el eje y .

CAPÍTULO 5. ESTIRAMIENTO DE ADN Y RESULTADOS

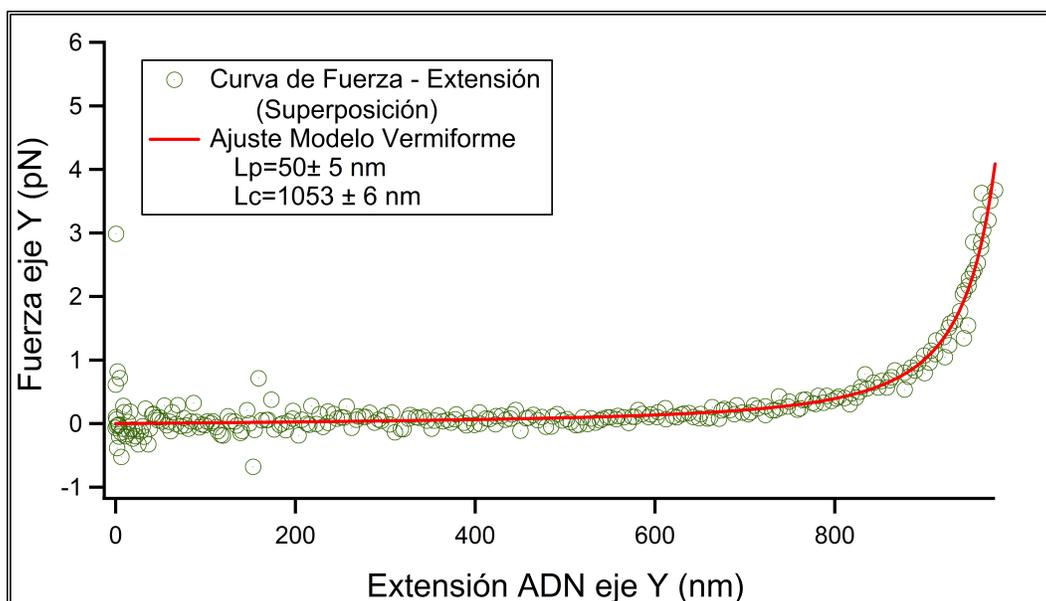


Figura 5.6: Curva de Fuerza-Extensión para una molécula de ADN en el eje y . Se calculan las fuerzas aplicadas sobre el polímero, la extensión del ADN y se despliegan en una gráfica de la forma F_p vs. E_{ADN} . La curva de fuerza extensión resultante contiene la información de 2 procesos de estiramiento. El centro de la traza la divide en dos secciones y éstas se superponen. En esta gráfica, se muestra una curva de fuerza extensión obtenida al desplazar la esfera en el eje y , marcadores redondos en verde. El ajuste de una función de acuerdo al modelo vermiforme, ecuación 5.5 nos da como resultado los valores de L_p y L_c , línea sólida en rojo.

- Las fuerzas transversales ejercidas sobre la esfera se obtienen a partir de los desplazamientos multiplicando por la constante de rigidez κ_x (ecuación 5.3).
- Las fuerzas ejercidas sobre el polímero se obtienen a partir de las fuerzas transversales utilizando la relación de la ecuación 5.4.
- La extensión del polímero se obtiene utilizando la expresión de la ecuación 5.2.
- Finalmente la curva de fuerza-extensión se obtiene al graficar la fuerza ejercida sobre el polímero contra la extensión de la molécula de ADN.

Las curvas obtenidas de esta manera están listas para ser analizadas.

5.3. Análisis de las curvas de Fuerza - Extensión

Estudios previos de las características poliméricas del ADN han demostrado que el modelo que mejor aproxima a este biopolímero es el modelo vermiforme⁸ [48]. En este modelo una molécula de ADN es descrita como un filamento muy delgado que obedece la ley de Hooke para deformaciones muy pequeñas. La molécula se modela como un rodillo con propiedades entrópicas y deformaciones continuas con elementos diferenciales sucesivos que presentan algún tipo de cooperatividad y apuntan más o menos en la misma dirección. Dos parámetros definen completamente a una cadena vermiforme [49]: su longitud de contorno y su longitud de persistencia.

La longitud de contorno L_c es el tamaño del polímero cuando se ha extendido hasta su longitud máxima sin causarle ninguna deformación. Por comparación con un banda elástica, la longitud de contorno corresponde al tamaño de la banda elástica antes de comenzar a estirla. En el caso de una molécula de ADN, L_c es igual al tamaño de cada base (~ 0.34 nm) multiplicado por el número de bases que ésta tiene. Para una molécula de ADN de 3063 pares de bases, como las que se utilizaron en este ensayo, la longitud de contorno esperada es de $L_c \approx 1041$ nm.

La longitud de persistencia L_p es una medida del grado de flexibilidad de un polímero o una cadena. Se define como la distancia para la cual dos elementos diferenciales dejan de estar correlacionados. Un varilla de espagueti sin cocinar⁹ tiene una longitud de persistencia del orden de 10^{16} m y cocinada es del orden de unos pocos centímetros (1-10 cm) [53]. La longitud de persistencia de una molécula de ADN se ha reportado alrededor de 45 nm y es dependiente de las concentraciones salinas del

⁸Del latín *vermis* que significa gusano y *forma* que es la palabra usual de forma. En inglés se conoce como modelo *Worm Like Chain*.

⁹Calculada a partir de la expresión que relaciona la longitud de persistencia con el modulo de Young: $L_p = EI/k_B T$, donde $E = 5$ GPa es el modulo de Young para el espagueti sin cocinar e $I = \pi r^4/4$ es el momento de inercia superficial de un rodillo de radio r , en este ejemplo se tomó $r = 1$ mm, $k_B T$ es la energía térmica a temperatura ambiente [51, 52].

CAPÍTULO 5. ESTIRAMIENTO DE ADN Y RESULTADOS

buffer utilizado [54] (en nuestro caso 100 mM Na⁺). Para un buffer de fosfato de sodio (Na₂HPO₄, pH 7.0) a 10 mM Na⁺ la longitud de persistencia reportada es de (47 ± 1) nm, mientras que para un buffer a 150 mM Na⁺ y 5 mM Mg₂⁺ es de (43 ± 2) nm.

La relación entre la fuerza aplicada F y la extensión de una cadena vermiforme x está dada por la siguiente expresión:

$$F = \frac{k_B T}{L_p} \left[\frac{1}{4} \left(1 - \frac{x}{L_c} \right)^{-2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L_c} \right] \quad (5.5)$$

Resultados

Se determinó la longitud de contorno y la longitud de persistencia para las moléculas de ADN descritas en el capítulo *Sistema biológico: Moléculas de ADN*. A un total de 126 curvas de fuerza extensión (FE) provenientes de 63 moléculas diferentes se les ajustó una función de acuerdo al modelo de la cadena vermiforme (Figura 5.6).

Para realizar el ajuste a cada una de las curvas FE se implementó un algoritmo en Igor Pro que realiza los siguientes procedimientos:

- Se determina el centro de cada curva FE mediante el ajuste de un polinomio de séptimo orden, ecuación 5.1.
- La curva FE se divide por el centro en dos secciones y se superponen (ver Figura 5.6).
- A la superposición se le ajusta una función de acuerdo al modelo vermiforme, (ecuación 5.5). El ajuste se realiza para los puntos de la curva cuya fuerza es menor o igual a 4 pN (Figura 5.6). Éste valor garantiza que nuestras mediciones se encuentran dentro de la región lineal de detección (ver la sección *Determinación del tamaño de la región lineal del FDP*).
- Finalmente, los parámetros L_p y L_c son almacenados en un archivo de datos.

CAPÍTULO 5. ESTIRAMIENTO DE ADN Y RESULTADOS

Se realizaron histogramas de los valores obtenidos para conocer la distribución de L_p y L_c . Se les ajustó una función Gaussiana para determinar el valor promedio y la desviación estándar (ver Figura 5.7). Los valores obtenidos son: $\mathbf{L_p = (48 \pm 9) \text{ nm}}$ y $\mathbf{L_c = (1105 \pm 20) \text{ nm}}$.

CAPÍTULO 5. ESTIRAMIENTO DE ADN Y RESULTADOS

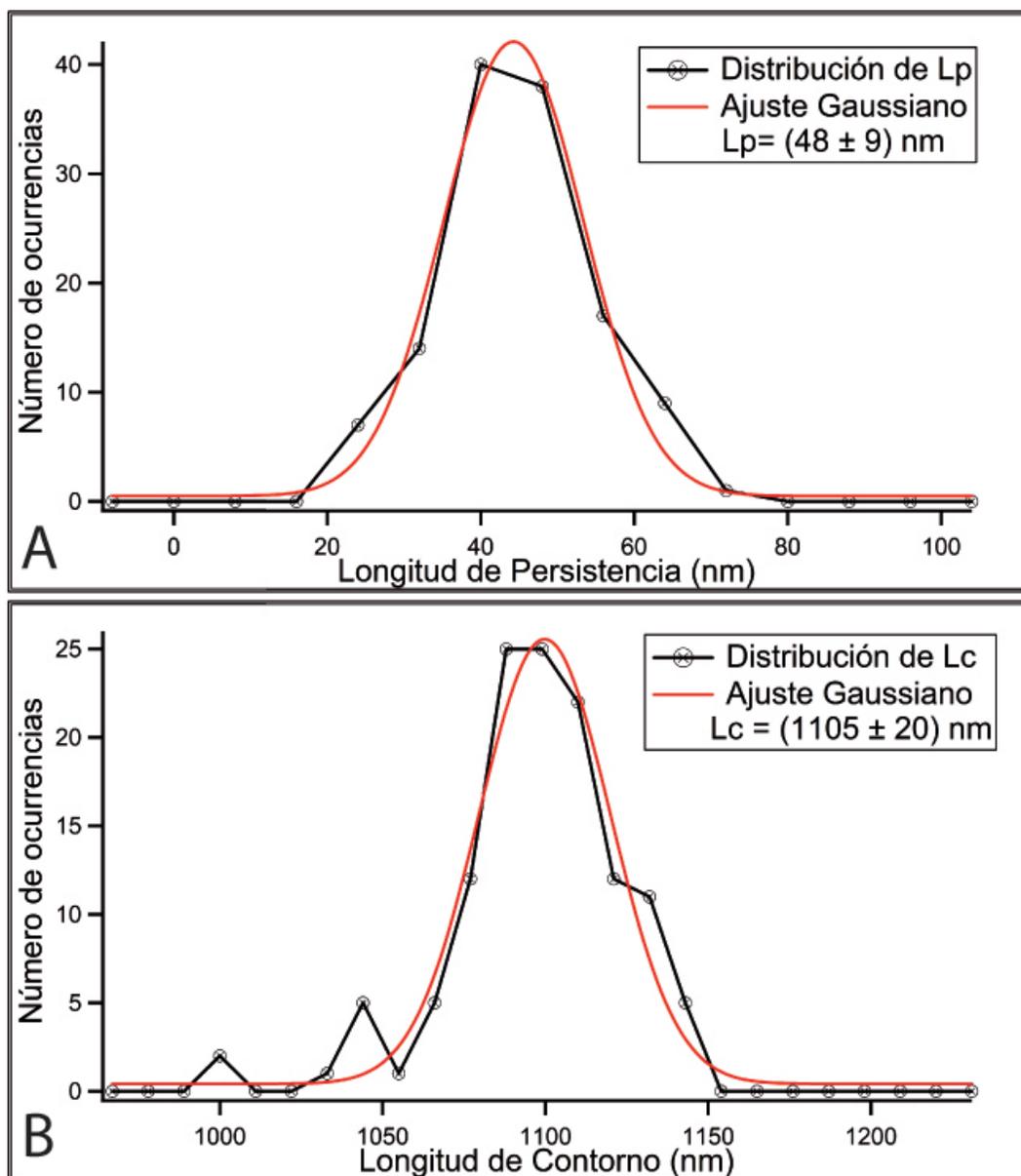


Figura 5.7: Resultados obtenidos para las características poliméricas del ADN. **A**, Distribución de la longitud de persistencia. Se elaboró un histograma con un tamaño de clase de 8nm, línea con marcadores en negro. El valor para L_p se reporta como valor medio \pm desviación estándar, y ha sido obtenido a partir de un ajuste Gaussiano, línea sólida en rojo. **B**, La distribución de la longitud de contorno se obtuvo elaborando un histograma con un tamaño de clase de 11 nm, línea con marcadores en negro. El valor obtenido con un ajuste Gaussiano, línea sólida en rojo, se reporta igual que en el panel A. $n=126$ curvas de fuerza-extensión en x y y obtenidas de 63 moléculas diferentes.

CAPÍTULO 5. ESTIRAMIENTO DE ADN Y RESULTADOS

Discusión y conclusiones

En los ensayos de moléculas individuales, una de las tareas más importantes es garantizar que la manipulación se realizó sobre una sola molécula; en otro caso, se perdería el propósito de este tipo de ensayos ya discutido en la Introducción de este trabajo. Para determinar si los polímeros manipulados corresponden a una única molécula, diversos autores han venido determinando cómo se modifican los parámetros del modelo de la cadena vermiforme en presencia de dos o más polímeros unidos a una esfera de poliestireno [55, 56]. Entre los resultados que se han reportado se encuentra que, para polímeros idénticos unidos a la esfera uno junto al otro en forma paralela, la longitud de persistencia L_p decae en forma proporcional al número de moléculas unidas a la esfera. En particular, si el número de moléculas unidas es dos, entonces L_p es la mitad del valor reportado para el mismo polímero en forma individual. En ese tipo de configuración, la longitud de contorno no se ve modificada; sin embargo, la fuerza necesaria para elongar completamente al par de macromoléculas es el doble de la fuerza requerida para uno solo de estos polímeros [57]. En un caso más general, para diversos polímeros unidos a la esfera en forma arbitraria, la observación inmediata es que las trazas de extensión no son simétricas alrededor del centro de la trampa y no son iguales en ambos ejes. Además, como regla general, la longitud de persistencia y la longitud de contorno son menores que en el caso de una molécula individual.

CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

A partir de estas observaciones, concluimos que los valores reportados en este trabajo son el resultado de la manipulación de moléculas individuales de ADN. Las trazas que se analizaron fueron seleccionadas de acuerdo a los siguientes criterios: 1.- Trazas simétricas. 2.- Trazas iguales en ambos ejes, y 3.- La región horizontal de la traza tiene un tamaño mayor a $\sim 2 \mu\text{m}$ (~ 2 veces la longitud esperada para la cadena de ADN). Se desecharon aquellas trazas que, de forma evidente, presentaron las características reportadas para los multipolímeros (Figura 6.1). Los resultados obtenidos para la longitud de persistencia, $L_p = (48 \pm 9) \text{ nm}$, concuerdan bastante bien con los valores reportados previamente en ensayos de moléculas individuales de ADN ($\sim 40\text{-}50 \text{ nm}$, dependiendo de las concentraciones iónicas) [54]. Además, el valor obtenido para la longitud de contorno, $L_c = (1105 \pm 20) \text{ nm}$, aunque ligeramente por encima del valor esperado, 1056 nm , –longitud calculada a través de: el número de bases multiplicado por la distancia entre bases (1041 nm) más el tamaño de las moléculas de unión con el vidrio y la esfera (15 nm)– cae dentro de la incertidumbre reportada por otros autores [54].

La precisión de los valores obtenidos en nuestro trabajo es bastante aceptable ya que se obtuvieron suficientes curvas para realizar una buena estadística. Los errores estándar (SE) encontrados fueron: $\text{SE} = 0.8 \text{ nm}$ para L_p y $\text{SE} = 2 \text{ nm}$ para L_c , con un total de $n = 126$ curvas FE. Los errores reportados por otros autores (L_p , $\text{SE} \sim 1.0 - 1.1 \text{ nm}$; L_c , $\text{SE} \sim 3 - 5 \text{ nm}$; $n = 10\text{-}15$ curvas FE [54]) podrían conseguirse utilizando un rango de fuerzas mayor ($\sim 0 - 40 \text{ pN}$), lo cual permite discriminar más fácilmente a ciertas configuraciones multipoliméricas que resulten poco evidentes en el régimen de fuerzas pequeñas ($\sim 0 - 4 \text{ pN}$) y disminuir de esta forma, la dispersión de los valores de L_p y L_c .

La exactitud de nuestras mediciones se vió afectada por algunas fuentes de error sistemático detectadas durante nuestros ensayos. Las más inmediatas fueron los errores en la determinación de las desplazamientos de la esfera y la constante de rigidez de la trampa. A continuación presento una propagación de estos errores sistemáticos en la obtención de la fuerza y la extensión del ADN. Dado que la fuerza en el régimen lineal es de la forma: $F = -\kappa x$, se sigue que toda incertidumbre en κ se

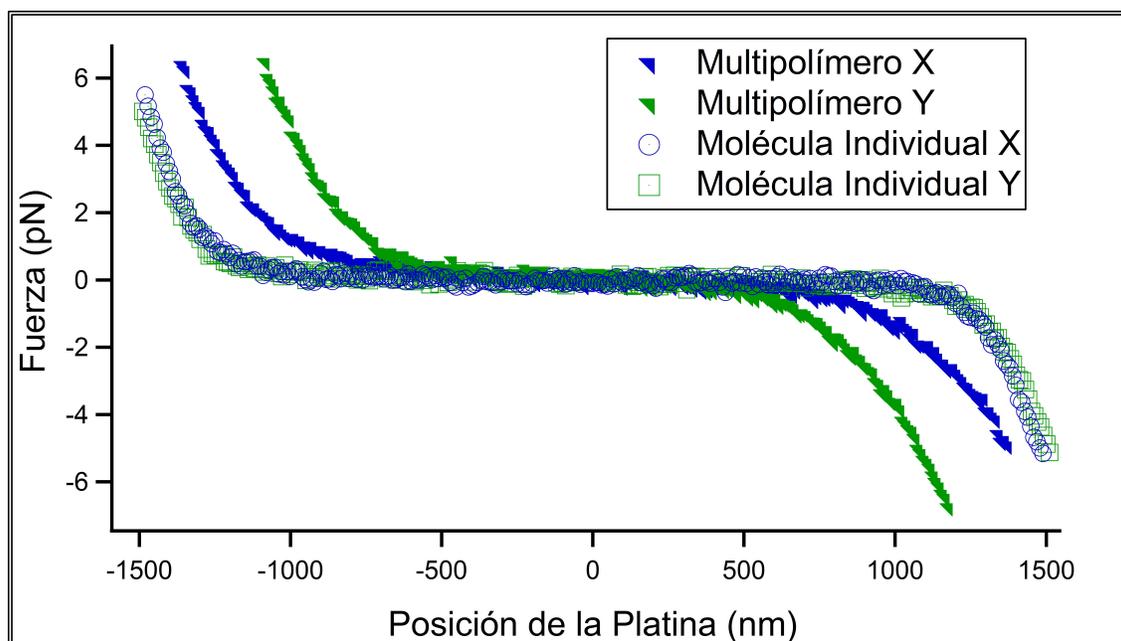


Figura 6.1: Comparación de la traza de extensión de un multipolímero con la traza de extensión de una única molécula. Las trazas que corresponden a una única molécula son simétricas, iguales en los dos ejes y la región horizontal mide más de $2 \mu\text{m}$, marcadores redondos vacíos en azul para el eje x y marcadores vacíos en verde para el eje y (ambas trazas se tomaron utilizando la misma esfera). Los casos multipoliméricos obvios presentan desigualdades notables al comparar las trazas en los dos ejes y generalmente son más cortas, marcadores triangulares llenos en azul para el eje x y marcadores triangulares en verde para el eje y (ambas trazas se tomaron utilizando la misma esfera).

propaga en forma proporcional a la fuerza. Lo mismo se sigue de la incertidumbre en los desplazamientos. Por simplicidad, considérese en este desarrollo para el eje x , el caso para el cual el error absoluto es mayor: $F_p = 4 \text{ pN}$ (el cual corresponde al valor máximo que se incluyó en el análisis de los datos). No obstante, debe tenerse en cuenta que el error relativo, $\Delta F_p / F_p$, es aproximadamente el mismo en todos los casos del mismo eje.

De acuerdo a la ecuación 5.3, el error en la determinación de la fuerza trasversal ΔF_x es:

$$\begin{aligned} \Delta F_x &= x_e \Delta \kappa_x + \kappa_x \Delta x_e \\ &\approx (93 \cdot 0.012) \text{ pN} + (0.041 \cdot 3.7) \text{ pN} \\ &\approx 1.26 \text{ pN} \end{aligned} \tag{6.1}$$

El valor de κ_x y el error en su medición $\Delta \kappa_x$ han sido tomados del cuadro

CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

3.2. Para una fuerza de 4 pN, el desplazamiento de la esfera medido es de ~ 93 nm (valor típico). El error asociado a la medición del desplazamiento, $\Delta x_e = 3.7$ nm, se calculó en forma proporcional al error en la determinación del coeficiente de calibración que se muestra en el cuadro 3.1, el cual es de $\sim 4\%$.

Por otro lado el error en la determinación de la extensión de la molécula de ADN, ΔE_{ADN} está dada de acuerdo a la ecuación 5.2 como:

$$\begin{aligned}\Delta E_{ADN} &= \frac{1}{2} (h^2 + (x_p - x_e)^2)^{-1/2} (2h\Delta h + 2(x_p - x_e)\Delta x_e) \\ &\approx \frac{1}{2} (365^2 + (1320)^2)^{-1/2} \cdot (2 \cdot 365 \cdot 50 + 2 \cdot (1320) \cdot 3.7) \text{ nm} \\ &\approx 17 \text{ nm}\end{aligned}\tag{6.2}$$

donde se ha tomado en cuenta la condición en la que fueron realizados nuestros ensayos, $h = r$, donde $r = 365$ nm, es el radio de las esferas utilizadas. Para la fuerza considerada en este análisis, $F_p = 4$ pN, $x_p = 1413$ nm y $x_e = 93$ nm son valores típicos para los desplazamientos del punto de anclaje de la molécula y la esfera, respectivamente, con respecto al centro del láser. El error en la determinación de x_p no es considerado debido a que la platina piezoeléctrica tiene precisión subnanométrica y resulta muy pequeña en comparación con el error de x_e (≈ 3.7 nm). El error en la determinación de la altura h utilizando el método ya descrito en el capítulo *Estiramiento de ADN y resultados* ha sido reportado por otros autores como $\Delta h \approx 50$ nm [10].

Finalmente, el error en la determinación de la fuerza que actúa en la dirección de elongamiento del polímero es:

$$\begin{aligned}\Delta F_p &= \left(\frac{r + E_{ADN}}{x_p - x_e} \right) \Delta F_x + \frac{\Delta E_{ADN}(x_p - x_e) + (r + E_{ADN})\Delta x_e}{(x_p - x_e)^2} F_x \\ &\approx \frac{365 + 1005}{1320} \cdot 1.26) \text{ pN} + \frac{(17 \cdot 1320) + (365 + 1320) \cdot 3.7}{(1320)^2} 4 \text{ pN} \\ &\approx 1.31 + 0.06 \text{ pN} = 1.37 \text{ pN}\end{aligned}\tag{6.3}$$

Realizando un análisis análogo en el eje y , se encuentra que el error

CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

en la determinación de la extensión de la molécula es: $\Delta E_{ADN} \approx 24$ nm. En este mismo eje, el error en la determinación de la fuerza aplicada en la dirección de elongación del polímero es: $\Delta F_p \approx 1.8$ pN.

Como se puede ver, el error en la determinación de la extensión del ADN es muy pequeña ($\sim 1\%$), en cambio, el error en la determinación de la fuerza es mucho mayor ($\sim 40\%$). La contribución principal es debida al error sistemático en la determinación de κ , el cual es del mismo orden $\sim 30\%$ y pudo haberse debido a la presencia de impurezas en las soluciones buffer utilizadas. Las soluciones utilizadas fueron purificadas con un filtro de $0.22 \mu\text{m}$, sin embargo, el mal manejo de las pipetas o bien, una mala limpieza de las superficies de vidrio, pudieron originar la presencia de pequeñas partículas que modificaron nuestras mediciones. Lo anterior se sugiere en virtud de algunas observaciones hechas durante procedimientos de calibración de prueba, en los cuales la presencia de partículas pequeñas afectó principalmente a los resultados obtenidos con el método del espectro de potencias y, aunque en menor medida, también a los resultados del método de la varianza.

El error sistemático en la determinación de la constante de rigidez puede ser reducido hasta $\sim 10\%$ mediante la implementación de un tercer método independiente [10, 9, 47]. El método propuesto se conoce como método (de la fuerza) de arrastre de Stokes, el cual resulta ser más robusto ante la presencia de pequeñas partículas en el medio. Consiste en determinar el desplazamiento de la esfera fuera de la posición de equilibrio, resultante de la compensación entre la fuerza de restitución de la trampa y la fuerza de arrastre debida a un flujo creado en la solución donde se encuentra la esfera. La posición de equilibrio x^* para una esfera de radio r atrapada, en presencia de un flujo laminar con velocidad v , está dado por la siguiente relación:

$$\kappa x^* = 6\pi\eta r v \quad (6.4)$$

Donde η es la viscosidad del medio donde se encuentra la esfera (en nuestro caso, típicamente la del agua). Las partículas pequeñas que son capturadas por la trampa inmediatamente son liberadas debido a la fuer-

CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

za de arrastre del flujo, por esta razón, los valores de κ no son modificados significativamente por las impurezas del medio.

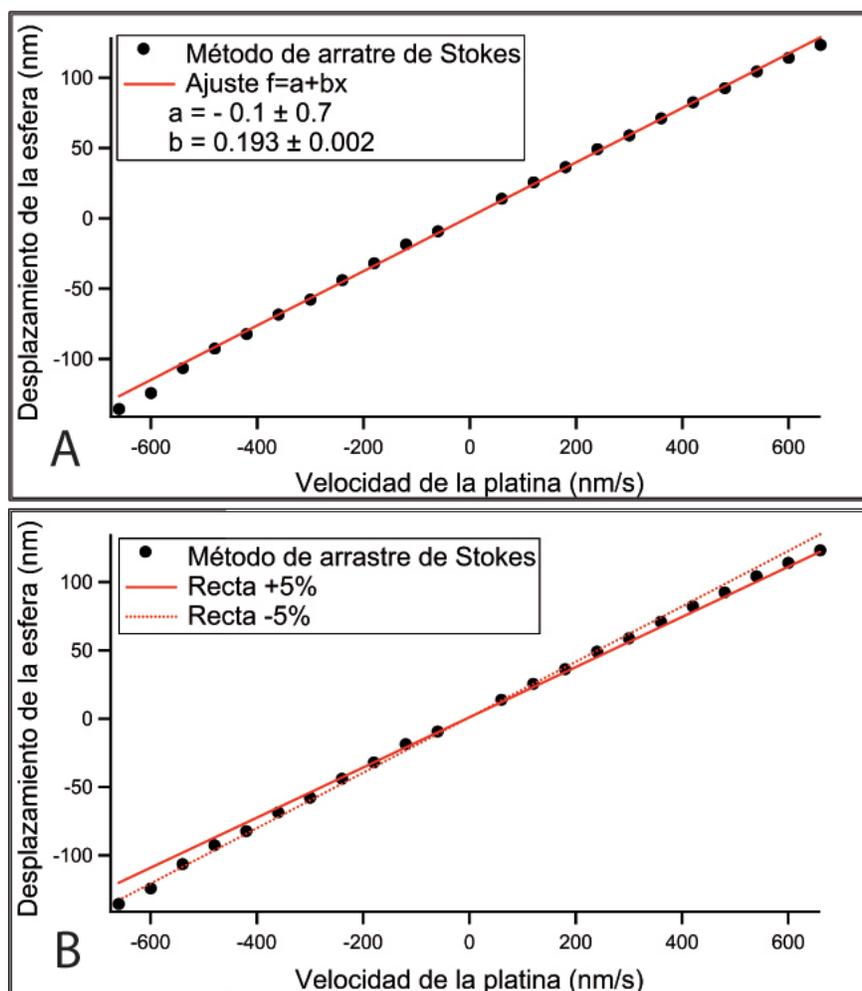


Figura 6.2: Método de arrastre de Stokes. **A**, La platina se desplaza a una velocidad v y se determina el nuevo punto de equilibrio x^* de la esfera. El proceso se repite a diferentes velocidades.

Hacia el final de este proyecto se exploró la posibilidad de implementar este método en nuestra pinza óptica. Actualmente, ya se tiene una rutina implementada en LabView para obtener los valores de κ . El procedimiento, a grandes rasgos, consiste en crear un flujo mediante el desplazamiento de la platina piezoeléctrica a una velocidad constante v . Para una velocidad dada, se determina el desplazamiento de la esfera fuera de la posición de equilibrio. Este procedimiento se repite para

diferentes velocidades, con lo cual se obtiene una serie de datos del desplazamiento de la esfera en función de la velocidad de la platina.

Además de proporcionar una alternativa para la calibración de la trampa, el método de Stokes proporciona información sobre la región lineal de la trampa (es decir, en donde la relación $F = -\kappa x$ es válida). Para valores pequeños de la velocidad, se encontró, como era esperado, que el desplazamiento de la esfera es proporcional a la velocidad de la platina (Figura 6.2A). El criterio para determinar qué puntos corresponden a una respuesta lineal en el desplazamiento es bastante similar al discutido en la sección *Calibración de la pinza* para la calibración del fotodetector de posición (Figura 6.2B). Para una constante de rigidez de $\sim 0.035 \text{ pN}\cdot\text{nm}^{-1}$, la región lineal de la trampa es de $\approx 230 \text{ nm}$, lo cual determina el valor máximo de las fuerzas de Hooke que se pueden aplicar: $\sim 4 \text{ pN}$. La implementación del método de arrastre de Stokes permitió corroborar que, en todos nuestros ensayos, las fuerzas aplicadas a las moléculas de ADN siempre se encontraron en el régimen lineal de la trampa.

Además del error introducido por la determinación de κ , existen otras fuentes de error sistemático que podrían deberse a las condiciones del medio en el que se encuentra el atado de ADN. Por un lado se tiene que la fuerza iónica del medio afecta tanto la longitud de persistencia como la longitud de contorno [54]. Algunos autores sugieren que el gran tamaño de la longitud de persistencia del ADN ($\sim 50 \text{ nm}$, comparado con el tamaño de las bases $\sim 0.34 \text{ nm}$) es debida a la repulsión electrostática de las cargas a lo largo del esqueleto del ADN y, por lo tanto, es de esperarse que el apantallamiento de las cargas reduzca el valor de L_p . Lo cierto es que la relación: a mayor número de iones positivos menor el valor de la longitud de persistencia, no se ha demostrado. Para determinar cuál es el efecto de las condiciones salinas utilizadas en este ensayo sobre los valores de L_p y L_c , es necesario realizar un análisis más cuidadoso, utilizando diferentes fuerzas iónicas en las soluciones. Otro parámetro que debe ser analizado con mayor detalle es el número de horas durante las cuales se trabaja una misma muestra (en nuestro caso, $\sim 3 - 7$ horas). No cambiar la muestra durante períodos largos de tiempo podría causar

CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

un error sistemático debido a que la luz láser infrarroja incidiendo sobre el agua produce la formación de especies reactivas de oxígeno, las cuales son moléculas altamente reactivas con diversos componentes biológicos debido a una capa de electrones de valencia no apareada [58]. Entre otros efectos dañinos que producen en las células, como la oxidación de ácidos grasos y proteínas, también se ha determinado que estas especies producen la oxidación del ADN. Cómo afecta a las propiedades poliméricas y en cuánto tiempo este efecto se vuelve significativo para un ensayo de moléculas individuales con ADN, son características que se desconocen; sin embargo, es sabido que se pueden disminuir estos efectos si se agregan a las soluciones algunas enzimas, tales como la catalasa oxidasa, que impiden la formación de las especies reactivas.

En los ensayos con moléculas individuales se requiere detectar desplazamientos pequeños (1-10 nm) [4, 13, 60], correspondientes a, por ejemplo, el tamaño de las traslocaciones unitarias de una proteína motora o al desplazamiento debido a los cambios conformacionales de una macromolécula. Por otro lado, las fuerzas aplicadas a partir de las cuales comienza a verse un cambio en el comportamiento de algunas proteínas motoras, es de un par de piconewtons [4]. Estos datos determinan la sensibilidad que interesa obtenerse en nuestra pinza óptica para realizar futuros ensayos. La sensibilidad, definida como la señal mínima (S_{min}) que se puede diferenciar del ruido (N), satisface una razón de señal a ruido $S_{min}/N \approx 1$. En nuestro dispositivo la sensibilidad en la detección de los desplazamientos de la esfera, y por ende, las fuerzas aplicadas sobre ella, está limitada principalmente por dos factores.

1. El movimiento Browniano de la esfera. En una pinza óptica, una esfera atrapada presenta un movimiento intrínseco debido a la energía térmica del medio en el que se encuentra. Este movimiento se encuentra siempre superpuesto a los desplazamientos de la esfera que se quieren detectar. En experimentos típicos, la amplitud del movimiento Browniano limita el tamaño mínimo de los desplazamientos que podemos detectar. El desplazamiento cuadrático medio de la esfera, o desviación estándar σ_x , en el eje x está dado por:

$$\sigma_x = \sqrt{\langle x^2 \rangle} = \sqrt{\frac{k_B T}{\kappa_x}} \quad (6.5)$$

donde se ha tomado la posición de equilibrio $x_0 = 0$. Para el valor de la constante de rigidez de la trampa utilizada en nuestros ensayos, $\kappa_x = 0.041 \text{ pN}\cdot\text{nm}^{-1}$, se tiene que $\sigma_x \approx 10 \text{ nm}$. Un análisis similar para el eje y nos da como resultado: $\sigma_y \approx 10.5 \text{ nm}$. Este valor corresponde a la condición en que la esfera se encuentra en el centro de la trampa, es decir, la fuerza aplicada es igual a cero. Para $F \neq 0$, el movimiento Browniano decrece debido a que las fuerzas externas se vuelven dominantes sobre las fuerzas térmicas, por lo que la sensibilidad espacial se incrementa.

2. El tiempo de adquisición de datos. La razón de señal a ruido aumenta al incrementar el número de muestras de acuerdo a la siguiente relación:

$$\frac{S}{N} = \sqrt{n} \frac{S}{\sigma} \quad (6.6)$$

donde n es el número de muestras; S/σ corresponde a la señal a ruido cuando se tiene una sola muestra. Para una tasa de adquisición de muestras constante ν , aumentar el número de muestras n por dato equivale a incrementar el tiempo de adquisición por dato (con la consecuente disminución del ancho de banda). Por ejemplo, la traza presentada en la Figura 3.8 se tomó con una tasa de adquisición de muestras $\nu = 65568 \text{ muestras/s}$, una muestra por dato, durante 0.5 s . La sensibilidad de nuestro dispositivo en este caso está dada por el valor de la desviación estándar de esta traza, la cual es: $\sigma_x = 10.8 \text{ nm}$. Dada la misma tasa de adquisición de muestras, considérese que ahora cada dato se calcula con el promedio de 100 muestras, es decir, se adquieren 6557 datos/s . De acuerdo a la ecuación 6.6, la señal a ruido aumentará por un factor $\sqrt{100}$, lo cual equivale a disminuir el valor de σ_x por un factor de 10 . El nuevo valor de la desviación estándar es $\sigma'_x = \sigma_x / 10 \approx 1.1 \text{ nm}$. Este valor define la nueva sensibilidad del dispositivo.

CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Incrementar la sensibilidad mediante el incremento del tiempo de adquisición de datos (reduciendo el ancho de banda) tiene como desventaja que los procesos que ocurren rápidamente no son detectados por el dispositivo. En el caso particular de las proteínas motoras, es posible incrementar el tiempo de adquisición de datos sin sacrificar la detección de los procesos que interesan ser estudiados. Lo anterior se logra disminuyendo la concentración de moléculas de ATP, las cuales son moléculas que la proteína hidroliza para realizar el trabajo mecánico, de manera que la reacción entre la proteína motora y la molécula de ATP ocurre a una frecuencia muy baja [11].

Estos valores demuestran que nuestro dispositivo tiene la sensibilidad necesaria para el tipo de procesos biológicos que se quieren estudiar. Para ensayos donde la sensibilidad es importante, es posible reducir aún más la amplitud del movimiento Browniano con una trampa más rígida, lo cual se logra incrementando la potencia del haz láser.

En resumen, las diversas mejoras para disminuir errores sistemáticos y aumentar la precisión pueden implementarse en el corto plazo. La sensibilidad de nuestro dispositivo es adecuada para el estudio de los procesos biológicos que ocurren a nivel de moléculas individuales. Es posible concluir entonces, que los objetivos de este proyecto se cumplieron satisfactoriamente. Los resultados obtenidos demuestran que la construcción, la caracterización y la calibración de la pinza óptica se realizaron con éxito. Además de que los resultados de cada uno de estos procedimientos concuerdan con los valores típicos de sistemas de pinzas ópticas similares, la prueba concreta de ello es haber reproducido valores reportados previamente en la literatura de las características poliméricas del ADN en ensayos de manipulación *in singulo*.

La geometría de manipulación mostrada en este trabajo ya da una idea de la gran cantidad de ensayos que se pueden realizar con las pinzas ópticas utilizando los métodos ya descritos. No obstante, hay una gran cantidad de geometrías de manipulación alternativas que no pudieron ser exploradas en este proyecto debido a la falta de tiempo. Entre las posi-

CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

bilidades que están listas para ser utilizadas se encuentran: la aplicación de desplazamientos con la trampa móvil y el atrapamiento con las dos trampas en forma simultánea, posibilidades que dan lugar a un número de esquemas de atrapamiento mucho mayor que permitirán estudiar otros componentes biológicos con funciones individuales más complejas y de alto interés en biología molecular. Además, implementar métodos complementarios de biofísica de moléculas individuales, tales como microscopía de fluorescencia, es una tarea adicional que puede conseguirse en el mediano-corto plazo con el dispositivo construido en este proyecto. La manipulación de macromoléculas individuales con pinzas ópticas es, hasta dónde sabemos, la primera vez que se implementa en México, lo cual constituye una herramienta de estudio sin precedentes en nuestro país.

CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Atados de ADN

A.1. Preparación de *buffers*

100 mL de *buffer* de fosfato de sodio a 100 mM(BF)

Materiales:

- 100 mL de agua miliQ.
- 14 g de fosfato de sodio dibásico anhidro Na_2HPO_4 (Sigma-Aldrich).
- 1mL ácido clorhídrico

Procedimiento:

1. En un vaso de precipitado disolver el Na_2HPO_4 en 80 mL de agua.
2. Agregar una gota de ácido clorhídrico, mezclar con un mezclador magnético y determinar el pH con un pH-metro. Repetir hasta ajustar el pH a 7.4
3. Completar a 100 mL con agua miliQ.
4. Filtrar con un filtro de $0.22 \mu\text{m}$ (Milipore) y almacenar en tubos Falcon de 50 mL.
5. Almacenar a 4°C .

APÉNDICE A. ATADOS DE ADN

100 mL de *buffer* de fosfato + 0.1 %tween 20 (BFT)

Materiales:

- 100 mL de *buffer* de fosfato
- 100 μ L de tween (Sigma-Aldrich)

Procedimiento:

1. En un vaso de precipitado disolver el tween en el *buffer* de fosfato
2. Pipetear suavemente para mezclar sin hacer espuma.
3. Almacenar en tubos Falcon de 50 mL.
4. Almacenar a 4°C.

100 mL de *buffer* de fosfato salino (BFS)

Materiales:

- 100 mL de *buffer* de fosfato
- 1.03 g de NaCl (0.138 M) (Sigma-Aldrich)

Procedimiento:

1. En un vaso de precipitado vertir 1.03 g de NaCl en el *buffer* de fosfato.
2. Disolver con un mezclador magnético.
3. Almacenar en tubos Falcon de 50mL.
4. Almacenar a 4°C.

50 mL de *Buffer* de Lavado con BSA a 5 mg/mL

Materiales:

- 37.5 mL de BFT
- 12.5 mL de BSA a 20 mg/mL.

Procedimiento:

1. En un tubo Falcon de 50 mL disolver el BFT con la solución concentrada de BSA (veáse preparación de soluciones concentradas)
2. Mezclar haciendo movimientos circulares suaves sin formar espuma.
3. Almacenar a 4°C.

A.2. Preparación de soluciones concentradas

30 mL de Solución concentrada BSA (20mg/mL)

Materiales:

- 0.6 g de BSA (Sigma Aldrich).
- 30 mL de *buffer* de fosfato.

Procedimiento:

1. En un tubo Falcon de 50mL vertir la BSA en el *buffer* de fosfato.
2. Mezclar haciendo movimientos circulares suaves, sin formar espuma, hasta disolver completamente la BSA.
3. Filtrar la solución con un filtro de 0.22 μm (Milipore)
4. Almacenar a 4°C.

Alícuotas de 10 μL de solución concentrada de antidigoxigenina

Materiales:

APÉNDICE A. ATADOS DE ADN

- 100 μL de antidigoxigenina (Serotec)

Procedimiento:

1. Hacer alícuotas de 10 μL en tubos Eppendorf de 150 μL
2. Almacenar a -20°C

100 μL de solución concentrada de esferas lavadas (730 μm de diámetro) a 81.5 pM.

Materiales:

- 100 μL de solución concentrada de esferas de 730 μm recubiertas de avidina (Spherotec).
- 300 μL de *buffer* de fosfato.

Procedimiento:

1. Vertir la solución concentrada de esferas en un tubo de 1.5 mL.
2. Centrifugar la solución de esferas durante 4 min a 9 g.
3. Retirar sobrenadante y agregar el mismo volumen de *buffer* de fosfato.
4. Agitar con el vórtex durante 10 s para resuspender.
5. Repetir el paso 1, 2 y 3 dos veces más.
6. Almacenar a 4°C

100 μL de solución concentrada de ADN a ~ 2.5 nM

Materiales:

- Muestra de ADN (cuantificada con un espectrofotómetro Nanodrop 1000) a una concentración de 103.3 ng/mL (\approx 257 nM)
- 99 μ L de *buffer* de fosfato.

Procedimientos:

1. En un tubo de Eppendorf de 150 μ L diluir 1 μ L de ADN directamente del tubo de PCR en 99 μ L de BF.
2. Pipetear suavemente para mezclar.
3. Almacenar a -20°C .

A.3. Limpieza de cubreobjetos

Limpieza de cubreobjetos con Plasmacleaner

Materiales:

- Rejilla de Porcelana
- 15 cubreobjetos
- Sistema de remoción de impurezas Plasmacleaner (Harrick Plasma, PDC-FMG Harrick PlasmaFlo)
- Contenedor de piezas limpias (bote de plástico con tapa)

Procedimiento

1. Colocar los cubreobjetos en la rejilla de porcelana.
2. Colocar la rejilla en la cámara de plasma.
3. Encender el Plasmacleaner durante 5 min.
4. Retirar de la cámara de plasma.
5. Colocar la rejilla con los cubreobjetos dentro del bote de plástico y cerrar con la tapa para almacenar.

A.4. Protocolo de preparación de la muestra (atados de ADN)

Materiales:

- Antidigoxigenina a 0.5 mg/mL. Se hace una dilución 1:10 (antidigoxigenina:BFS) de la solución concentrada de antidigoxigenina tomando una alícuota y agregando 90 μL de BFS.
- ADN a 250 pM. Se hace una dilución 1:10 (ADN:BF) en un tubo Eppendorf de 150 μL tomando 10 μL de la solución concentrada a 2.5 nM y agregando 90 μL de BF.
- Solución de esferas sonicadas a 1 pM. Se hace una dilución 1:81.5 (esferas:BF) en un tubo Eppendorf de 150 μL tomando 1 μL de la solución concentrada de esferas lavadas y disolver en 80.5 μL de BF. Se colocan en un frasco de vidrio con hielo y se introduce en el baño ultrasónico (*Branson, 2510*) durante 10 min.
- 1 mL de *buffer* de lavado con BSA a 5 mg/mL.
- Canal para contener la muestra. En un portaobjetos se forma un canal pegando dos segmentos de cinta y cubriendo con un cubreobjetos limpio. Las soluciones se fluyen sobre el cubreobjetos.

Procedimiento:

1. Fluir 15 μL de antidigoxigenina (0.5 mg/mL).
2. Incubar durante 10 min a temperatura ambiente.
3. Lavar con 150 μL de *buffer* de lavado (BSA a 5 mg/mL).
4. Incubar durante 2 min a temperatura ambiente.
5. Fluir 15 μL de ADN (250 pM).
6. Incubar durante 10 min a temperatura ambiente.
7. Lavar con 150 μL de *buffer* de lavado (BSA a 5 mg/mL).

APÉNDICE A. ATADOS DE ADN

8. Incubar durante 2 min a temperatura ambiente.
9. Fluir 15 μL de esferas de 730 μm (1 pM).
10. Sellar la muestra con barniz para uñas.

Bibliografía

- [1] **How it all began?**. Ashkin, A. *Nature Photonics*. 5: 316-317; 2011.
- [2] **Laser cooling and trapping of neutral atoms**. Phillips, W. *Rev. Mod. Phys.* 70: 721-741; 1998.
- [3] **Biological applications of optical forces**. Svoboda, K. and Block, S. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23:247-285; 1994.
- [4] **Kinesin hydrolyses one ATP per 8-nm step**. Schnitzer, M. and Block, S. *Nature*. 388: 386-390; 1997.
- [5] **Of torques, forces and protein machines**. Bustamante, C. *Protein Sci.* 13 (11): 3061-3065; 2004.
- [6] **Dynamic excitations in membranes induced by optical tweezers**. Bar-Ziv, R. *Biophysical Journal*. 75: 294-320; 1998.
- [7] **Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy**. Neuman, K. and Nagy, A. *Nature Methods*. 5: 491-505; 2008.
- [8] **In singulo Biochemistry: When Less is More**. Bustamante, C. *Annual Review of Biochemistry*. 77: 45-50; 2008.
- [9] **Optical traps for single molecule biophysics: a primer**. Perkins, T. *Laser & Photonics Reviews*. 3: 203-220; 2009.

BIBLIOGRAFÍA

- [10] **Optical trapping review.** Neuman, K. and Block, S. *Review of Scientific Instruments.* 75: 2787-2809; 2004.
- [11] **Direct observation of base-pair stepping by RNA polymerase.** Abbondanzieri, E.A., Greenleaf, W.J., Shaevitz, J.W., Landick, R., Block, S.M. *Nature.* 438: 460-465; 2005.
- [12] **Single molecule transcription elongation.** Galburt E.A, Grill S, and Bustamante, C. *Methods.* 48(4): 323-332; 2009.
- [13] **Following translation by single ribosomes one codon at a time.** Wen J, Lancaster L, Hodges C, Zeri A, Yoshimura S, Noller H, Bustamante C, Tinoco I. *Nature.* 452(7187): 598-603; 2008.
- [14] **Mechanism of force production by single kinesin motors.** Schnitzer, M.J., Visscher, K., Block, S.M. *Nature Cell Biology.* 2: 718-723; 2000.
- [15] **Mechanochemistry of a Viral DNA Packaging Motor.** Jin Y., Moffitt, J., Hetherington, C., Bustamante, C. Oster, G. *Journal of Molecular Biology.* (400):186-203, 2010.
- [16] **Backtracking determines the force sensitivity of RNAP II in a factor-dependent manner.** Galburt, E., Grill, S., Wiedmann, A., Lubkowska, L., Choy, J., Nogales, E., Kashlev, M., Bustamante, C. *Nature.* 446(7137): 820-823;2007.
- [17] **The folding cooperativity of a protein is controlled by its chain topology.** Shank, E., Cecconi, C., Dill, J., Marqusee, S., Bustamante, C. *Nature.* (465): 637-640; 2010.
- [18] **Conformational flexibility in the chromatin remodeler RSC observed by electron microscopy and the orthogonal tilt reconstruction method.** Leschziner A, Saha A, Wittmeyer J, Zhang Y, Bustamante C, Cairns B, Nogales E. *PNAS.* 104(12): 4913-4918; 2007.

- [19] **Real-time control of the energy landscape by force directs the folding of RNA molecules.** Li, P., Bustamante C., Tinoco, I. Jr. *PNAS*. 104(17): 7039-7044; 2007.
- [20] **Quantum Electronics.** Yariv, A. *John Wiley and Sons*. Tercera Edición; 1989.
- [21] **Solid-State Laser Engineering.** W. Koechner. *Springer, Berlin*. Sexta edición; 2006.
- [22] **Optics.** Hecht, E. **Addison Wesley**. Segunda Edición; 1987.
- [23] **VideoMicroscopy** Inoué, S. *Plenum press, New York*. Cuarta Edición; 1989.
- [24] **PID control.** Haugen, F. *Tapir Academic Press*; 2004.
- [25] **Electronics theory and applications.** Kakani, S.L., Bhandari, K.C. *New age international*; 2005.
- [26] **Precision steering of an optical trap by electro-optic deflection.** Valentine, M., Guydosh, N. Gutiérrez-Medina, B., Fehr, A., Andreasson, J., Block, S.M. *Optical letters*. 33(6): 599-601; 2008.
- [27] **Single molecule studies of kinesin family motor proteins. Ph.D. Thesis.** Fordyce, P. *Stanford University*; 2006.
- [28] **Classical Electrodynamics.** Jackson, J.D., *John Wiley and Sons*. Tercera Edición, 1998.
- [29] **Theory of trapping forces in optical tweezers.** Mazolli, A., Maia Neto, P.A., Nussenzveig, H. M. *Proc. R. Soc. Lond. A*. 459(2040): 3021- 3041, 2003.
- [30] **An automated two- dimensional optical force clamp for single molecule studies.** Lang, M. J., Asbury, C. L., Shaevitz, J. W., Block, S. M. *Biophysical Journal*. (83): 491-501; 2002.
- [31] **Introduction to Electromagnetic Compatibility.** Clayton, R. P. *New Jersery: John Wiley and Sons*. Segunda Edición, 2006.

BIBLIOGRAFÍA

- [32] **A practical introduction to electronic circuits.** Jones, M. H. *Cambridge University Press*. Segunda edición; 1987.
- [33] **Electronic Circuits: Fundamentals and Applications.** Tooley, M. *Newnes*. Segunda Edición; 2002.
- [34] **Mechanics of Motor Proteins and the cytoskeleton.** Howard, H. *Sinauer*; 2001.
- [35] **Structure of Deoxyribose Nucleic Acid.** Watson, J., Crick, F. *Nature*. 171: 737-738; 1953.
- [36] **Molecular Biology of the Cell.** Alberts B., Johnson A., Lewis J., et al. *New York: Garland Science*. Cuarta Edición; 2002.
- [37] **BLR-1 and BLR-2, key regulatory elements of photocoincidence and mycelial growth in *Trichoderma atroviride*.** Casas-Flores, S., Rios-Momberg, M., Bibbins, M., Ponce-Noyola, P., Herrera-Estrella, A. *Microbiology*. 150(11): 3561-3569; 2004.
- [38] **The unusual origin of the polymerase chain reaction.** Mullis, K. *Scientific American*. 262(4):56-65; 1990.
- [39] **The biotin-streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures.** Holmberg, A., Blomstergren, A., Nord, O., Lukacs, M., Lundeberg, J., Uhlén, M. *Electroforesis*. 26: 501-510; 2005.
- [40] **PCR Protocols. Methods in Molecular Biology.** Bartlet, J.M., Stirling, D. *Humana Press*. Segunda Edición; 2003.
- [41] **The Photoproteins, in Photoproteins in Bioanalysis.** (eds S. Daunert and S. K. Deo), Shimomura, O. *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, FRG*. página 238; 2006.
- [42] **The Nucleic Acid Protocols Handbook.** Rapley, R. *Humana Press*. Capítulo 21, Generation of labeled probes by Polimerase Chain Reaction; 2000.

- [43] **Técnicas de bioquímica y biología molecular.** Freifelder, D. *Reverté*; 2008.
- [44] **Genomes 3.** Brown, T. *New York: Garland Science*; 2006.
- [45] **Electrophoresis in Practice: A Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations.** Westermeier, R. *Wiley*; 2006.
- [46] **Methods in cell matrix adhesion.** Adams, J., *Academic Press*. Primera edición; 2002.
- [47] **Optical trapping for undergraduates.** Appleyard, D., Vandermeulen, K., Lee, H., Lang, M. *Am. J. Phys.* 75(1): 5-14; 2007.
- [48] **Overstretching B-DNA: the elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules.** Smith, S. Cui, Y., Bustamante C. *Science*. 271(5250): 795-799; 1996.
- [49] **Introduction to biopolymer physics.** Van der Maarel, J. *World Scientific*; 2008.
- [50] **Stretching DNA.** Marko, J.F., Siggia, E.D. *Macromolecules*. 28(26): 8759-8770; 1995.
- [51] **Brittle failure of dry spaghetti.** Guinea, G.V., Rojo, F.J., Elices, M. *Engineering Failure Analysis*. 11(5): 705-714; 2004.
- [52] **Biological Physics.** Mielczarek, E. V., Greenbaum, E. S. **American Institute of Physics**; 1993.
- [53] **DNA engineering and its application to nanotechnology.** Seeman, N. C. *Nanotechnology*. 17: 437- 443; 1999.
- [54] **Stretching DNA with optical tweezers.** Wang, M.D., Yin, H., Landick, R., Gelles, J., Block, S.M. *Biophysical Journal*. 72: 1335-1346; 1997.

BIBLIOGRAFÍA

- [55] **Folding-Unfolding Transitions in Single Titin Molecules Characterized with Laser Tweezers.** Kellermayer, M., Smith, S., Granzier, H., Bustamante, C. *Science* 276(5315): 1112-1116; 1997.
- [56] **Single polymer chain elongation by atomic force microscopy.** Bemis, J. Akhremitchev, B. Walker, G. *Langmuir*. 15: 2799-2805; 1999.
- [57] **The mechanical fingerprint of a parallel polyprotein dimer.** Sarkar, A. Caamano, S. Fernandez, J. *Biophysical Journal: Biophysical Letters*. L36-L38; 2007.
- [58] **Oxidants and Antioxidant defense systems: 2 (The handbook of the environmental chemistry/ reactions and processes).** Grune, T. *Springer*. Primera Edición; 2005.
- [59] **Noise and fluctuations.** MacDonald, D.K.C. *Dover*. Primera edición; 2006.
- [60] **Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy.** Nagy, A. Neuman, K. *Nature Methods*. 5: 491-505; 2008.