



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS FÍSICAS

CONSTRUCCIÓN Y
CARACTERIZACIÓN DE UNA PINZA
ÓPTICA PARA EL ESTUDIO DE
MOLECULAS INDIVIDUALES.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS (FÍSICA)

P R E S E N T A:

Carmen Noemí Hernández Candia

DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Braulio Gutiérrez Medina

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL:
Dra. Karen Patricia Volke Sepúlveda
Dr. Iván Santamaría Holek



posgrado en ciencias físicas
u n a m

MÉXICO, D.F. 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Resumen

Se construyó una pinza óptica infrarroja para el estudio de moléculas individuales. Una vez construida y calibrada la pinza, se hizo un ensayo molecular para medir las propiedades elásticas de una molécula de ADN de doble cadena. Para una concentración de iones de $[Na^{+}] = 100$ mM medimos una longitud de contorno de $L_c = (1103 \pm 21)$ nm y una longitud de persistencia de $L_p = (49 \pm 10)$ nm. Los valores obtenidos son consistentes con los valores reportados en la literatura, esto demuestra que nuestro instrumento es totalmente funcional. La motivación para construir este instrumento fue contar con una herramienta que nos permitirá estudiar una amplia variedad de sistemas biológicos, incluyendo motores molecular, enzimas, polímeros biológicos.

Abstract

We have built an optical tweezers apparatus for single-molecule studies. After the tweezers were built and calibrated, we measured the elastic properties of a double-stranded DNA molecule. For an ion strength $[Na^{+}] = 100$ mM, we measured a contour length $L_c = (1103 \pm 21)$ nm and a persistence length $L_p = (49 \pm 10)$ nm. These values are consistent with previous reports, this demonstrates that our instrument is fully functional. Our main interest in building this instrument is to have a tool that will allow us to study a wide variety of biological systems, including molecular motor, enzymes, biological polymers.

Índice general

1. Introducción	1
1.1. El descubrimiento de Ashkin	1
1.2. Las Pinzas Ópticas en la Biología	3
1.3. Motivación	4
1.4. Objetivos	5
2. Principios físicos de una pinza óptica	7
2.1. Régimen de rayos	9
2.2. Régimen de Rayleigh	12
2.3. Modo Gaussiano	15
2.4. Rigidez de la trampa	18
2.4.1. Método de Stokes	20
2.4.2. Teorema de Equipartición de la Energía	21
2.4.3. Espectro de Potencias	21
3. Construcción de una pinza óptica	23

3.1.	El objetivo de microscopio	26
3.2.	El condensador	33
3.3.	Sistema de iluminación de Köhler	34
3.4.	Control dinámico de la trampa	35
3.4.1.	Modulador Acusto Óptico	37
3.5.	Detección de la posición de una esfera atrapada	40
3.6.	Fuentes de ruido	42
3.6.1.	Estabilidad de apunte	45
3.6.2.	Estabilidad en la potencia	45
3.6.3.	Deriva Mecánica	47
3.7.	Calibración de la trampa: conversión de volts a nm	50
3.8.	Calibración de la rigidez de la trampa	51
4.	Propiedades elásticas del ADN	59
4.1.	El ADN en la biología	59
4.2.	El ADN como polímero	63
5.	Medición de la L_p y L_c del ADN	69
5.1.	Implementación del ensayo molecular	70
5.2.	Obtención de Datos	73
5.3.	Análisis de los Datos	79
6.	Discusión y Conclusiones	83

<i>ÍNDICE GENERAL</i>	V
Apéndice A: Protocolos	87
6.1. Obtención del ADN	87
6.2. Protocolo para limpiar los vidrio	89
6.3. Protocolo de incubación	89
6.3.1. Buffer de lavado (1 ml)	90
6.3.2. Buffer de fosfato (100 mM, 100 ml)	90
6.3.3. Buffer de fosfatos salino	90
Apéndice B: Automatización de la pinza: Lista de Vi	91

Índice de figuras

2.1. Posición de equilibrio de una esfera en solución atrapada por una pinza óptica	8
2.2. Fuerzas de gradiente para el régimen de rayos	10
2.3. Parámetros de un haz Gaussiano	16
2.4. Método de la Navaja	19
3.1. Dispositivo experimental	24
3.2. Diferentes configuraciones para una muestra	26
3.3. Planos focales de una lente positiva	27
3.4. Límite impuesto por la difracción.	29
3.5. Apertura Numérica	30
3.6. Aberraciones	31
3.7. Magnificación de un objetivo de microscopio corregido a infinito.	32
3.8. Condensador	33
3.9. Iluminación de Köhler	34
3.10. Formación de imágenes	35

3.11. Traslación de la trampa en el plano de la muestra	36
3.12. Modulador Acusto óptico	38
3.13. Rejilla de Difracción	39
3.14. Método de detección de un foto-detector de cuadrante	43
3.15. Escalas a las que ocurren algunos procesos biológicos	44
3.16. Medición de la estabilidad de apunte del láser.	46
3.17. Estabilidad en la potencia del láser	48
3.18. Deriva mecánica de la platina.	49
3.19. Calibración del FDP.	52
3.20. Determinación de la posición de la superficie.	54
3.21. Desplazamiento del foco	54
3.22. Medición de la rigidez de la trampa	56
3.23. Región lineal de la trampa	57
4.1. Estructura del ADN	60
4.2. La transcripción y algunos mecanismos para su regulación	62
4.3. Longitud de persistencia	65
4.4. Valores reportados para la Longitud de Persistencia	68
5.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa	71
5.2. Gel de agarosa para verificar el tamaño del producto de la PCR	72
5.3. Ensayo molecular	74

5.4. Alineación de la esfera y el ADN al centro de la trampa	75
5.5. Ubicación de la superficie usando una esfera con ADN	77
5.6. Señal de FDP en función de la posición de la platina	78
5.7. Esquema geométrico del ensayo molecular.	79
5.8. Curva de Fuerza Extensión del ADN	81
5.9. Valores medidos de L_c y L_p para 63 moléculas de ADN.	82

Lista de Símbolos

(x_0, y_0, z_0)	Posición de equilibrio de una esfera atrapada.
(x, y, z)	Desplazamiento de una esfera atrapada respecto a su posición de equilibrio.
(x_p, y_p, z_p)	Posición de la platina piezoeléctrica.
(V_x, V_y, V_z)	Señal en voltaje del foto-detector de posición.
V	Señal en voltaje del foto-detector.
(X, Y, Z)	Coordenadas del perfil de luz Gaussiano del láser.
$(k_{trampa,x}, k_{trampa,y}, k_{trampa,z})$	La rigidez de la trampa en cada una de las direcciones del haz (X, Y, Z) .
(x_{ADN}, y_{ADN})	Distancia entre los extremos del ADN.
(x_L, y_L, z_L)	Dirección de apunte del láser.
n_m	Índice de refracción del medio.
n_e	Índice de refracción de la esfera.
(F_{cx}, F_{cy}, F_{cz})	Factores de conversión de Volts a nm para cada una de las coordenadas (x, y, z) .
r	Es el radio de la esfera.

Agradecimientos

A mis padres por su apoyo,

A Eduardo por su paciencia,

A Sara, Ana Iris y Braulio por hacer mi estancia en San Luis mas agradable y divertida,

Al jefe por su amable conducción a lo largo de este proceso,

A Mayte por instruirme en las artes biológicas,

A Edith por sus sabios consejos moleculares,

Al Dr. Sergio Casas por abrirnos las puertas de su laboratorio,

A todas las personas que leyeron esta tesis por dedicar parte de su tiempo a hacer comentarios y críticas que mejoraron este trabajo.

Capítulo 1

Introducción

1.1. El descubrimiento de Ashkin

En su famosa plática de 1959 “There’s plenty of room at the bottom” Richard Feynman hizo notar que las leyes de la física no impiden la manipulación de objetos a escalas nanoscópicas, incluso átomo por átomo, la única limitante es la tecnología necesaria para lograrlo [1]. Feynman sin saberlo no solo dio un vistazo al futuro, también viajó hacia el interior de las células de todo ser vivo. Dentro de las células, las nanomáquinas que se imaginaba Feynman existen y son proteínas de entre 5 y 10 nm capaces de convertir la energía química en trabajo, fuerza y/o torque.

Solo 10 años después, Arthur Ashkin encontró parte de la tecnología faltante a la cual se refería Feynmann, y que en 1986 daría lugar a lo que hoy conocemos como *pinzas ópticas*.

Una pinza óptica consiste en un láser enfocado (por medio de una lente) que atrapa en 3 dimensiones una partícula cuyo diámetro puede ir desde unas cuantas micras hasta decenas de nanómetros. La partícula queda atrapada porque experimenta una fuerza restitutiva que apunta en la dirección de enfocamiento de la luz, similar a la fuerza que experimenta una masa unida a un resorte, y al igual que en un resorte la fuerza que ejerce la luz sobre una esfera es proporcional al desplazamiento de la esfera (x, y, z) respecto su posición de equilibrio (x_0, y_0, z_0) . La fuerza restitutiva en una pinza óptica surge de la conservación del momento lineal total, como se

explicará más adelante. Esta relación lineal entre fuerzas y desplazamientos permite usar las pinzas ópticas como un transductor de fuerza del orden de pN. Además, las pinzas ópticas permiten medir desplazamientos de nanómetros y manipular objetos micrométricos.

La historia de las pinzas ópticas comenzó en 1970 cuando Ashkin se propuso medir la presión de radiación que la luz de un láser produce sobre una partícula microscópica. Lo que encontró fue que las partículas no solo eran empujadas por la luz, también eran guiadas manteniéndose siempre sobre el eje de propagación del haz. Usando dos haces contrapropagantes, Ashkin logró confinar una partícula, anulando entre sí la fuerza que cada haz ejercía en la dirección de propagación de la luz [2].

Un año mas tarde, Ashkin hizo levitar partículas dieléctricas en el vacío, colocando un haz láser propagándose en sentido inverso a la fuerza de la gravedad. La partícula quedaba confinada cuando la fuerza óptica y la de gravedad se igualaban [3]. En 1986 Ashkin publicó el primer atrapamiento de partículas dieléctricas en 3D utilizando solamente un haz Gaussiano fuertemente enfocado; la primer pinza óptica [4].

El impacto del descubrimiento de Ashkin en la ciencia moderna queda de manifiesto con dos ejemplos concretos: 1) El principio de confinamiento por medio de la luz también es aplicable en átomos y moléculas. Usando haces sintonizados por debajo de la frecuencia de resonancia se puede bajar la temperatura de los átomos hasta cientos de microkelvin. Estas técnicas de súper enfriamiento ayudaron a obtener el primer condensado de Bose-Einstein, motivo por el cual Carl Wieman, Eric Cornell y Wolfgang Ketterle recibieron el premio Nobel de física en 1997 [5]. 2) En la biología, las pinzas ópticas de luz Infra-Roja (IR) permiten manipular células, organelos celulares y virus SIN dañarlos. También se pueden manipular macromoléculas y proteínas, con la ventaja de poder estudiarlas *in singulo*, es decir, estudiar la dinámica en tiempo real de una sola macro molécula o proteína a la vez [6].

1.2. Las Pinzas Ópticas en la Biología

Las fuerzas que una pinza óptica puede ejercer son del orden de decenas de pN. En el mundo macroscópico estas fuerzas son despreciables, no así para una macromolécula, organelo o célula. Estas fuerzas son suficientes para detener el avance de un espermatozoide, el transporte de vesículas dentro de una célula o para estirar macromoléculas como el ADN (Ácido Desoxirribonucleico) o el ARN (Ácido Ribonucleico) [7].

Por otra parte, el agua tiene una ventana de no absorción en el IR, y dado que los seres vivos están compuestos en un $\approx 70\%$ de agua, se puede utilizar un láser de esta longitud de onda para micro-manipular células sin dañarlas [8]. Aplicando esta técnica a estudios *in vivo* se ha logrado estirar la membrana celular de una planta [9], se han manipulado cromosomas [10] y reubicado organelos dentro de las células [11], juntando las pinzas ópticas con un haz pulsado ultra violeta (UV) se han realizado microcirugías para fusionar dos células [12].

Las pinzas ópticas también pueden ser utilizadas *in vitro*. Usando a las pinzas como transductores de fuerza se ha podido medir la fuerza producida por algunos motores moleculares, como la kinesina que transporta vesículas a lo largo del citoesqueleto [13]. También se ha logrado una caracterización mecánica del ADN de doble cadena [14] y de cadena sencilla [15].

El aporte más importante de las pinzas ópticas a la biología molecular es en el **estudio de moléculas individuales**. La importancia de los estudios individuales es que arrojan información que sería imposible de obtener usando técnicas que consideran muchas moléculas al mismo tiempo (ensambles). Por ejemplo: Si se quiere estudiar la dinámica de una molécula utilizando un ensamble primero es necesario sincronizarlo, lo cual es una tarea difícil, pero aun cuando esto se logre no es posible medir su dinámica, ya que las moléculas se encuentran inmersas en un baño térmico el cual hará que cada molécula del ensamble siga una trayectoria diferente, haciendo que el ensamble pierda su coherencia inicial.

Otra desventaja que presenta el estudio de un ensamble es la pérdida de información, ya sea de trayectorias poco frecuentes, o de los estados transitorios, o bien la incorrecta interpretación de una medición promedio en el caso de una población multimodal, es decir, si una molécula es capaz de poblar dos estados diferentes y nosotros solo tomamos el promedio del ensamble la información que obtendremos

es que la molécula se encuentra solo en un estado cuyo valor es el promedio de los estados.

La solución a estos problemas es medir la dinámica de las moléculas *in singulo*. Actualmente existen dos metodologías a seguir:

1. Métodos de manipulación, donde la molécula de interés se une a una sonda y es manipulada por un campo externo. Las pinzas ópticas son un ejemplo de este caso. También existen ensayos donde se usan campos magnético o el cantilever de un microscopio de fuerza atómica [16] [18].
2. Métodos de detección, donde la molécula de interés es marcada con una o varias etiquetas fluorescentes, por ejemplo en el método de Transferencia de energía por resonancia de Förster (FRET) [17].

Gracias a estudios *in singulo* que usan pinzas ópticas, podemos medir el paisaje energético sobre el cual una molécula de ARN se pliega [19], y hoy sabemos que el ARN es más estable por regiones, a diferencia de las proteínas que son globalmente estables.

A nivel mundial el interés por hacer estudios de moléculas individuales ha crecido considerablemente. De la fundación de este campo, a principios de los 90's, al 2007 ya había alrededor de 1700 artículos relacionados en la Web of Science [6]. En México, el laboratorio del Dr. Braulio Gutiérrez es el primer laboratorio para el estudio de moléculas individuales con pinzas ópticas.

1.3. Motivación

Este trabajo surgió por la necesidad de tener un sistema de pinzas ópticas para estudiar, entre otros fenómenos biológicos, la cooperatividad de la cinesina monomérica y los cambios conformacionales de las proteínas receptoras de luz en hongos.

1.4. Objetivos

1. Construir y caracterizar la primer pinza óptica para el estudio de macro moléculas individuales en México.
2. Reproducir los resultados ya publicados de la manipulación de una molécula de ADN. Esto nos permitirá asegurarnos que la caracterización de la trampa es correcta.

En la primera parte de esta tesis se da una descripción teórica del principio por el cual funciona una pinza óptica y los métodos para calibrarla, así como los detalles técnicos para su construcción y los resultados que se obtuvieron de la calibración experimental.

En la segunda parte se presentan mediciones de las propiedades elásticas de una molécula de ADN de doble cadena y de tamaño conocido, para comparar los resultados obtenidos con los ya publicados en la literatura y verificar que las mediciones que hacemos con la pinza óptica son correctas.

Capítulo 2

Principios físicos de una pinza óptica

En 1873 James Clerk Maxwell mostró teóricamente que la luz era capaz de ejercer fuerza sobre un objeto a través de la presión de radiación. Sin embargo la medición experimental de esta fuerza se logró casi un siglo después.

El problema técnico que impedía medir el efecto de la presión de radiación es que para escalas macroscópicas la presión de radiación ejerce una fuerza muy pequeña en comparación con la que ejerce, por ejemplo, la gravedad. Sin embargo estas fuerzas debidas a la luz se pueden apreciar en la escala correcta, por ejemplo, un láser de argón débilmente enfocado y con una potencia de 1 W ejerce sobre una esfera de $0.5 \mu\text{m}$ de radio y con una densidad de 1 gm/cm^3 una fuerza 5 órdenes de magnitud mayor a la fuerza que la gravedad ejerce sobre ella [2].

Que la luz pueda ejercer fuerza se debe a que porta momento lineal, y que al interaccionar con la materia, la luz puede ser absorbida, reflejada o transmitida cambiando su momento. Puesto que el momento total debe conservarse, el material recula en la dirección contraria al cambio de momento de la luz.

La fuerza ejercida por la presión de radiación fue lo que Ashkin observó en 1970, al ver que las esferas eran empujadas en la dirección de propagación del haz, pero también observó que hay fuerzas ópticas que se asocian al gradiente de intensidad del haz. A la primera se le llama **fuerza de esparcimiento** y a la segunda **fuerza de gradiente**.

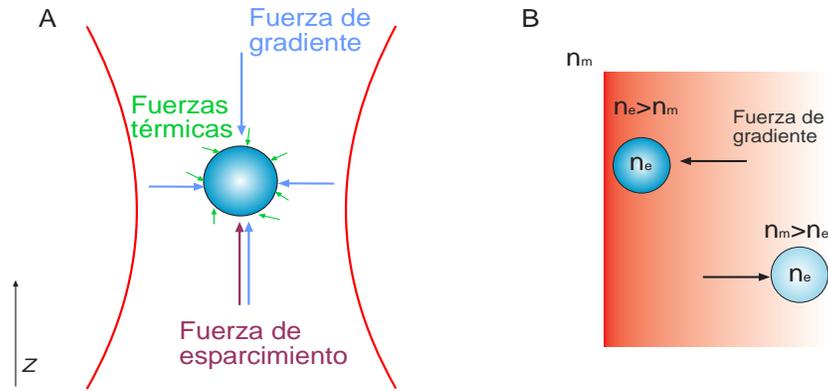


Figura 2.1: Posición de equilibrio de una esfera en solución atrapada por una pinza óptica A) Vemos los tres tipos de fuerzas que deben de ser compensadas para que la esfera permanezca en su posición de equilibrio cerca del foco. B) Diferentes posiciones de equilibrio dependiendo del índice de refracción de la esfera y del medio en el que está inmersa.

Para el caso de una esfera atrapada por una pinza óptica e inmersa en un fluido (para estudios biológicos siempre tendremos esta situación), además de la fuerza de gradiente y la fuerza de esparcimiento, la esfera siente una fuerza estocástica debido al golpe de las moléculas que conforman el medio en el que esta inmersa, produciendo el movimiento Browniano. Para tener una trampa estable en 3D utilizando solo la fuerza óptica de un haz enfocado, es necesario que la fuerza de gradiente compense a la fuerza de esparcimiento que empujan a la partícula hacia adelante, y que la difusión debida al movimiento Browniano pueda reducirse. La compensación de las fuerzas a lo largo de la dirección de propagación del haz Z se da pasando el foco (Figura 2.1A).

La ubicación de la partícula dependerá del índice de refracción de la esfera y del fluido. Si el índice de refracción de la partícula es mayor que el del fluido, entonces la partícula va a ser atraída a los máximos de intensidad, y por el contrario, si la partícula tiene un índice de refracción menor que el del fluido, entonces la partícula va a ser repelida de los máximos y se colocara en los mínimos de intensidad (Figura 2.1B).

Aunque en general una pinza óptica puede ser usada para atrapar objetos con formas diversas, en este trabajo solo se trata el caso de partículas esféricas.

La descripción teórica de estas fuerzas depende del tamaño de la partícula esférica con radio r en relación con la longitud de onda de la luz incidente λ . Se hace distinción entre tres regímenes: 1) El régimen de Rayos ($\lambda \ll r$), en el que se utiliza óptica geométrica, considerando que la luz del láser está formada por un conjunto de rayos; 2) El régimen de Rayleigh ($\lambda \gg r$), en el que la partícula es tratada como un dipolo eléctrico que interactúa con el campo eléctrico de la luz; 3) El régimen Lorenz-Mie ($\lambda \sim r$); el cálculo de la fuerza óptica en este régimen resulta complicado y no se tratará en este trabajo.

2.1. Régimen de rayos

Cuando $r \geq 5\lambda$ se usa la óptica geométrica para explicar el origen de las fuerzas en una pinza óptica [21]. En la óptica geométrica el haz es un conjunto de rayos, y se puede relacionar la intensidad del rayo con el número de fotones por unidad de tiempo que viajan en la dirección de cada rayo. Cuando la luz es absorbida transfiere todo su momento a la esfera, empujándola en la dirección de propagación del haz. Si cada fotón absorbido porta un momento igual a h/λ entonces la fuerza que siente la esfera es igual a [22]

$$\vec{F} = N \frac{h}{\lambda} \hat{S} = \frac{Nh\nu}{\nu\lambda} \hat{S} = \frac{P}{v_m} \hat{S} = \frac{n_m}{c} P \hat{S} \quad (2.1)$$

donde N es el número de fotones por segundo que son absorbidos, P es la potencia del haz y esta dada por $P = NE$ (siendo E la energía de cada fotón), v_m es la velocidad de la luz en el fluido que esta inmersa la esfera, n_e es el índice de refracción del fluido en el que esta la esfera, ν es la frecuencia de la luz y \hat{S} es la dirección del vector de Poynting. Esta fuerza que apunta en la dirección de propagación del haz es la fuerza de esparramiento.

Por otra parte, la fuerza de gradiente es debida al cambio de dirección de la luz al atravesar la esfera. En general las esferas que se utilizan son transparentes, de modo que la probabilidad de que un fotón sea transmitido es mucho mayor a la probabilidad de ser reflejado, y podemos trazar el cambio de dirección de un rayo al cambiar del fluido a la esfera. A continuación se da una descripción cualitativa de la fuerza de gradiente por medio del trazado de rayos para el caso en el que el índice de refracción de la esfera n_e es mayor al índice de refracción del fluido en el que esta la esfera n_m . Una descripción cuantitativa se puede consultar en la Referencia [23].

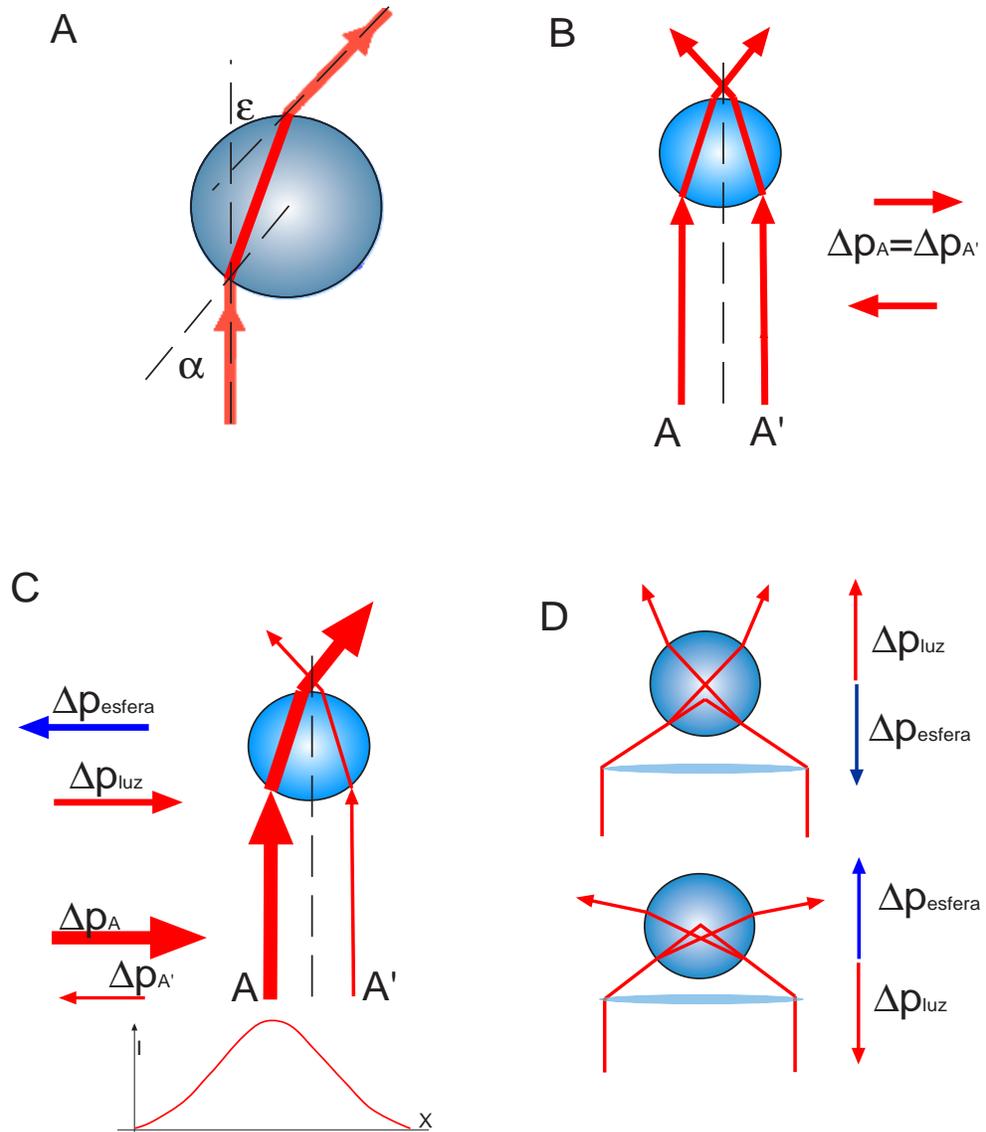


Figura 2.2: Fuerzas de gradiente para el régimen de rayos Por medio del trazado de rayos vemos como el cambio en la dirección de propagación de la luz produce un cambio de momento que la esfera compensa desplazándose siempre en la dirección del foco para el caso en el que $n_e > n_m$. A) Si un rayo incide sobre la esfera formando un ángulo α al salir de la esfera habrá cambiado de dirección, formando un ángulo ϵ entre la dirección original del haz y la dirección con la que sale de la esfera. Este cambio en la dirección implica un cambio de momento de la luz. B) Si dos rayos de igual intensidad inciden simétricamente sobre una esfera no habrá cambio de momento total de la luz. C) Si dos rayos inciden simétricamente, pero no tienen la misma intensidad entonces la esfera sentirá una fuerza de restitución que centra la esfera respecto al rayo mas intenso. D) Si el haz se enfoca entonces también habrá una fuerza de restitución en la dirección axial, que llevara el centro de la esfera al punto de enfocamiento del haz.

Un rayo que es transmitido cambia su dirección siguiendo la ley de Snell, este rayo sale de la esfera con una dirección diferente a la inicial. Este cambio en la dirección de propagación del rayo se traduce en un cambio de momento de la luz, que la esfera compensa adquiriendo un momento en la dirección contraria, de forma tal que el momento total se conserve (Figura 2.2A).

La fuerza que sentirá la esfera dependerá del número de fotones por unidad de tiempo que transfieren momento a la esfera. Para el caso de dos rayos paralelos de igual intensidad que inciden sobre la esfera con el mismo ángulo de entrada el momento total se conserva y no hay transferencia de momento a la esfera (Figura 2.2B). Esta situación cambia si los rayos tienen una intensidad diferente. En este caso el rayo más intenso transfiere más momento por unidad de tiempo a la esfera, haciendo que la esfera sienta una fuerza neta que la centra respecto al rayo más intenso, podemos generalizar el caso de dos rayos a lo que ocurre con un haz. Una haz de luz está compuesto por un conjunto de rayos, si los rayos que componen al haz tienen diferentes intensidades entonces la esfera sentirá una fuerza de restitución en el plano transversal del haz que centrará a la esfera respecto al rayo más intenso. Esta distribución en la intensidad de los rayos está presente en un haz láser con un perfil Gaussiano, que es la fuente de luz que por lo general se usa para construir una pinza óptica (Figura 2.2C), y la fuerza de restitución siempre apunta al centro de la distribución.

Para tener una pinza óptica es necesario atrapar tanto en el plano transversal como en la dirección axial. Esto último se logra enfocando el láser; para un haz enfocado la posición de equilibrio de una esfera z_0 en la dirección axial se encuentra aproximadamente en el foco.

Usando óptica geométrica vemos que si el centro de la esfera coincide con el foco del haz, entonces todos los rayos pasan por el centro de la esfera, de modo que el ángulo formado entre cualquier rayo y la normal a la superficie es cero. En este caso la luz no cambia de dirección y no hay transferencia de momento a la esfera, de modo que no experimenta ninguna fuerza y permanece en esa posición z_0 . Ahora bien, si el foco se encuentra por debajo o por arriba del centro de la esfera, la fuerza (producto de la conservación del momento) apuntará en la dirección del foco ejerciendo una fuerza de restitución en la dirección axial, que vuelve a colocar el centro de la esfera en el foco del haz (Figura 2.2D).

Para el caso presentado aquí donde $n_e > n_m$ la combinación del gradiente

transversal de intensidad del haz sumado al gradiente axial que se logra enfocándolo hacen que la esfera experimente una fuerza de restitución en la dirección de máxima intensidad (tanto radial como axial).

2.2. Régimen de Rayleigh

Como ya se ha mencionado, para el caso de esferas dieléctricas donde $r \ll \lambda$ podemos modelar las esferas como dipolos eléctricos, ya que una partícula dieléctrica al estar sometida a un campo eléctrico externo se polariza. El momento dipolar inducido \vec{p} en un medio isotrópico, como la esfera, se relaciona linealmente con el campo externo aplicado \vec{E}

$$\vec{p} = \alpha \vec{E} \quad (2.2)$$

donde α es la polarizabilidad del material. La explicación física del funcionamiento de una pinza óptica en este régimen se basa en la interacción de este dipolo inducido \vec{p} con el campo eléctrico de la luz.

En el régimen de Rayleigh la fuerza de esparcimiento se asocia con la absorción de la luz y con la potencia radiada por un dipolo inmerso en un campo electromagnético. Ambas contribuciones apuntan en la dirección del vector de Poynting empujando a la esfera en la dirección del haz.

En general, en una pinza óptica se trabaja con esferas prácticamente transparentes, por lo que la contribución por absorción resulta mucho menor a la contribución por radiación del dipolo y por lo tanto la consideraremos despreciable. Un tratamiento que incluye la contribución por absorción se puede consultar en la Referencia [23].

La fuerza de esparcimiento es proporcional a la potencia P radiada por el dipolo y apunta en la dirección del vector de Poynting \vec{S}

$$\vec{F}_{\text{esparcimiento}} = \frac{n_m P}{c} \hat{S}. \quad (2.3)$$

La potencia promediada en el tiempo radiada por el dipolo inducido en la esfera debido a la presencia del campo electromagnético de la luz esta dada por [23]

$$P = \frac{8\pi^3}{3\epsilon_0^2 \lambda^4} \alpha^2(\omega) \|S\| \quad (2.4)$$

donde ϵ_0 es la permitividad del vacío en el ¹, $\|S\|$ es la magnitud del vector de Poynting y α la polarizabilidad de la esfera (mostrada mas adelante en la Ecuación 2.11 ². Tomando el promedio temporal de la potencia y usando que $\langle \|S\| \rangle = I$, siendo I la intensidad ³ tenemos que:

$$\langle \vec{F}_{\text{esparcimiento}} \rangle = \frac{n_m}{c} \frac{8\pi^3}{3\lambda^4 \epsilon_0^2} \alpha^2 I \hat{S}. \quad (2.5)$$

Esta fuerza *proporcional a la intensidad* es la fuerza de esparcimiento [4].

La fuerza de gradiente aparece debido a la interacción del campo eléctrico con el dipolo inducido en la esfera (Ecuación 2.2). Este dipolo interacciona a su vez con el campo externo, produciendo una fuerza sobre la partícula dieléctrica igual a menos el gradiente de la energía de interacción [20]:

$$\vec{F} = -\nabla \left(-\vec{p} \cdot \vec{E} \right) \quad (2.6)$$

usando la relación entre el dipolo y el campo de la Ecuación 2.2 tenemos

$$\begin{aligned} \vec{F} &= \nabla \left(\alpha \vec{E} \cdot \vec{E} \right) \\ &= \alpha \nabla \left(\vec{E} \cdot \vec{E} \right) \\ &= \alpha \nabla E^2. \end{aligned} \quad (2.7)$$

Esta sería la fuerza instantánea que siente la partícula dieléctrica, pero la fuerza que se mide en una pinza óptica es el promedio temporal de esta fuerza, ya que el campo eléctrico externo es el de la luz, el cual oscila a $10^{14} - 10^{15}$ Hz. Al tomar el promedio temporal del campo eléctrico ⁴ en la Ecuación 2.7 tenemos que:

$$\langle \vec{F} \rangle = \frac{\alpha}{2} \nabla E_0^2 \quad (2.8)$$

Por otra parte, la relación entre el campo eléctrico y la intensidad de la luz está dada por

$$I = \frac{\epsilon_0 c}{2} \|E_0\|^2 \quad (2.9)$$

¹En el presente trabajo se usará siempre el Sistema Internacional de unidades

²Esta es la potencia radiada por un dipolo en el vacío, de modo que tenemos que tomar la Ecuación 2.11 para una esfera en el vacío, lo único que se modifica es que ϵ_m es ahora ϵ_0 .

³Actualmente la tendencia es llamar al término I irradiancia [34], pero en este trabajo usare el término intensidad.

⁴Si suponemos que el campo es una onda armónica entonces $\langle \nabla E^2 \rangle = \langle \nabla E_0^2 \cos^2(\omega_0 t) \rangle$, y el promedio temporal del coseno es igual a 1/2 [34].

donde ϵ_0 es la constante dieléctrica del vacío. Sustituyendo 2.9 en 2.8 tenemos que

$$\langle \vec{F}_{gradiente} \rangle = \frac{\alpha}{\epsilon_0 c} \nabla I \quad (2.10)$$

Esta es la expresión para la fuerza de gradiente, esta fuerza es *proporcional al gradiente de la intensidad*, de modo que si iluminamos con un haz de intensidad uniforme esta fuerza se hará cero, y solo tendremos fuerza de esparcimiento.

Para completar nuestro análisis es necesario determinar la polarizabilidad α del material dieléctrico. La relación de Clausius-Mossotti relaciona la permitividad dieléctrica relativa ϵ_r , entre la esfera y el medio en el que esta inmersa $\epsilon_r = \epsilon_e / \epsilon_m$, con la polarizabilidad α de los átomos y moléculas que constituyen la esfera.

$$\alpha = 4\pi r^3 \frac{\epsilon_e}{\epsilon_r} \frac{\epsilon_e - \epsilon_m}{\epsilon_e + 2\epsilon_m} \quad (2.11)$$

donde ϵ_m es la permitividad del medio (en nuestro caso, recordemos que el medio es un fluido), ϵ_e es la permitividad de la esfera y r es el radio de la esfera. Podemos reescribir esta relación en términos del índice de refracción de un dieléctrico usando la definición del índice de refracción:

$$n^2 = \left(\frac{c}{v_{en\ el\ material}} \right)^2 = \frac{\epsilon\mu}{\epsilon_0\mu_0} = \frac{\epsilon}{\epsilon_0} \mu_r \approx \frac{\epsilon}{\epsilon_0} \quad (2.12)$$

donde μ_0 y ϵ_0 es la permeabilidad magnética y eléctrica del vacío, μ_r es la permeabilidad magnética relativa entre el material y el vacío y que para la mayoría de los materiales es muy cercana a uno y ϵ es la permitividad eléctrica del material que nos interese, en nuestro caso sería el material de la esfera o el material del medio en el que esta inmersa la esfera.

Reescribiendo la polarizabilidad α en términos del índice de refracción en la Ecuación 2.10 tenemos que:

$$\langle \vec{F}_{gradiente} \rangle = \frac{4\pi r^3 n_m^2}{c} \frac{\left(\frac{n_e}{n_m} \right)^2 - 1}{\left(\frac{n_e}{n_m} \right)^2 + 2} \nabla I \quad (2.13)$$

donde n_m es el índice de refracción del medio en el que está la esfera y n_e es el índice de refracción de la esfera.

De la relación 2.13 vemos que $\langle \vec{F}_{gradiente} \rangle$, además de depender del gradiente de intensidad, dependerá de la relación entre los índices de refracción. De tal forma

que si $n_e > n_m$ la esfera sentirá una fuerza de restitución en la dirección de máxima intensidad, pero si $n_e < n_m$ entonces la fuerza estará dirigida en sentido contrario, alejando a la esfera de los máximos de intensidad y ubicándola en los mínimos de intensidad.

Cualquier distribución de la intensidad puede dar lugar a una fuerza de esparramiento y a una fuerza de gradiente, la única condición que debe cumplir es que el gradiente de la intensidad sea diferente de cero. Aunque la descripción presentada hasta aquí no especifica la distribución de intensidad del haz, una pinza óptica tradicional se construye con un haz láser que emite un modo Gaussiano, como ya se ha mencionado.

2.3. Modo Gaussiano

Un modo Gaussiano es una solución a la ecuación escalar de Helmholtz para el campo eléctrico asociado a la luz, asumiendo que la aproximación paraxial es válida. La aproximación paraxial sólo será válida cuando la dependencia de la amplitud del campo eléctrico en el eje de propagación Z sea lenta comparada con las variaciones transversales en la dirección X y Y . Aunque esta aproximación deja de ser válida para haces fuertemente enfocados como los que necesitamos en una pinza óptica, la aplicaremos para dar una descripción de la distribución de intensidad.

La amplitud compleja del campo eléctrico para un haz Gaussiano está dada por [23]:

$$E(X, Y, Z) = E_0 \left(\frac{w_0}{w(Z)} \right) \exp \left(\frac{-\rho^2}{w^2(Z)} \right) \exp \left(\frac{-ik\rho^2}{2R(Z)} \right) \exp(i\Phi(Z)), \quad (2.14)$$

donde $\rho^2 = X^2 + Y^2$, k es el número de onda $k = \frac{2\pi}{\lambda}$, E_0 es la magnitud del campo en el centro del haz $E_0 = \|E(0, 0, 0)\|$, $w^2(Z)$ es una medida del tamaño del haz y está dado por

$$w^2(Z) = w_0^2 \left(1 + \left(\frac{Z}{z_R} \right)^2 \right), \quad (2.15)$$

w_0 se conoce como la cintura del haz, y es el radio del haz cuando la intensidad en la coordenada ρ ha caído \exp^{-2} de su valor en el centro del haz (Figura 2.3), z_R es la distancia de Rayleigh y depende del tamaño de la cintura y de la longitud de onda

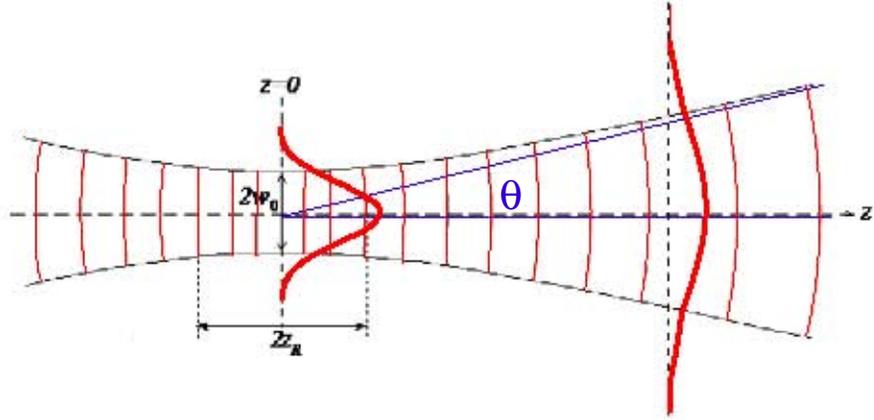


Figura 2.3: Parámetros de un haz Gaussiano. Se esquematiza un corte a lo largo del eje de propagación de un haz gaussiano. Las líneas punteadas en rojo representan los frentes de onda, la línea roja representa la distribución de intensidad transversal del haz, en este caso es una distribución gaussiana, en azul se muestra como el tamaño del haz $w(Z)$ se aproxima a una recta para valores lejos de la cintura. z_R es la distancia de Rayleigh y w_0 es la cintura del haz.

λ

$$z_R = \frac{\pi w_0^2}{\lambda}. \quad (2.16)$$

Físicamente, z_R es la distancia durante la cual el haz no cambia su diámetro significativamente y se mide desde la cintura, z_R es la longitud de la región focal (Figura 2.3). $R(Z)$ es el radio de curvatura del frente de onda, y está dado por:

$$R(Z) = Z \left(1 + \left(\frac{Z}{z_R} \right)^2 \right), \quad (2.17)$$

el cual se toma como positivo si el frente de onda diverge y negativo si converge. Finalmente, $\Phi(Z)$ es la fase de Guoy y está dada por:

$$\Phi(Z) = \arctan \left(\frac{Z}{z_R} \right) \quad (2.18)$$

Cada uno de los términos de la ecuación 2.14 corresponde a una propiedad física del haz. El primer término $w_0/w(Z)$ atenúa el perfil Gaussiano conforme el tamaño del haz aumenta. El segundo término proporciona el perfil de amplitud Gaussiano

del campo eléctrico en la dirección transversal ρ . El tercero es un término de fase que determina a Z como la dirección de propagación de la onda. El cuarto término es la fase radial, y nos dice como cambia la fase en el plano transversal debido a la curvatura del frente de onda y el último término es la fase de Guoy y nos da el desfaseamiento de los frentes de onda de un haz Gaussiano respecto una onda esférica centrada en la cintura del haz ($Z = 0$).

Conforme un haz Gaussiano se propaga el radio del haz cambia de tamaño. Para puntos muy alejados de la región focal del haz $Z \gg z_R$, el radio del haz $w(Z)$ en función de Z es una recta. El ángulo θ que se forma entre esta recta y el eje de propagación Z es una medida de la divergencia del haz (Figura 2.3), y para ángulos pequeños θ es aproximadamente igual a la pendiente de la recta

$$\theta \simeq \frac{w_0}{z_R} = \frac{\lambda}{\pi w_0}. \quad (2.19)$$

La distribución de intensidad de un haz gaussiano se obtiene elevando al cuadrado la norma de la expresión 2.14, resultando:

$$I(\rho, Z) = I_0 \left(\frac{w_0}{w(Z)} \right)^2 \exp \left(\frac{-2\rho^2}{w^2(Z)} \right), \quad (2.20)$$

donde $I_0 = \frac{n\epsilon_0 c}{2} E_0^2$.

Esta expresión es útil si queremos obtener la expresión final para las fuerzas de esparcimiento y de gradiente, y también es importante conocer esta expresión si queremos caracterizar los parámetros gaussianos de un haz usando el método de la navaja. Para la construcción de la pinza es necesario medir la cintura del haz w_0 y la distancia z_R .

En nuestro caso, realizamos esta caracterización midiendo por el método de la navaja el radio del haz $w(Z)$ a diferentes distancias de la salida de la fibra óptica, de la cual emerge el haz láser que utilizamos para formar la pinza óptica.

Este método consiste en poner una navaja sobre una platina de translación con resolución micrométrica y moverla a través del perfil transversal del haz. La potencia transmitida se mide con un medidor de potencia (Figura 2.4A). Al ir moviendo la navaja se bloquea parte del haz y el medidor detecta solo la potencia transmitida; la curva que nosotros obtuvimos usando este método se muestra en la Figura 2.4B.

Teóricamente, la potencia que llega al detector está dada por:

$$P(\rho_0) = \int_{\rho_0}^{\infty} I(\rho) d\rho \quad (2.21)$$

donde $I(\rho)$ es el perfil de intensidad Gaussiano dado por la Ecuación 2.20 y ρ_0 es la posición a partir de la cual la navaja no bloquea al haz. Sustituyendo la Ecuación 2.20 en la Ecuación 2.21 tenemos

$$P(\rho_0) = I_0 \left(\frac{w_0}{w(z)} \right)^2 \int_{\rho_0}^{\infty} \exp \left(\frac{-2\rho^2}{w^2(Z)} \right) d\rho. \quad (2.22)$$

A los datos experimentales mostrados en la Figura 2.4B se les ajustó una función error ⁵, comparando los parámetros del ajuste con la ecuación 2.22 se obtuvo el radio del haz. Finalmente se midió el radio del haz $w(Z)$ a diferentes distancias y se ajustó la Ecuación 2.15 a los datos para obtener la cintura w_0 y la distancia z_R . (Figura 2.4C).

2.4. Rigidez de la trampa

Una de las mayores utilidades de una pinza óptica es como *transductor de fuerzas*: si aplicamos una fuerza externa sobre la esfera atrapada y ésta se desplaza de su posición de equilibrio (x_0, y_0, z_0) , entonces en una situación de equilibrio la trampa ejercerá una fuerza de restitución dada por:

$$F_x = -k_{trampa,x}x, \quad (2.23)$$

de forma que el valor de la fuerza externa es igual al valor de la fuerza de restitución. El tener una relación lineal entre fuerzas y desplazamientos permite conocer la fuerza si conocemos: 1) la posición de la esfera (x, y, z) respecto la posición (x_0, y_0, z_0) y 2) el valor de la constante $k_{trampa,x}$, que puede obtenerse por diferentes métodos. En particular, aquí se expondrán los tres métodos mas usuales: 1) El método de equipartición de la energía, 2) El método de Stokes y 3) El método del espectro de potencias.

⁵Definimos la función error $Error(t_0) = \int_{t_0}^{\infty} \exp(f \cdot t) dt$ de modo que del parámetro f obtenemos $w(Z)$, $w(Z) = \sqrt{2/f^2}$

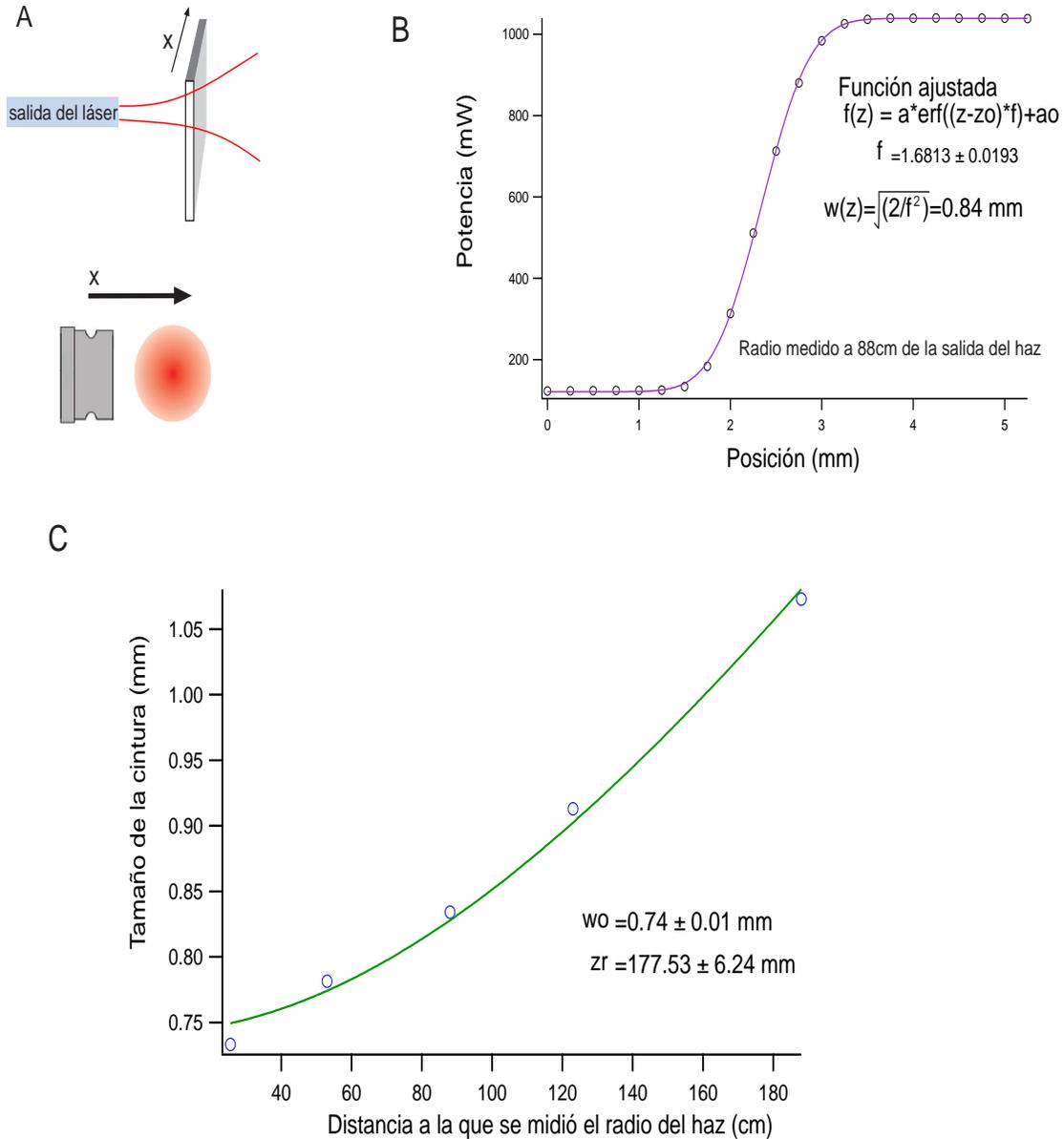


Figura 2.4: Método de la Navaja A) Desplazamos una navaja a lo largo del perfil transversal del haz Gaussiano y detectamos la potencia que llega a un foto-detector en función de la posición de la navaja. B) Graficamos la potencia en función de la posición de la navaja, a los datos obtenidos de los ajusto una función error y de los parámetros ajustados se obtuvo el radio del haz. C) Se midió el radio del haz $w(z)$ a diferentes distancias respecto al punto de salida del láser. A la gráfica obtenida se le ajusto la relación 2.15, de donde se obtuvo la distancia z_R y w_0 .

Describir la fuerza que ejerce una pinza óptica de manera análoga a la fuerza de restitución de un resorte es valido para cualquier distribución de luz, pero solo para desplazamientos pequeños respecto al punto de equilibrio. Esto debido a que la esfera se encuentra atrapada en forma estable, es decir se encuentra en un mínimo del potencial y un mínimo del potencial puede aproximarse por un potencial armónico (como el de un resorte), al menos cerca del punto de equilibrio.

En particular para un haz Gaussiano la región donde la fuerza de restitución es lineal con los desplazamientos es mas grande debido a que la fuerza de gradiente, que es la fuerza que mantiene a la esfera atrapada, depende linealmente de la posición cerca del punto de equilibrio. La región donde la fuerza depende linealmente de la posición debe ser determinada experimentalmente.

2.4.1. Método de Stokes

Una esfera moviéndose en un fluido laminar viscoso experimenta una fuerza de fricción dada por la ley de Stokes igual a:

$$F_{friccion} = \beta v = 6\pi r \eta v \quad (2.24)$$

donde β es la constante de arrastre de Stokes, r es el radio de la esfera, η es la viscosidad del fluido y v es la velocidad del fluido.

El valor de la constante de Stokes mostrado en 2.24 es valida para flujos laminares, que se dan lejos de las superficies. Cuando la esfera se encuentra a una altura h de la superficie es necesario hacer la corrección de Faxen [24]:

$$\beta = \frac{6\pi\eta r}{1 - \frac{9}{16} \left(\frac{r}{h}\right) + \frac{1}{8} \left(\frac{r}{h}\right)^3 - \frac{45}{256} \left(\frac{r}{h}\right)^4 - \frac{1}{16} \left(\frac{r}{h}\right)^5} \quad (2.25)$$

Con una pinza óptica se puede emular un flujo si se mueve la muestra a una velocidad v , este flujo ejercerá una $F_{friccion}$ sobre la esfera atrapada por la pinza óptica, desplazando a la esfera a una nueva posición. Si la fuerza de restitución de la pinza es iguala a la fuerza de fricción

$$k_{trampa} x = \beta v \quad (2.26)$$

entonces la esfera se quedara en la posición x . Se puede estimar la rigidez de la trampa si se grafica la nueva posición x en función de la velocidad del fluido. La pendiente de esta recta será $\beta/k_{trampa,x}$, si conocemos β podremos conocer $k_{trampa,x}$. Aquí se trató solo con la dirección x , pero lo mismo es válido en la dirección y .

2.4.2. Teorema de Equipartición de la Energía

El teorema de equipartición establece que, en equilibrio, la energía del baño térmico se distribuye uniformemente entre las diferentes contribuciones a la energía que dependan cuadráticamente de un grado de libertad q :

$$\left\langle q_m \frac{\partial H}{\partial q_n} \right\rangle = \delta_{m,n} k_B T. \quad (2.27)$$

Donde H es la función hamiltoniana del sistema, k_B es la constante de Boltzmann y T es la temperatura del baño térmico.

La energía potencial de una esfera atrapada en una pinza óptica depende cuadráticamente de la distancia (x, y, z) respecto la posición de equilibrio, al igual que un resorte. Usando el teorema de equipartición 2.27 podemos obtener la rigidez de la trampa en la dirección x

$$k_{trampa,x} = \frac{k_B T}{\langle x^2 \rangle}. \quad (2.28)$$

Donde $\langle x^2 \rangle$ es la varianza de la posición. Lo mismo es válido para la dirección y y z . La ventaja de este método es que no depende explícitamente del coeficiente de arrastre β de la partícula.

2.4.3. Espectro de Potencias

En una pinza óptica, la fuerza total que siente una esfera de masa m atrapada es igual a la fuerza restitutiva de la trampa ($F_x = -k_{trampa,x}x$) más la fuerza de fricción debido a la viscosidad del medio ($-\beta v$) más la fuerza térmica debido a la colisión de las partículas del medio en el que esta la esfera ($F(t)$):

$$m \frac{\partial^2 x}{\partial t^2} = -\beta \frac{\partial x}{\partial t} - k_{trampa} x + F(t) \quad (2.29)$$

Esta ecuación se conoce como ecuación de Langevin.

Como la fuerza térmica es una fuerza estocástica sólo se puede dar una descripción estadística del movimiento. Las propiedades estadísticas del movimiento son descritas por la función de correlación, la cual a su vez es una solución a la ecuación 2.29.

La transformada de Fourier de la función de correlación da como resultado un espectro de potencias ($G_x(f)$) cuyas unidades son nm^2/Hz y con la forma de una Lorenziana [25].

$$G_x(f) = \frac{4k_B T \beta}{k_{trampa}^2} \frac{1}{1 + \left(\frac{2\pi f \beta}{k_{trampa}}\right)^2} \quad (2.30)$$

Si se puede conocer la posición de la esfera atrapada en función del tiempo $x(t)$, de esta señal se puede obtener el espectro de potencias y ajustarle una función Lorenziana con la forma general

$$G_x(f) = A \frac{f^2}{f^2 + f_0^2} \quad (2.31)$$

donde f_0 es la frecuencia de corte, definida como el punto donde la frecuencia a caído 3dB y A es la amplitud del espectro de potencias a frecuencia cero. Relacionando la ecuación 2.30 con la ecuación 2.31 se tiene que:

$$f_0 = \frac{k_{trampa}}{2\pi\beta} \quad (2.32)$$

$$A = \frac{4k_B T \beta}{k_{trampa}} \quad (2.33)$$

De cualquiera de estos dos últimos parámetros se puede despejar la rigidez de la trampa en función de la temperatura de la muestra y el coeficiente de arrastre de Stokes, este coeficiente debe incluir la corrección de Faxen (Ecuación 2.25).

La estimación de k_{trampa} usando la frecuencia de corte (Ecuación 2.32) es el único de los métodos presentados aquí que no depende de la calibración del sistema de detección de la posición (x, y, z) de la esfera.

Capítulo 3

Construcción de una pinza óptica para estudios *in singulo*

Como se mencionó en el capítulo anterior, para tener una pinza óptica sólo hace falta enfocar fuertemente un haz de modo que se forme un gradiente en la intensidad. Por lo general este gradiente se obtiene haciendo pasar la luz del láser por una lente objetiva que forma parte de un microscopio invertido. En la Figura 3.1 se presenta un esquema del arreglo experimental que se montó en el laboratorio. Este dispositivo se basa en el esquema de una pinza óptica de la Referencia [24], y cuenta con un microscopio invertido (recuadro verde) para enfocar el haz y producir el mayor gradiente de intensidad posible. Este microscopio invertido cumple dos funciones: la primera es formar la imagen ampliada del plano de la muestra, y la segunda es enfocar la luz del láser para formar la pinza óptica. Para formar la imagen la luz de iluminación de un LED azul pasa por todo el microscopio, es transmitida por los dos espejos dicroicos ED1 y ED2 y forma la imagen magnificada del plano de la muestra en la cámara CCD. Para la segunda función la luz IR ($\lambda = 1064$ nm) del láser (iPG Photonics, YLR-10-1064-LP) se introduce al camino óptico del microscopio invertido por medio del espejo dicroico ED1 el cual refleja la luz IR y transmite la luz azul del sistema de iluminación. La luz del láser es enfocada por el objetivo (Carl Zeiss, Plan-Neofluar, AN=1.3) aumentando el gradiente de intensidad en las 3D, y produciendo el atrapamiento de la esfera en el plano de la muestra. La luz del láser que atraviesa la muestra es colectada por el condensador (Carl Zeiss, Plan-apo, AN=1.4) y enviada al sistema de detección, que se expondrá más adelante.

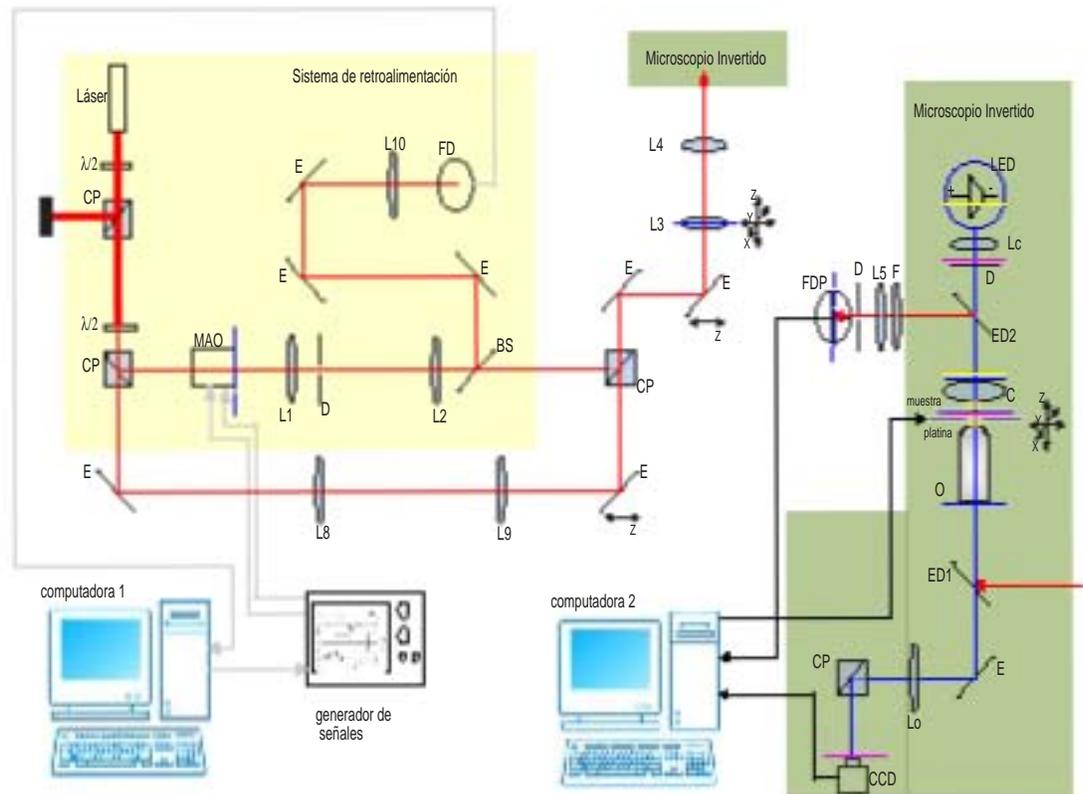


Figura 3.1: Dispositivo Experimental En amarillo se encuentra el sistema de retroalimentación para mantener fija la potencia, en verde se muestra el microscopio invertido compuesto por: el objetivo (O), el condensador (C), la lente de campo (L_c), la lente ocular (L_o) y como fuente de luz se usa un LED azul. La imagen del plano de la muestra se observó con una cámara de video (CCD). Con las lentes L1 y L2 se formó un telescopio 1:3.3 y con las lentes L3 y L4 forman un telescopio 1:1. Las líneas punteadas en azul, rosa y amarillo muestran los tres conjuntos de planos conjugados. La muestra se montó sobre una platina piezoeléctrica y la platina piezoeléctrica a su vez está montada sobre una platina micrométrica manual. Tanto el control de la platina piezoeléctrica, como el control del Modulador Acusto óptico (MAO) y la adquisición de la señal del foto-detector de posición (FDP) se controlan por medio de la computadora. Los espejos dichroicos ED1 y ED2 separan la trayectoria de la luz azul del LED de iluminación y la luz infrarroja del láser. Los cubos polarizadores (CP) junto con las laminas de onda ($\lambda/2$) sirven para regular la potencia transmitida. El CP3 sirve para juntar las trayectorias de las dos trampas.

Con una pinza de este tipo es posible manipular objetos micrométricos, pero resulta limitado realizar estudios *in singulo*. Para eso es necesario añadir dos cosas al microscopio invertido: 1) un sistema para el control dinámico de la posición (x_L, y_L) del láser y la rigidez de la trampa k_{trampa} ; 2) una platina piezoeléctrica que permita mover la muestra con una resolución nanométrica.

El control dinámico de la trampa es útil si:

1. Necesitamos mantener la fuerza que se aplica constante. En ese caso es necesario varia la posición de la trampa (x_L, y_L) para que la esfera atrapada se sitúe siempre a la misma distancia (x, y) del punto de equilibrio [24];
2. O bien si necesitamos mantener fija la posición (x, y) del objeto atrapado, en cuyo caso es necesario modular la rigidez de la trampa variando la potencia que llega al plano de la muestra.

En el dispositivo de la Figura 3.1 el control dinámico de la trampa está a cargo de un Modulador Acusto Óptico **MAO** (Intra Action Corp, DTD-274HA6M)

Por otra parte, contar con una platina piezoeléctrica de alta resolución permite hacer una calibración del sistema de detección de la posición (x, y, z) de la esfera con una resolución nanométrica. En este caso se utilizó una platina piezoeléctrica (Mad City Labs, Nano-LP100) capaz de moverse $100 \mu\text{m}$ con resolución de 1 nm . La platina piezoeléctrica se encuentra montada sobre una platina micrométrica manual que permite mover la muestra distancias mayores a $100 \mu\text{m}$.

En la muestra se coloca la macro molécula que queremos estudiar, si queremos estirla es necesario sujetarla por dos puntos diferentes, existen tres configuraciones estándar: 1) Sujetar la molécula entre el vidrio de la muestra y una esfera atrapada en la pinza óptica, 2) Sujetar la molécula entre dos esferas, una atrapada por la pinza óptica y la otra succionada por una micropipeta, 3) Sujetar la molécula entre dos esferas cada una atrapada en una pinza óptica independiente (Figura 3.2).

En el dispositivo de la Figura 3.1 se ve un segundo brazo del láser, este brazo también forma una pinza óptica en el plano de la muestra, y se colocó para tener la opción de realizar mediciones con la configuración mostrada en la Figura 3.2C. Sobre la segunda trampa no se tiene un control dinámico de la posición y la potencia como en la primera, pues no pasa por el MAO.

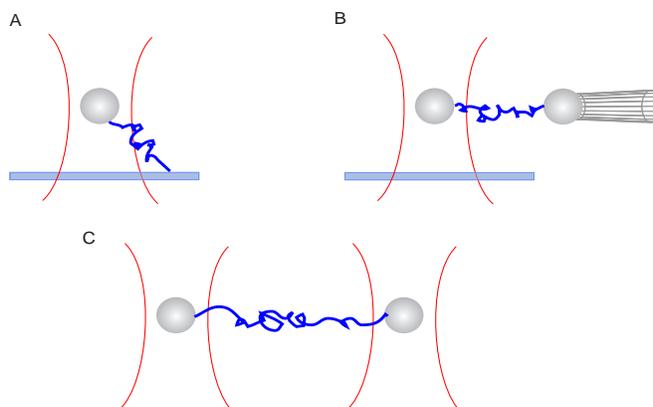


Figura 3.2: Diferentes configuraciones para una muestra A) Se puede unir un extremo de la macro molécula al vidrio de la muestra y el otro extremo a una esfera atrapada. B) Se puede atar un extremo de la macro molécula a una micropipeta y el otro extremo a una esfera atrapada. C) Se puede atar la macro molécula entre dos esferas atrapadas. Una de las trampas es fija mientras que la otra tiene movilidad.

Con esto tenemos un esquema general de los elementos más importantes que componen una pinza óptica: el microscopio invertido, la platina piezoeléctrica, un sistema de detección de la posición (x, y, z) de una esfera atrapada y un sistema para el control dinámico de la pinza. Para su construcción es necesario seleccionar los dispositivos ópticos correctos y colocarlos a las distancias adecuadas. A continuación se resumen todos los puntos que se consideraron para la implementación del sistema de pinzas ópticas mostrado en el Figura 3.1.

3.1. El objetivo de microscopio

En un microscopio una lente objetiva es la encargada de amplificar el objeto, de ahí su nombre. Un objetivo de microscopio es un juego de lentes que se pueden caracterizar como una sola lente. El objetivo de microscopio es uno de los elementos más importantes en una pinza óptica, pues es el encargado directo de la amplificación de la imagen de la muestra y de enfocar el haz del láser. Veamos primero cómo *el objetivo de microscopio enfoca la luz del láser*.

Un objetivo de microscopio como cualquier lente tiene un plano focal posterior

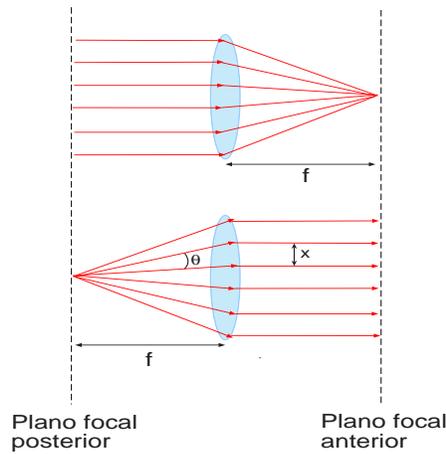


Figura 3.3: Planos focales de una lente positiva. El plano anterior de una lente se define como el punto donde se enfocan los rayos paralelos de luz que llega a la lente desde $+\infty$, y el plano focal posterior se define como el punto donde se enfoca los rayos paralelos de luz que llega desde $-\infty$. Esta hace que dos haces separados un ángulo θ después de pasar por la lente se encuentran separados una distancia Δx , convirtiendo rotaciones en traslaciones

y un plano focal anterior, donde concentra la luz de un haz paraxial y paralelo. De forma análoga, una fuente de luz puntual ubicada en el plano focal de una lente emerge como un haz paraxial y paralelo [35] (Figura 3.3). De modo que, para enfocar fuertemente el haz del láser en el plano focal anterior del objetivo (lugar donde se coloca la muestra), es necesario que al plano focal posterior del objetivo llegue un haz Gaussiano colimado (haz paraxial y paralelo). Consideraremos que el haz está colimado si el radio $w(Z)$ casi no cambia a lo largo del eje de propagación Z , el valor de $w(Z)$ se obtiene experimentalmente usando el método de la navaja explicado en el Capítulo 2.

En el esquema de la Figura 3.3 se esquematiza que todos los rayos que llegan a la lente son enfocados en un punto, pero esta representación solo es válida para el caso límite de la óptica geométrica. En realidad la luz NO puede enfocarse en una área infinitamente pequeña y esta limitación es importante en una pinza óptica pues, como se vio en la ecuación 2.10, la fuerza de gradiente es proporcional al gradiente de la intensidad, y mientras más enfocado se encuentre el haz mayor será esta fuerza. El límite físico para la fuerza de gradiente lo impone la *difracción*. Que un haz no pueda enfocarse en una área arbitrariamente pequeña, se debe a que la lente que

enfoca la luz es una apertura circular cuyo patrón de difracción es una función de Airy [34]. Un haz no puede enfocarse en un área circular cuyo diámetro sea menor al diámetro del primer disco de Airy (Figura 3.4).

Sin embargo lo que si se puede hacer es tratar de obtener el mayor enfocamiento posible, dentro del límite impuesto por la difracción. Para eso se utilizan objetivos con una apertura numérica (**AN**) alta, pues el diámetro del disco de Airy depende inversamente de la AN [35]. La apertura numérica es un número adimensional que mide la capacidad de una lente para coleccionar luz (Figura 3.5). Y se define como:

$$AN = n_m \sin \theta. \quad (3.1)$$

Aquí n_m es el índice de refracción del medio en el que se encuentra la fuente de luz y θ es el ángulo formado entre el eje de la lente y el rayo más inclinado del cono de luz que la lente puede coleccionar. Dado que la apertura numérica depende directamente del ángulo θ , es importante asegurar que éste ángulo sea el mayor posible y que a la lente lleguen todos los rayos que es capaz de coleccionar o enfocar.

Para asegurar que se forma el mayor ángulo posible, se utiliza un objetivo de inmersión, con lo que se reducen el número de interfaces que debe atravesar la luz mientras se enfoca y por lo tanto la luz se refracta en menos ocasiones, haciendo que el cono de luz coleccionada sea mayor. En un microscopio de inmersión se coloca una gota de aceite, con el mismo índice de refracción que el vidrio, entre el objetivo de microscopio y la muestra. Al tener que cambiar de medio una sola vez (del vidrio al medio dentro de la muestra) el cono de luz que converge en el punto focal del objetivo es mayor que cuando no se tiene la gota de aceite (Figura 3.5).

Como se ve en la Figura 3.5, no llenar la apertura posterior del objetivo también disminuye la AN efectiva pues a la lente no llegan todos los rayos que es capaz de enfocar. Por otro lado, si el haz sobrellena demasiado la apertura posterior del objetivo, entonces se presentan problemas de deriva mecánica pues la luz absorbida calienta el objetivo de microscopio dilatando las lentes. Lo más recomendable es que el tamaño del haz sea ligeramente más grande que la apertura trasera del objetivo [24].

El tamaño del haz se puede modificar usando un telescopio kepleriano. Un telescopio de este tipo se forma colocando un par de lentes positivas o convergentes de distancia focal f_1 y f_2 , respectivamente, separadas una distancia $f_1 + f_2$. El poder de magnificación de un telescopio, es decir cuántas veces se aumenta o disminuye el tamaño del haz está dado por el cociente f_1/f_2 (Figura 3.5) [34].

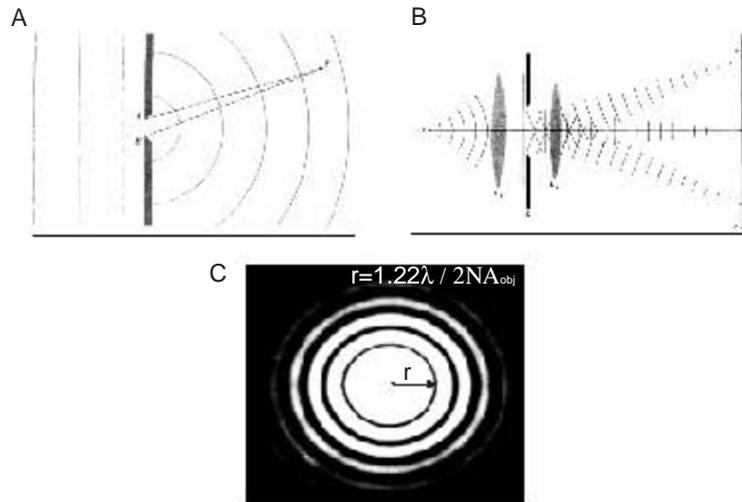


Figura 3.4: Límite impuesto por la difracción. A) En este diagrama se considera una onda plana incidiendo sobre una apertura. Cada punto de la apertura funciona como una fuente puntual de luz, de modo que para llegar al punto P la luz emitida por el punto A recorre una distancia diferente a la luz que emite el punto B; esta diferencia de camino óptico hace que la luz de A y de B llegue al punto P con diferente fase, dando lugar a la interferencia. La interferencia de todos los puntos en la apertura, que funcionan como fuentes puntuales de luz, forman un patrón de difracción. B) Una fuente puntual situada a la distancia focal de una lente L1 produce onda planas, que al pasar por una apertura producirán un patrón de difracción de campo lejano. El patrón de difracción de campo lejano se puede acercar si se coloca una lente L2. Este esquema es equivalente a tener la luz colimada que llega a la apertura trasera del objetivo y es difractada por la apertura formando un patrón de difracción en infinito, pero que la lente objetiva acerca. C) Se muestra la imagen del patrón de difracción de la luz al pasar por una apertura circular (Función de Airy). La flecha indica el radio del primer disco de Airy, y el límite impuesto por la difracción. *Imágenes tomadas de la referencia [34]*

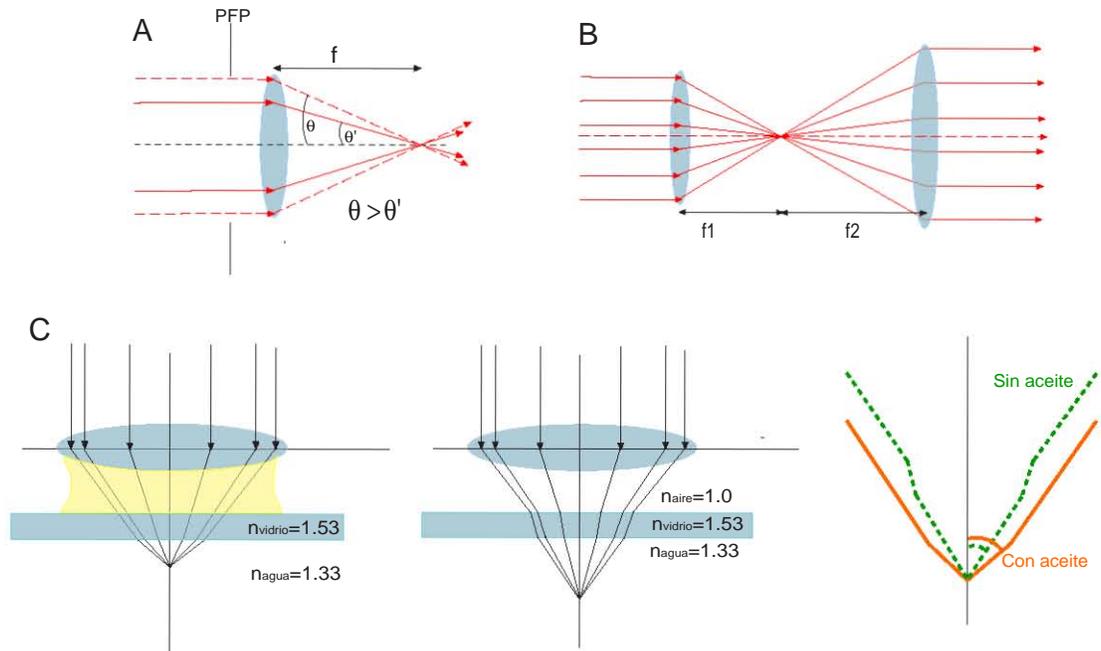


Figura 3.5: Apertura Numérica A) El ángulo θ se forma entre el eje de la lente y el rayo con mayor inclinación que puede ser colectado por la lente (línea punteada). Si se ilumina una lente con un haz de tamaño menor al tamaño de la lente, se pierde apertura numérica efectiva, pues el ángulo (θ') disminuye (línea continua), B) Un telescopio de Kepler aumenta el tamaño del haz, la magnificación esta dada por el cociente entre las distancias focales de las lentes f_2/f_1 y las lentes están separadas una distancia igual a la suma de sus distancias focales f_1+f_2 . C) Usar un microscopio de inmersión disminuye el número de interfaces que la luz atraviesa antes de enfocarse. El cono de luz que puede colectar una lente cuando la luz cambia de medio solo una vez es mayor (derecha línea continua) que cuando debe cambiar de medio dos veces (derecha línea punteada en verde)

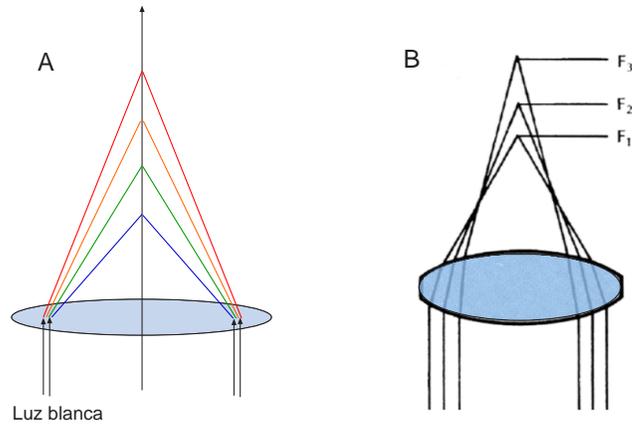


Figura 3.6: Aberraciones A) Aberración cromática. La luz se enfoca en diferentes puntos dependiendo de su longitud de onda, pues el índice de refracción de la lente depende de λ . B) Aberración esférica. La luz se enfoca en diferentes puntos, independientemente de su longitud de onda, debido a que los frentes de onda más alejados del centro de la lente son refractados en un ángulo mayor que los frentes de onda centrados en la lente.

Para saber qué poder de magnificación se debe usar, es necesario conocer el tamaño del haz antes del telescopio y el tamaño de la apertura trasera del objetivo. En nuestro caso fue necesario implementar un telescopio 1:3.3; este telescopio está formado por las lentes **L1** y **L2** de la Figura 3.1. En el dispositivo experimental se muestra un segundo telescopio formado por las lentes **L3** y **L4**; a diferencia del primer telescopio este último no modifica el tamaño del haz (magnificación 1:1) y su función se explicará más adelante. Finalmente, para asegurarnos de enviar al plano focal posterior de la lente un haz colimado y del tamaño correcto, se midió el tamaño del haz después del segundo telescopio usando la prueba de la navaja.

El objetivo que se utilizó está corregido para aberraciones: cromáticas y esféricas (Figura 3.6). La corrección por aberraciones esféricas es importante para evitar que el haz se enfoque en diferentes puntos, evitando tener diferentes planos de atrapamiento a lo largo del eje Z. Otra propiedad importante a considerar cuando se escoge un objetivo de microscopio es que transmita la λ de la luz del láser; en este caso el objetivo que se usó transmite el 35% de la luz IR que recibe (valor obtenido de la hoja de datos del fabricante).

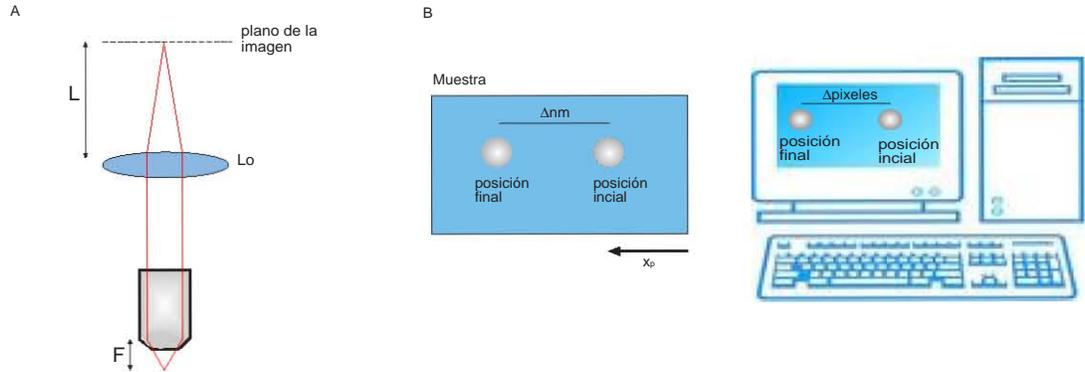


Figura 3.7: Magnificación de un objetivo de microscopio corregido a infinito.

A) La magnificación final de un objetivo corregido a infinito depende de la distancia focal de referencia (L) y de la distancia focal del objetivo (F). B) El valor final de la magnificación se puede medir de la relación entre desplazamientos en el plano de la muestra y en la imagen de la cámara. La M_{Total} que se midió en la cámara CCD fue de 152x

La segunda función del microscopio es *producir una imagen magnificada del plano de la muestra*. En un objetivo de microscopio corregido a infinito como el que se utilizó, la magnificación del objetivo es el cociente entre la longitud focal de referencia (L) y la distancia focal (F) del objetivo (Figura 3.7A) [36]. En el dispositivo (Figura 3.1) la lente L_o acerca la imagen desde infinito y la forma en el plano focal de la lente, donde se coloca la cámara CCD. El fabricante especifica que para una distancia $L = 165$ mm (usando una lente L_o de distancia focal $f=165$ mm) la magnificación es de 100x. Para una distancia $L = 200$ mm la magnificación esperada será de $M = L/F = 200/1,65 = 121$. Esta relación da una estimación de las veces que se magnifica la muestra, pero lo mejor es hacer una medición directa de la magnificación total.

Para medir la magnificación total se relaciona un desplazamiento del objeto en el plano de la muestra con el desplazamiento de ese objeto en la imagen de la cámara. El desplazamiento en la imagen de la cámara se mide en pixeles, por lo que es necesario conocer la equivalencia entre pixeles y distancias. Esta equivalencia se obtiene del tamaño de la sección de detección de la cámara y el número de pixeles que tiene (Figura 3.7B).

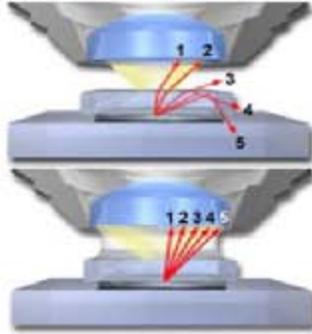


Figura 3.8: Condensador La luz al cambiar de un medio con índice de refracción alto a uno bajo puede sufrir reflexión total interna si el ángulo de incidencia es mayor al ángulo crítico dado por la ley de Snell $\theta_c = \text{sen}^{-1} n_{\text{incidencia}}/n_{\text{transmisin}}$. Si no se coloca el aceite de inmersión los rayos que inciden con un ángulo mayor al ángulo crítico no son transmitidos. *Figura tomada de la referencia [36].*

3.2. El condensador

El condensador es el otro elemento del microscopio invertido que cumple dos funciones. La primera es coleccionar toda la luz del láser que atraviesa la muestra para después enviarla a un sistema de detección de la posición (x, y, z) de la esfera. Como el condensador debe coleccionar la luz del láser que pasa por la muestra es necesario que tenga una A.N. similar a la del objetivo, pues si no se perderá la información de los rayos del láser mas inclinados que no puedan ser coleccionados. En el caso del condensador también debemos asegurarnos de aprovechar toda la A.N. de la lente. Al igual que con el objetivo de microscopio se utilizó un condensador de inmersión, pero en este caso lo que se evita al colocar una gota de aceite de inmersión entre el condensador y la parte superior de la muestra, es la reflexión total interna de los rayos que inciden con un ángulo mayor al ángulo crítico, dado por la ley de Snell (Figura 3.8).

La segunda función del condensador es producir un campo de iluminación brillante y homogéneo para poder observar la muestra, esto se logra cuando el condensador cumple la condición de Koheler.

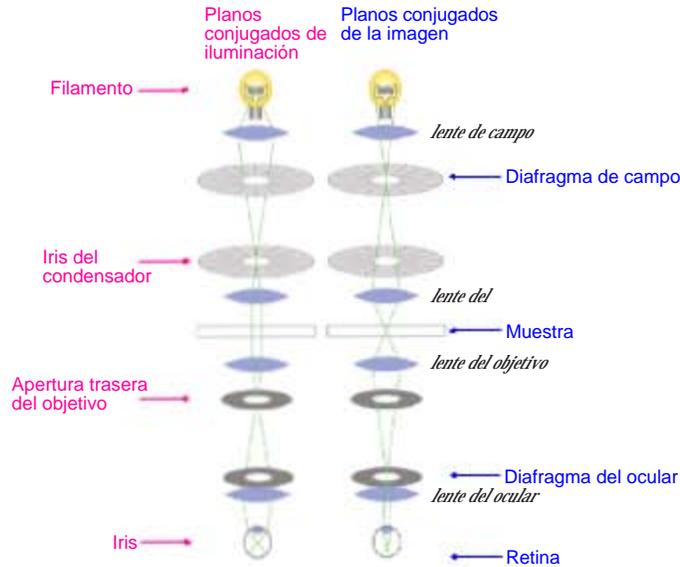


Figura 3.9: Iluminación de Köhler En la iluminación de Köhler hay dos conjuntos de planos conjugados, un conjunto para la formación de la imagen y otra para la iluminación de la muestra. *Imagen tomada de la Referencia [21]*

3.3. Sistema de iluminación de Köhler

El sistema de iluminación de Köhler busca tener en el plano de la muestra una iluminación homogénea y brillante. Para tener un sistema de iluminación de Köhler el condensador, el objetivo, la lente de campo y la lente ocular deben colocarse en planos específicos, que se dividen en dos juegos de planos conjugados: Planos conjugados que forman la imagen y planos conjugados de iluminación [35]. Los planos que se deben de conjugar para tener una iluminación de Köhler se esquematiza en la Figura 3.9.

Dos planos P_1 y P_2 son conjugados si la imagen de una fuente de luz en P_1 se forma en el plano P_2 y viceversa [35]. La posición del plano de la imagen (S_i) se puede conocer si sabemos la distancia focal (f) de la lente que forma la imagen y a que distancia se encuentra el plano del objeto (S_o) de la lente (Figura 3.10). La

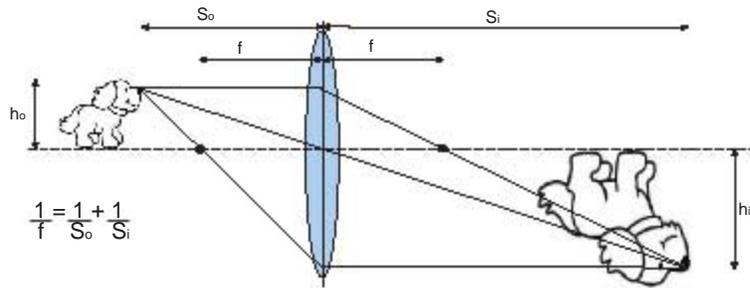


Figura 3.10: Formación de imágenes La distancia a la que una lente de distancia focal f forma la imagen de un objeto está dada por la ecuación 3.2

ecuación que las relaciona se llama ecuación de las lentes delgadas

$$\frac{1}{f} = \frac{1}{S_o} + \frac{1}{S_i}, \quad (3.2)$$

y a partir de esta se puede saber a que distancia de la lente se forman los planos conjugados.

En nuestro dispositivo experimental se cumplen condiciones de la iluminación de Köhler. La lente de campo forma la imagen del LED en la apertura trasera del condensador (planos conjugados mostrados con líneas punteadas en amarillo en la Figura 3.1), y el plano de la muestra es conjugado al diafragma de campo y al plano de la cámara (planos conjugados mostrados con líneas punteadas en rosa en la Figura 3.1).

3.4. Control dinámico de la trampa

El control en la posición de la trampa se basa en deflectar el láser para lograr trasladar la posición de la trampa en el plano de la muestra. Esto es posible gracias a que una lente convierte rotaciones en traslaciones (Figura 3.3). Recordemos que la lente encargada de enfocar el haz en el plano de la muestra es el objetivo de microscopio, entonces el punto de pivote respecto al cual se debe girar el haz debe ser el plano focal posterior del objetivo, pero sería muy complicado colocar algo que permita rotar la dirección del haz justo en ese punto.

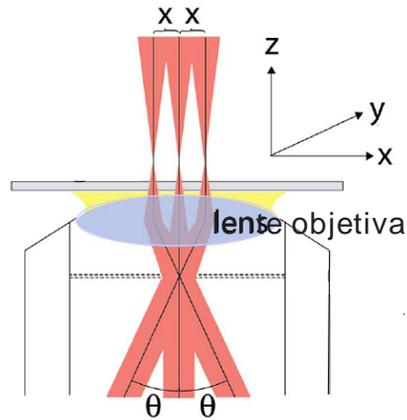


Figura 3.11: Traslación de la trampa en el plano de la muestra Las rotaciones del haz en cualquiera de los planos conjugados al plano focal posterior se traducen en una traslación en el plano de la muestra. *Imagen tomada de la referencia [21].*

La solución es conjugar el plano trasero del objetivo con cualquier lente, espejo o dispositivo que tenga un punto de pivote. Rotar la posición del láser en alguno de estos planos conjugados es equivalente a rotar la posición del láser justo en el plano focal posterior del objetivo, y esta rotación se traducirá de forma natural en una traslación de la trampa en el plano de la muestra (Figura 3.11).

Para esto se pueden utilizar espejos piezoeléctricos, Deflectores Acusto Ópticos (DAO) o Moduladores Acusto Ópticos (MAO). Los espejos piezoeléctricos tienen el mayor ángulo de deflexión del láser, un DAO es el más rápido para cambiar la posición del láser (x_L, y_L), mientras que el MAO permite mover la posición del láser y también permite modular la intensidad de la luz [24]. En nuestro caso se utilizó un MAO, y como se indica con líneas azules punteadas en la Figura 3.1 el plano de salida del MAO y el plano focal posterior del objetivo son planos conjugados.

Además del MAO también se conjugó el plano de la lente L3 con el plano focal posterior del objetivo; la lente L4 es la encargada de conjugar estos planos. La lente L3 se monta en una platina con tornillos micrométricos que permiten moverla en 3D. Esta lente no tiene como finalidad tener un control dinámico de la trampa, pero permite controlar la posición del láser en x_L, y_L, z_L . Esto es muy útil para lograr la alineación final de la trampa.

3.4.1. Modulador Acusto Óptico

Un modulador acusto óptico está formado por un cristal de dióxido de telurio. Por dos de sus caras se hace pasar una onda viajera de sonido, producida por un material piezoeléctrico. Cada una de las ondas viajeras es una onda de presión que comprime y expande el cristal produciendo un patrón periódico de planos (paralelos a la cara del cubo) con diferente índice de refracción. La luz ve cada uno de estos conjuntos de planos como una rejilla de difracción. Modulando la frecuencia de la onda de sonido que llega a cada cara del cubo se puede controlar la posición del láser en la dirección x_L y y_L en forma independiente, como se explica más adelante. La onda de sonido es absorbida al llegar al final del cubo, evitando que la onda se refleje y se produzca una onda estacionaria ¹. Por las otras dos caras entra y sale la luz del láser que es deflectada debido a las rejillas de difracción (Figura 3.12). Analicemos que le pasa a la luz debido a la rejilla de difracción producida por la onda viajera que llega a una de las caras del cubo.

Si nos fijamos en la longitud de camino óptico $L_{C.O.}$ de dos rayos que inciden con un ángulo θ sobre dos planos consecutivos de igual índice de refracción, veremos que son reflejados y salen del cubo por la cara paralela a la cara por la que entraron (Figura 3.13). Si la diferencia de camino óptico entre estos dos rayos es un múltiplo entero m de la longitud de onda de la luz incidente λ , entonces ambos interferirán constructivamente. El número m especifica cuantas veces cabe la longitud de onda λ en la diferencia de camino óptico, y determina el orden de la difracción. Si queremos asegurarnos de tener un máximo de intensidad en el primer orden de difracción ($m = 1$) la luz del láser debe llegar al cristal con un ángulo :

$$\theta_B = \text{sen}^{-1} \left(\frac{\lambda}{2\Lambda} \right), \quad (3.3)$$

donde Λ es la longitud de onda del sonido que viaja por el cristal. Cuando el ángulo de incidencia cumple con la relación 3.3 se dice que cumple la condición de Bragg.

Cuando se cumple la condición de Bragg el ángulo formado entre la dirección del primer orden de difracción y la dirección del haz incidente es $2\theta_B$. De modo tal que al modificar θ_B se modifica la dirección del primer orden de difracción, y de la

¹En este caso la onda de sonido que produce el patrón de difracción es una onda viajera y a diferencia de una onda estacionaria solo produce uno de los dos posibles ordenes de difracción $m = \pm 1$ [37]

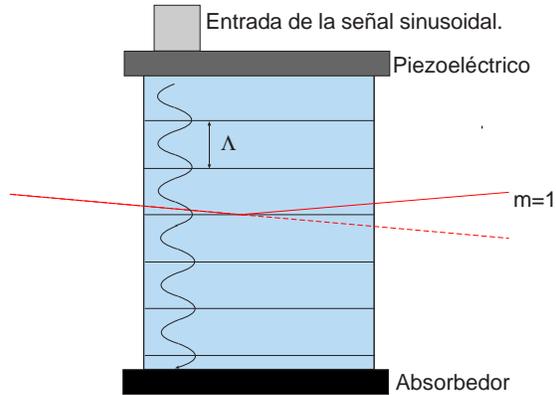


Figura 3.12: Modulador Acusto óptico AL piezoeléctrico llega una señal de voltaje sinusoidal de radiofrecuencia, producida por un generador de funciones. Esta señal hace oscilar piezoeléctrico que produce una onda de sonido viajera, que es absorbida al llegar al final del cubo. Cada onda viajera produce en el cristal de dióxido de telurio un patrón de planos con diferente índice de refracción, que la luz ve como una rejilla de difracción. El haz que sale, al otro lado del cubo, es el primer orden de difracción $m=1$.

relación 3.3 vemos que el ángulo θ_B depende del Λ . Si se modifica la frecuencia de la onda de sonido ν_{sonido} , se modifica Λ y el cambio en la posición del láser dependerá linealmente del cambio en la frecuencia ² [21]:

$$\Delta\theta = \lambda \frac{\Delta\nu_{sonido}}{V_{sonido \text{ en el cristal}}} \quad (3.4)$$

donde $V_{sonido \text{ en el cristal}}$ es la velocidad de la onda de sonido en el cristal.

Como se ha mencionado, el modulador produce dos ondas de sonido independientes y cada una de ellas produce un patrón de difracción en el cristal, simulando dos rejillas empalmadas ortogonalmente. Estas dos rejillas empalmadas producen un padrón de difracción en dos dimensiones. El orden (1,1) es el haz enviado al microscopio invertido para generar la pinza óptica, pues la deflexión de este orden permiten mover la trampa en la dirección x_L y y_L en el plano de la muestra.

²Esto sera cierto solo para un rango de frecuencias pequeño, donde el máximo de intensidad se sigue formando en el primer orden de difracción a pesar de no cumplirse textualmente la condición de Bragg.

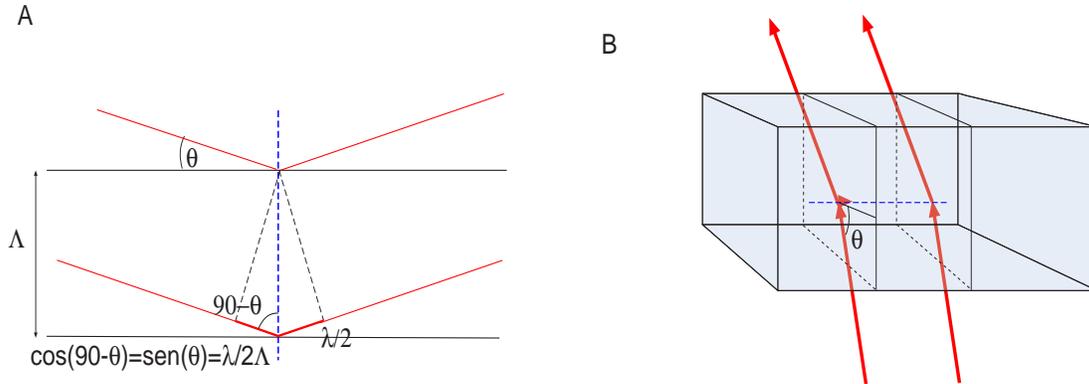


Figura 3.13: Rejilla de Difracción. A) La luz del láser es difractada por la rejilla y atraviesa el cristal. Si el ángulo de incidencia cumple la condición de Bragg el máximo de intensidad será el orden $n=1$, y será posible controlar su posición si se modifica la frecuencia de la onda de sonido. La línea gruesa marca la diferencia de camino óptico entre los rayos, cuando esta distancia es un múltiplo de λ se forma un máximo de intensidad. Para asegurar la interferencia totalmente constructiva la luz debe incidir en la rejilla con un ángulo $\theta = \theta_B$ B) El orden de difracción $m=1$ se desvía ligeramente de la trayectoria del haz original que atraviesa el cristal.

La onda de sonido que atraviesa el cristal del MAO debe ser una onda periódica, de periodo bien definido (se escogió un perfil de onda sinusoidal). Esta onda de sonido tiene frecuencias en el rango de MHz y es producida por un piezoeléctrico. Al piezoeléctrico llega una señal de voltaje, con la frecuencia de la onda de sonido que se quiere producir. La señal es producida por un generador de señales (Tektronix AFG3000), que puede ser controlado por un puerto USB desde una computadora. Esto permite modificar la frecuencia y amplitud de la onda por medio de LabView.

La señal del generador de señales no puede ser enviada directamente al piezoeléctrico del MAO, pues la potencia de la señales a la salida del generador es del orden de 2mW mientras que la potencia que debe llegar al piezoeléctrico es de ≈ 500 mW. Para acoplar la potencia de entrada y de salida se tiene una etapa de amplificación con una ganancia de 24 dBm³.

Como se menciono anteriormente, un MAO además de permitir deflectar el haz, permite modular la intensidad de luz que sale del cristal, y en consecuencia la rigidez

³La ganancia en dBm esta definida como $G=10 \log(P_{salida \text{ en } mW}/P_{entrada \text{ en } mW})$.

de la trampa. La intensidad del primer orden de difracción depende directamente de la potencia de la onda de sonido [21]

$$I_1 = I \text{sen}^2(\sqrt{\alpha P}) \quad (3.5)$$

donde I_1 es la intensidad a la salida del MAO, I es la intensidad de la luz que incide en el MAO, α es un parámetro que depende de la longitud de onda de la luz incidente y de las propiedades geométricas del MAO y P es la potencia de la onda de sonido y está dada por:

$$P = \frac{(V_{pp}/2\sqrt{2})^2}{R} \quad (3.6)$$

donde V_{pp} es el voltaje pico pico de la señal sinusoidal y R es la resistencia del medio en el que viaja la señal, en este caso es la resistencia de los cables coaxiales que conectan el MAO, el amplificador de potencia y el generador de señales y tiene un valor de 50Ω . De las relaciones 3.5 y 3.6 se ve que la intensidad del láser a la salida del MAO se puede modificar si se modifica la amplitud de la señal sinusoidal que se envía a los piezoeléctricos y que producen la onda de sonido.

En resumen, sobre el orden de difracción (1,1) se tiene control de la posición y de la potencia del láser al variar la frecuencia y la amplitud de la onda sinusoidal que produce el generador de señales, y el cual a su vez se puede controlar por medio de una computadora.

3.5. Detección de la posición de una esfera atrapada

Existen diferentes métodos para detectar la posición (x, y, z) de una esfera atrapada, usando cámaras de video o foto-detectores [24]. La selección del método de detección dependerá de las necesidades específicas de cada experimento. El método de detección que se utilizó en este trabajo se conoce como detección en el plano focal posterior del condensador y consiste en formar la imagen de toda la luz del láser que llega al plano posterior del condensador en un foto-detector de posición (FDP) dividido en cuadrantes [24]. Esto se hace conjugando ambos planos.

Con este método lo que se registra son los cambios en la posición (x, y, z) de una esfera atrapada respecto su posición de equilibrio (x_0, y_0, z_0) . En el dispositivo de la Figura 3.1 los planos conjugados del FDP y del plano posterior del condensador se

marcan con una línea azul punteada. También es importante conjugar el plano del FDP con los planos donde el láser tiene un punto de pivote (MAO y L3), con el fin de evitar que el láser cambie su posición (x_L, y_L) en el foto-detector y simule una señal producida por el desplazamiento de la esfera (x, y, z) respecto su posición de equilibrio.

Usando óptica geométrica se puede esquematizar el funcionamiento de este método de detección. Como ya se mencionó en el Capítulo 2 la luz del láser, al atravesar una esfera situada en el plano de la muestra, cambia de dirección; este cambio de dirección es lo que detecta el FDP de cuadrante. Un FDP de cuadrante recibe la luz del láser y proporciona como señal de salida un voltaje. El valor de este voltaje dependerá de la posición del láser en la sección de detección del FDP, por lo que es muy importante centrar el FDP con la mancha del láser antes de tomar cualquier medición.

Un FDP de cuadrante está dividido en cuatro secciones independientes. La señal de salida del FDP que corresponde a la posición y de la esfera es la resta de los 2 cuadrantes superiores con los 2 cuadrantes inferiores normalizados por la suma de todos los cuadrantes. Para la posición x de la esfera la señal es la resta de los 2 cuadrantes de la derecha con los dos cuadrantes de la izquierda normalizados por la suma de todos los cuadrantes (Figura 3.14A)

Cuando una esfera atrapada por la pinza se encuentra en su posición de equilibrio la luz no cambia de dirección, y todos los cuadrantes reciben exactamente la misma cantidad de luz, siempre que se haya alineado previamente el láser y el FDP. Cuando la esfera se mueve en la dirección x la luz que pasa a través de la esfera cambia de dirección, de modo tal que dos de los cuadrantes laterales reciben más luz y se detecta una señal V_x (Figura 3.14B). El mismo principio opera para la posición y de la esfera y la señal del FDP V_y .

La señal V_z es la suma del voltaje de todos los cuadrantes del FDP. Para detectar un cambio en la señal en función de la posición z de la esfera se coloca un apertura antes del detector, de modo que el haz ilumine el borde del diafragma. Cuando una esfera esta atrapada en su posición de equilibrio la apertura sigue bloqueando sólo una pequeña parte del haz, pero cuando la esfera se mueve en la dirección z la luz converge o diverge haciendo que una mayor cantidad de luz pase por el diafragma o bien que se sea bloqueada por el diafragma, esto modifica la intensidad de luz que llega a los cuatro cuadrantes del FDP cambiando la señal V_z .

La calibración del FDP se consigue relacionando la señal (V_x, V_y, V_z) con un desplazamiento conocido de una esfera que se encuentra pegada a la superficie de vidrio de la muestra. La posición de la esfera se modifica moviendo la posición de la platina (x_p, y_p, z_p) , y es en este punto donde es importante contar con una platina piezoeléctrica con resolución de nanómetros.

La luz del láser colectada en el plano focal posterior del condensador conserva aproximadamente su perfil Gaussiano. Si se barre la sección de detección del FDP moviendo la posición del láser (x_L) , la señal que veríamos se puede ajustar a la derivada de una Gaussiana (Figura 3.14C) [30]. Cuando se tiene una esfera pegada al vidrio de la muestra y se mueve la platina piezoeléctrica de modo tal que la esfera cruce por completo a lo largo de todo el haz, el resultado final es el mismo: el láser es deflectado y barre toda la sección de detección del FDP. La señal que se obtiene es exactamente la misma que la mostrada en la Figura 3.14C para el caso en el que se mueve directamente el haz, pero aquí se puede relacionar linealmente la señal del FDP V_x, V_y, V_z con el desplazamiento de la esfera (x, y, z) .

La señal del foto-detector es enviada primero a un acoplador de impedancias (formado básicamente por un amplificador operacional) y luego a una tarjeta de adquisición de datos (National Instruments 6036E), conectada a una computadora. La señal del FDP se visualiza directamente en la computadora por medio de los diferentes VI's presentados en el Apéndice B. Esta tarjeta de adquisición de datos tiene una velocidad máxima de muestreo de 200 KHz, lo cual pone una cota para los procesos que queramos medir. Con esta tasa de adquisición de datos no es posible medir eventos que ocurran en tiempos menores a $5 \mu s$.

3.6. Fuentes de ruido

Los fenómenos biológicos que se estudian usando pinzas ópticas ocurren a escalas de fuerzas y distancias pequeñas y en intervalos de tiempo que van desde nanosegundos hasta varios minutos (Figura 3.15). Es importante estimar la escala a la cual ocurrirá el evento que deseamos medir, pues debemos asegurarnos que la señal de ruido NO sea mayor a la señal de la medición. En base a lo que queramos medir se establecerá el límite permitido para la señal de ruido.

Para un estudio de de pinzas ópticas *in singulo*, las fuentes de ruido son

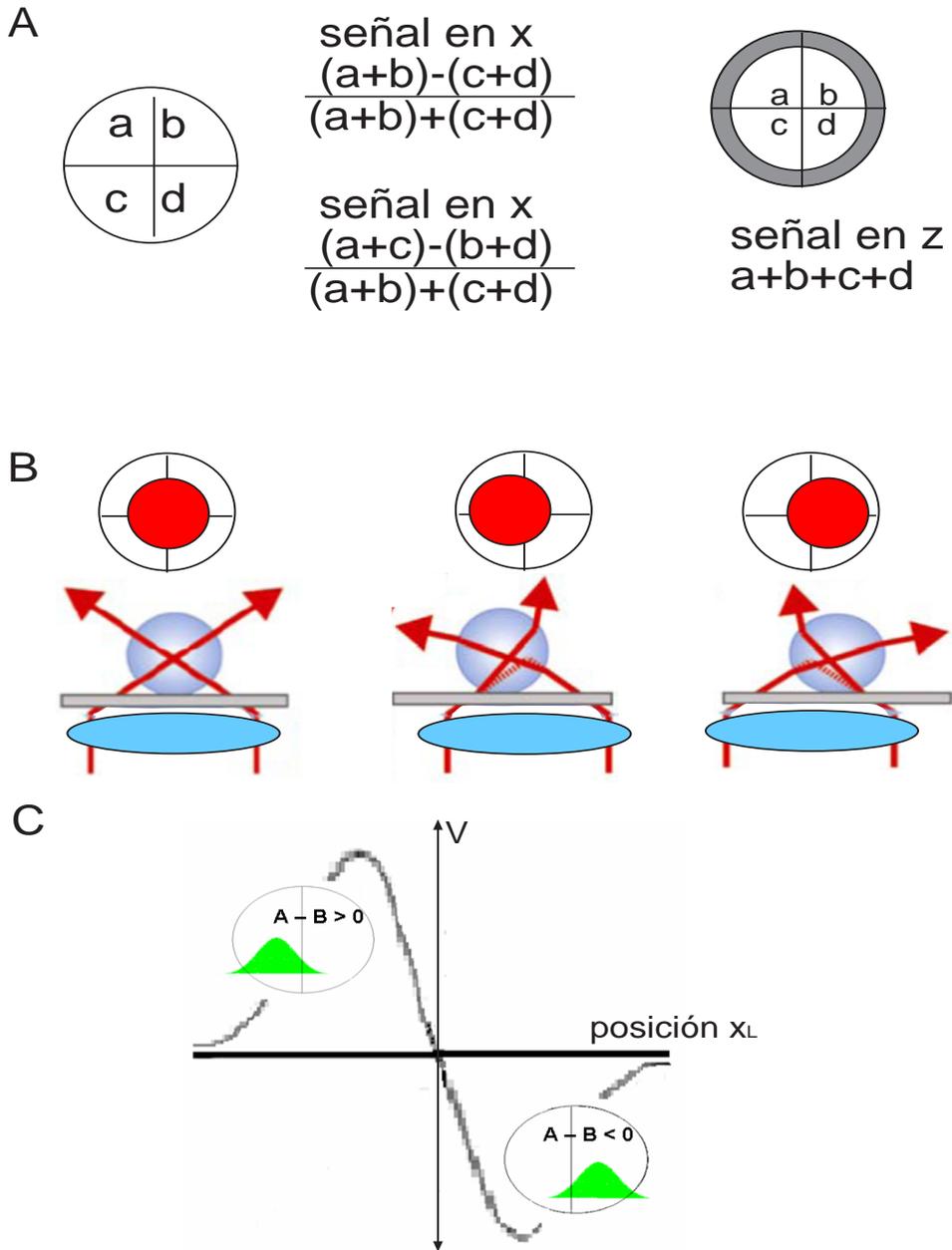


Figura 3.14: Método de detección de un foto-detector de cuadrante A) se esquematiza como se obtiene la señal V_x, V_y, V_z en un FDP de cuadrante. B) La luz que atraviesa una esfera es deflectada, esta deflexión de la luz es lo que produce la señal del FDP. C) Al mover la posición del láser a lo largo del FDP se produce una señal que puede ajustarse a la derivada de una Gaussiana.

<i>Energía</i>	<i>Fuerza</i>	<i>Longitud</i>	<i>Tiempo</i>
<i>Hidrolisis de ATP 100pN nm</i>	<i>Para romper un enlace covalente 1nN</i>	<i>Diametro de algunas bacteria 1µm</i>	<i>División celular minutos</i>
<i>El movimiento de un ion a traves de la membrana celular 30pN nm</i>	<i>Para romper interacciones proteina-proteina 20pN</i>	<i>Diametro de un organelo en eucariontes 100nm</i>	<i>Cambios conformacionales en una proteina nanosegundos</i>
<i>La energía del baño terminco a temperatura ambiente 4pN nm</i>	<i>Fuerza que producen algunos motores moleculares 5pN</i>	<i>Ensamble grande de proteinas 25nm</i>	<i>Un paso en un proceso bioquímico milisegundos a microsegundos</i>

Contemporary Physics, 2002 Vol. 43

Figura 3.15: Escalas a las que ocurren los procesos biológicos

experimental y por movimiento Browniano [28]. El ruido experimental proviene del exterior, como vibraciones y corrientes de aire, o de componentes del instrumento como ruido electrónico, fluctuaciones de la potencia del láser o en la estabilidad de apunte, deriva mecánica de la platina o de las monturas de las lente debido al cambio en la temperatura del cuarto. Mientras que el ruido Browniano proviene de las fuerzas térmicas que actúan sobre la esfera al estar inmersa en un baño térmico. A diferencia del ruido Browniano, que no puede ser eliminado, el ruido experimental se puede reducir hasta obtener la relación señal a ruido adecuada para la medición.

En nuestro caso, como ya se ha mencionado, este sistema de pinzas ópticas se construyó con el fin de estudiar la dinámica del motor molecular cinesina. Para este motor se ha reportado, que *in vitro*, da pasos de 8 nm y deja de translocarse para valores mayores a 6.5 pN de fuerza[31]. De modo que el ruido en nuestras señales (la posición y la fuerza) deben quedar por debajo de estos valores.

Para reducir el ruido experimental debido al medio ambiente la pinza se construyó sobre una mesa óptica con amortiguadores neumáticos, que disminuye vibraciones mecánicas. Para disminuir las corrientes de aire se colocaron cortinas de plástico alrededor de la mesa, y para las fuentes de ruido experimental asociadas con el instrumento se caracterizó: 1) La estabilidad de apunte, 2) La estabilidad en la potencia, 3) La deriva mecánica.

3.6.1. Estabilidad de apunte

Idealmente, el haz de un láser se propaga en línea recta sin cambiar de dirección; en la práctica, la dirección de apunte cambia a lo largo del tiempo. Si la dirección de apunte cambia, cambia a su vez la posición de la trampa en el plano de atrapamiento. Es el mismo principio que para el control dinámico de la trampa, pero en este caso es un movimiento no deseado y sobre el cual no se tiene control. Esta inestabilidad en la dirección de apunte del láser hace imposible distinguir entre un movimiento de la esfera respecto a la trampa debido al proceso biológico de interés y uno debido a la variación en la dirección de apunte del haz. Esta variación en la dirección de apunte del láser no se puede eliminar y contribuye al ruido de la señal.

Para asegurarnos que esta contribución al ruido este por debajo de la señal que queremos medir se caracterizó la estabilidad de apunte del láser IR que se uso para construir la pinza. Se montó un FDP a una distancia d del láser. Para centrar el FDP respecto al láser se montó el FDP en una platina micrométrica manual, con movimiento en la dirección horizontal y vertical respecto al láser (Figura 3.16A).

Se calibró el detector para obtener el factor de conversión entre voltajes y desplazamientos. Se movió el detector con los tornillos micrométricos y se registró el voltaje de salida (Figura 3.16B). Después se registró la señal en V_x y V_y por aproximadamente 9 horas (Figura 3.16C y D). Un desplazamiento de un 1 mrad equivale aproximadamente a un desplazamiento de $1 \mu\text{m}$ en el plano de la muestra [32]. Las variaciones en la dirección de apunte son del orden de $6 \mu\text{rad}$ en un periodo de 13 horas, que equivale a variaciones de 6 nm en el plano de la muestra en un periodo de 13 horas.

3.6.2. Estabilidad en la potencia

Al cambiar la potencia en el tiempo también cambia la rigidez de la trampa. Si la potencia cambia mas rápido de lo que podemos realizar una medición completa, entonces los valores obtenidos no pueden reescribirse en términos de la fuerza, pues no conocemos la constante de rigidez para cada tiempo. En forma análoga, si la potencia cambia entre el momento que se hace la calibración del FDP al momento en el que se mide la posición z de una esfera atrapada, no podremos convertir la señal de volts a desplazamientos, pues la señal V_z depende de la cantidad de luz que

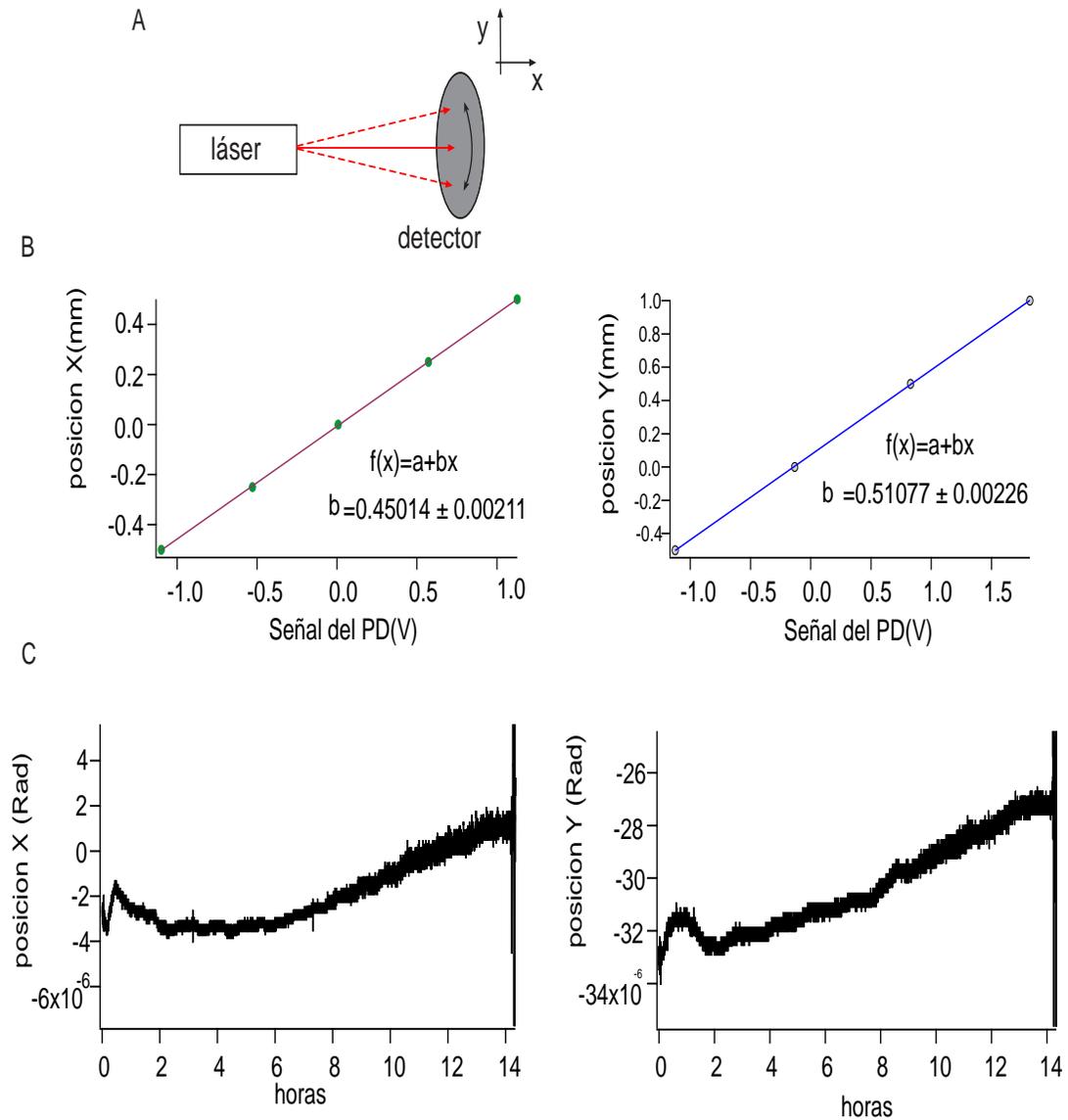


Figura 3.16: Medición de la estabilidad de apunte del láser. A) Para medir la estabilidad de apunte intrínseca del láser se colocó un FDP centrado en el láser. B) Para convertir la señal del FDP en desplazamientos se hizo una calibración. El factor de conversión entre Volts y mm es la pendiente de la recta. C) La estabilidad de apunte de mide en cuantos radianes se modificó la posición del láser a lo largo de 13 horas.

llega al FDP.

Para medir la potencia en función del tiempo se colocó un divisor de haz, después de la lente **L2** del dispositivo experimental (Figura 3.1), el haz reflejado se envió a un foto-detector (FD), y se registró la potencia en función del tiempo. Al mismo tiempo se registro la señal en el FDP, para asegurar que las variaciones de la potencia en el plano de la muestra se relacionan con las variaciones en la potencia del láser.

Se encontró que la potencia del láser varía entre un 15 % y un 30 %, y esta variación correlacionan con la variación de la potencia medida en el plano de atrapamiento por el FDP. Como la rigidez de la trampa depende linealmente de la potencia, esta variación se traduce en una variación de k_{trampa} [26]. Para disminuir la variación en la potencia se implementó un sistema de retroalimentación proporcional e integral [27].

Como se mencionó anteriormente, el MAO puede modificar la intensidad de la luz que transmite si se modifica la amplitud de la onda sinusoidal que es enviada al piezoeléctrico. Este sistema de control dinámico es muy útil para reducir las fluctuaciones en la potencia del láser.

En el dispositivo experimental de la Figura 3.1 se enmarca en un recuadro amarillo el sistema de retroalimentación. La señal en voltaje del FD se envió a una computadora. Por medio de una rutina de LabView se calcula cuánto debe de corregirse la amplitud de la señal sinusoidal que se envía al MAO (la rutina de LabView se comunica directamente con el generador de señales), de forma tal que el voltaje del FD permanezca constante respecto a un valor de referencia. Así, un cambio en la señal del FD es compensado por un cambio en la amplitud de la señal sinusoidal que va al MAO. Activando el sistema de retroalimentación la potencia que llega al plano de la muestra puede permanecer estable con variaciones del 1 % (Figura 3.17).

La rutina de LabView usada para mantener fija la potencia del láser se describe en el Apéndice B y se llama “Feedbackpower.vi”.

3.6.3. Deriva Mecánica

La deriva mecánica se debe a cambios en la temperatura del cuarto que dilatan y contraen las monturas de las lentes o la platina micrométrica sobre la que se monta

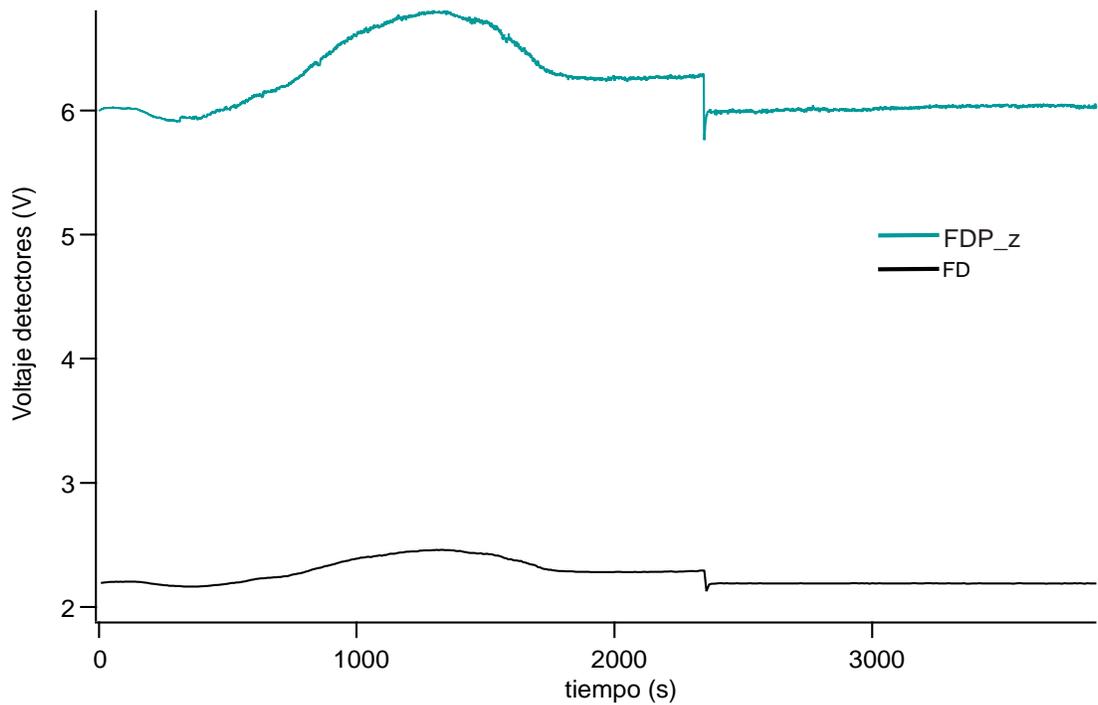


Figura 3.17: Estabilidad en la potencia del láser Se registro el voltaje del FD y la señal V_z del PSD para verificar que las variaciones en potencia del láser correlacionana. Se registraron las variaciones en potencia durante media hora, y después se activo el sistema de retroalimentacion.

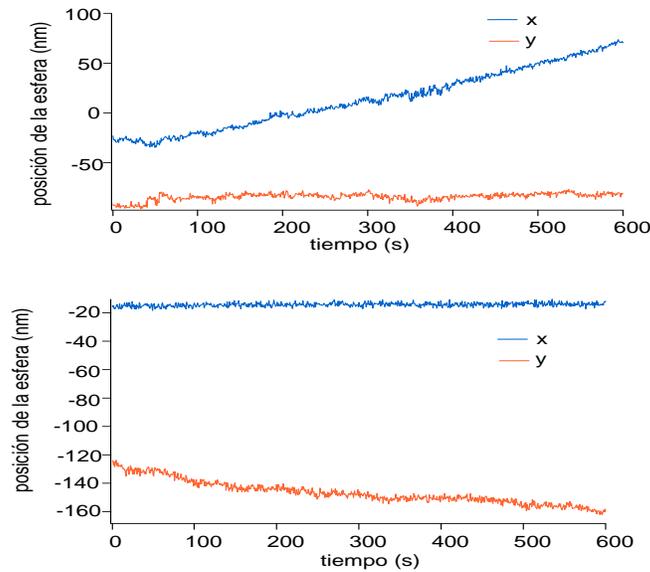


Figura 3.18: Deriva mecánica de la platina. (Arriba) Se movió la platina micrométrica en la dirección x_p y después de 5 minutos se registro cuanto se seguía moviendo la platina. (Abajo) Después se dejo fija la dirección x_p y se movió y_p

la platina piezoeléctrica (sobre estas dos platinas se coloca la muestra). Para los ensayos donde se ata la molécula de interés entre la esfera atrapada en la pinza y la superficie de vidrio de la muestra, la deriva mecánica resulta un problema, pues no es posible distinguir entre un movimiento de la esfera por efecto del proceso biológico de interés y un movimiento de la esfera debido a que la platina se movió de manera no controlada. Si que el desplazamiento de la esfera debido a la deriva mecánica es mayor a la distancia que queremos medir, será necesario implementar un sistema de retroalimentación que mantenga a la platina en la misma posición.

Para medir la deriva mecánica se colocó el láser sobre una esfera unida al vidrio y se registró la señal del FDP en función del tiempo (Figura 3.18); previamente se obtuvo la calibración del FDP para poder convertir la señal de Volts a nm. A temperatura ambiente, la platina se mueve 2.5 nm en 15 s para la dirección x_p y 0.6 nm en 15 s para la dirección y_p . Dado que una medición en promedio se hace en menos de 15 s la señal de ruido en la posición de la platina debido a la deriva queda por debajo del valor de las mediciones que se quieren hacer.

3.7. Calibración de la trampa: conversión de volts a nm

Esta calibración se requiere para poder conocer la posición (x, y, z) de una esfera atrapada, y por lo tanto debe hacerse en el punto de atrapamiento del haz. Esto es un problema técnico, pues la calibración se haría moviendo la esfera una distancia (x, y, z) conocida y registrando el cambio en la señal del FDP, mas una esfera atrapada se moverá con el haz manteniéndose en la posición de equilibrio x_0, y_0, z_0 a menos que algo la detenga.

Para resolver este problema, se centra el haz respecto a una esfera pegada al vidrio y se desplaza la platina en la dirección x_p , de modo tal que el haz pase a lo largo de toda la esfera (Figura 3.19A); y lo mismo se hace en la dirección y_p . Como se mencionó anteriormente, la señal que se obtiene se puede ajustar a la derivada de una función Gaussiana, donde la pendiente de la región lineal proporciona la calibración de Volts a nm del FDP.

Después de este procedimiento, aun queda un problema: cómo estar seguros que la calibración obtenida corresponde a la calibración que se obtendría para una esfera atrapada. Para que la calibración del FDP obtenida con una esfera pegada corresponda a la calibración de una esfera atrapada, la esfera pegada se debe ubicar en el punto de atrapamiento a lo largo de la dirección axial del haz.

Para determinar este punto, se atrapa una esfera en solución y se acerca la platina, moviéndola en dirección z_p , hasta que la esfera choca con la superficie de la muestra y empieza a ser empujada. Debido a las interacciones electrostáticas entre el vidrio de la muestra y la esfera, la esfera se queda pegada al vidrio⁴. Al repetir la misma medición moviendo la platina en dirección z_p ahora se obtiene la señal de una esfera pegada. En algún momento de este barrido la esfera pegada al vidrio se encontrara justo en la posición del haz donde se atrapa la esfera en solución (Figura 3.19B).

El punto en el que la posición de la platina z_p y la posición de atrapamiento del haz coinciden se muestra en la Figura 3.19C y es el punto donde ambas señales de FDP se empiezan a superponer [24]. De la Figura 3.19D vemos que la posición de

⁴Para aumentar la probabilidad de que la esfera se quede pegada al vidrio se diluyeron las esferas en un Buffer salino.

atrapamiento se da pasando el foco del haz; el foco se encuentra en el punto medio de la señal V_z para una esfera pegada.

Antes de hacer la medición de las propiedades elásticas de una macro molécula, es necesario hacer una calibración del FDP, aunque no es necesario encontrar la posición de atrapamiento z_0 para cada calibración, pues ésta no se modifica. Lo que se hizo fue estimar a que porcentaje de la señal de una esfera pegada de 730 nm de diámetro se encuentra el punto de atrapamiento z_0 y se repitió esta medida para 8 esferas diferentes. El valor promedio de este punto resultó ser 91 %.

Una vez determinado el punto de atrapamiento, se colocó el haz sobre una esfera pegada y se ubicó la platina en la posición z_p que corresponde al 91 % de la señal V_z para una esfera pegada. Ahí se tomó la calibración moviendo la platina en la dirección x_p y y_p en pasos de tamaño conocido y registrando la señal V_x y V_y . La pendiente de la recta que se puede ajustar a la parte central de la gráfica es el factor de calibración del FDP (F_{cx}, F_{cy}) (Figura 3.19D).

Vemos que para valores alejados del centro la relación entre volts y nanómetros deja de ser lineal. En este caso se consideró que la región lineal comprende a todos los puntos que caen dentro del cono formado por $\pm 10\%$ del valor de la pendiente. Se encontró que la región lineal del FDP en nuestro sistema comprende ≈ 300 nm.

Todas estas mediciones se hicieron de forma automatizada utilizando los VI's descritos en el apéndice B :”CenterStuckbead.vi“ ,”ScanStageLookingForSurface.vi“ ”CenterStuckbead91%.vi“

3.8. Calibración de la rigidez de la trampa

La rigidez de la trampa se midió por los tres métodos presentados en el Capítulo 2, en los tres casos k_{trampa} se midió para una esfera de 730 nm de diámetro, a 300 nm por encima de la superficie y usando el sistema de retroalimentación para estabilizar la potencia del láser en 91 mW (medida antes del objetivo) y aproximadamente 32 mW en el plano de la muestra (como se menciona antes el objetivo de microscopio que se utiliza sólo transmite el 35 % de la luz IR).

El valor de la rigidez cambia en función de la distancia (h) entre el punto de

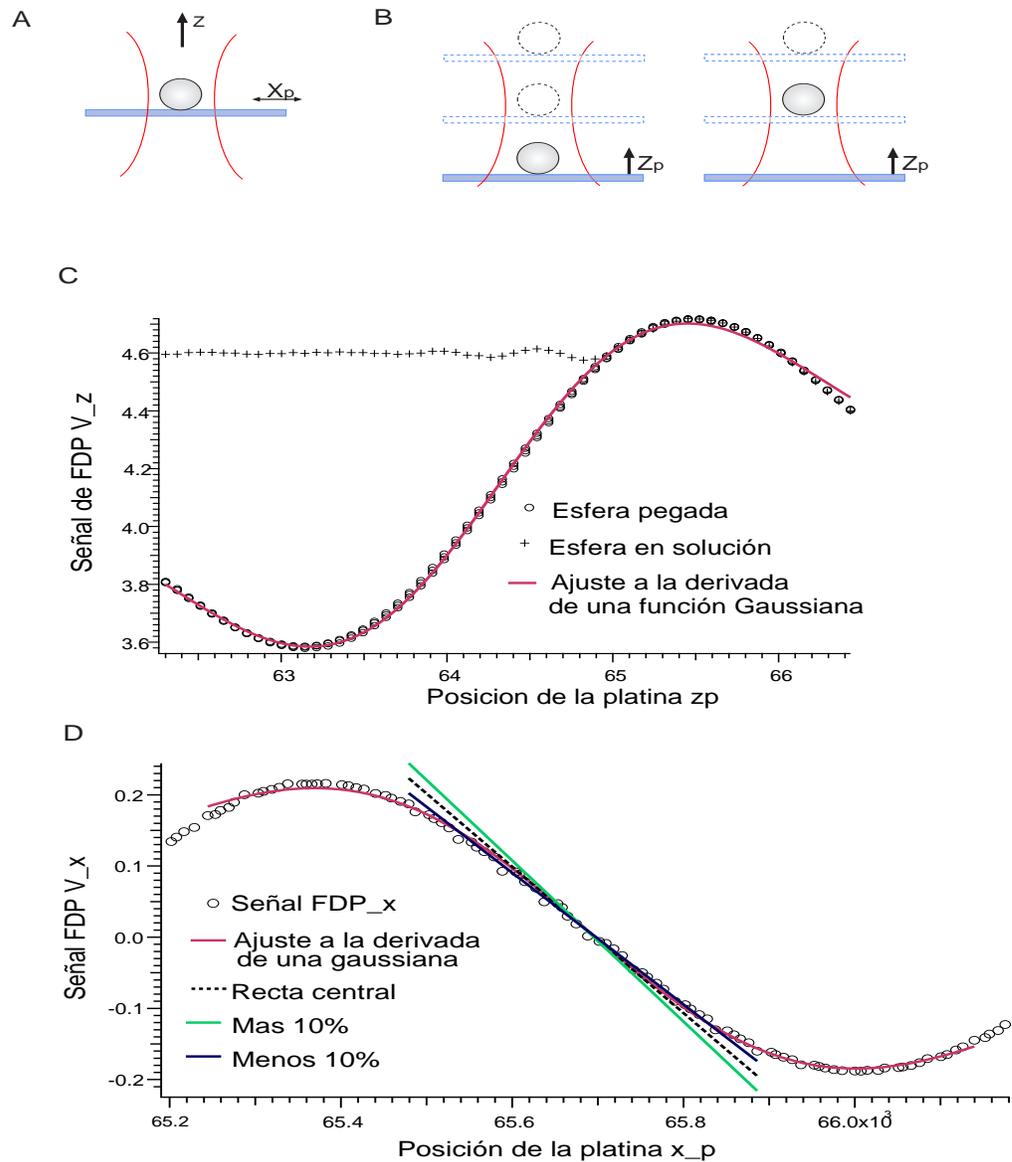


Figura 3.19: Calibración del FDP. A) Para poder relacionar voltajes con desplazamientos se utiliza una esfera pegada al vidrio. B) Al mover la platina en la dirección z_p hay un punto en el que la esfera pegada se sitúa en el mismo punto en la dirección axial del láser que una esfera atrapada. C) Con una esfera pegada ubicada a en la posición z_0 de atrapamiento se mueve la platina para obtener la calibración del detector (los datos mostrados corresponden a la calibración de la dirección X). Las líneas rectas se utilizaron para establecer la región lineal del FDP. D) Se muestra la señal de una esfera pegada y una esfera en solución, el punto de atrapamiento z_0 se encuentra justo donde ambas señales se empiezan a superponer.

atrapamiento z_0 y la superficie, siendo menor conforme nos alejamos de la superficie [29] (Figura 3.21B). También depende del factor de Stokes, el cual supone que la esfera se encuentra lejos de cualquier superficie. Una altura $h = 300$ nm es un punto intermedio entre ambas consideraciones, pues la disminución de la rigidez debido a la altura es pequeña y el factor de Stokes puede modificarse con la corrección de Faxen (Ecuación 2.25).

En este caso, a diferencia de cuando se estima la posición de la superficie para calibrar el FDP, no queremos que la esfera se quede pegada al vidrio, por lo que la solución en la que están las esferas no contiene sales. Esto ayuda a disminuir la probabilidad de que al entrar en contacto con la superficie la esfera se quede pegada. La posición de la superficie se encontró moviendo la platina en la dirección z_p y registrando la señal del foto-detector V_z , cuando la esfera toca la superficie del vidrio y empieza a ser empujada por el vidrio la forma de la señal cambia sensiblemente, de la señal de una esfera en solución atrapada por la pinza a la señal de una esfera pegada.

Ubicamos la superficie de la muestra en el punto donde una línea recta centrada respecto las oscilaciones de la señal V_z de una esfera libre interseca a la curva característica de la señal V_z de una esfera pegada (Figura 3.20). Una vez que se conoce la posición de la superficie se coloca la platina 300 nm por encima de ese punto. Esto se hace de manera automatizada por medio del vi descrito en el Apéndice B: "Find Surface Hight.vi".

Al mover la platina en dirección z_p , la posición de atrapamiento z_0 también se mueve. Esto se debe al desplazamiento del foco, pues el haz convergente que sale del objetivo cambia de medio, del vidrio al agua, haciendo que la luz se refracte alejándose de la normal y enfocando el haz antes de lo que se enfocaría si no cambiara de medio [33] (Figura 3.21A).

En este trabajo no se consideró la modificación en el valor de k_{trampa} debido al desplazamiento del foco, pues para las direcciones x y y la corrección en la rigidez de la trampa debido al desplazamiento del foco puede ser despreciada, pues como se ve en la Figura 3.21B, k_{trampa} se modifica muy poco al cambiar la altura [29].

Para obtener el valor de k_{trampa} por el método de equipartición de la energía, y usando la amplitud del espectro de potencias es necesario tener la calibración del FDP. Previo a obtener k_{trampa} se realizó la calibración del FDP siguiendo el procedimiento descrito anteriormente para 10 esferas diferentes. El valor de la calibración

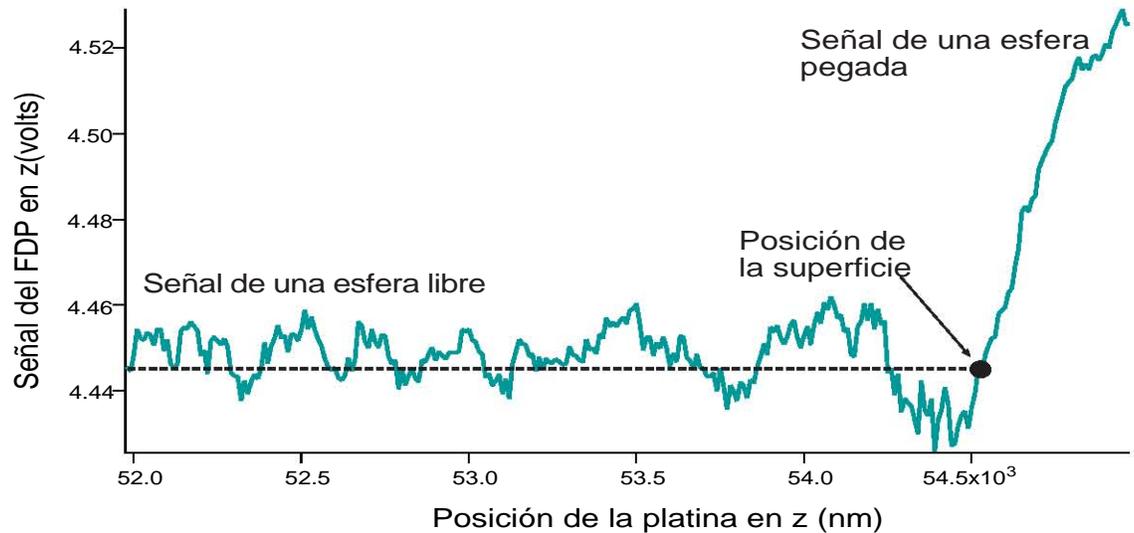


Figura 3.20: Determinación de la posición de la superficie . Para encontrar la rigidez de la trampa a 300 nm sobre la superficie de la muestra.

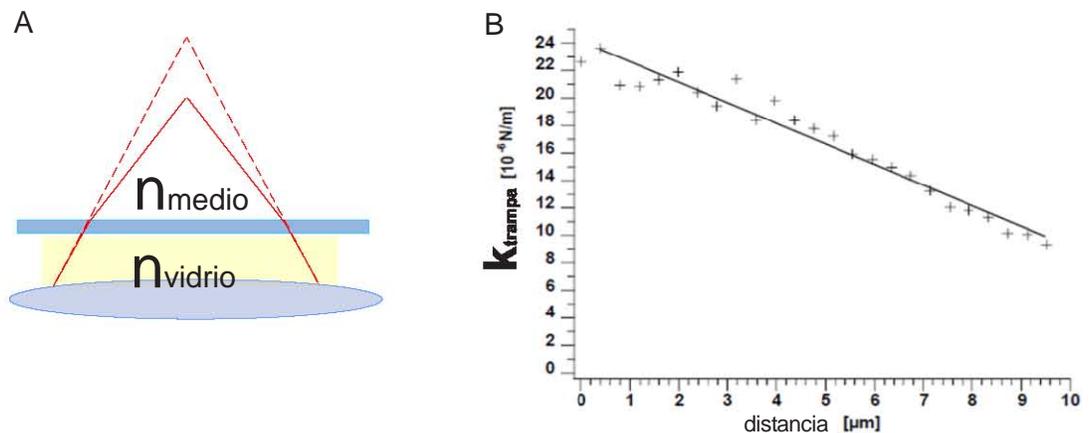


Figura 3.21: Desplazamiento del foco A) El haz convergente que sale del objetivo al cambiar de medio se refracta y forma el foco en una nueva posición. Esta nueva posición dependerá de en qué punto de la trayectoria del haz se encuentre con la interfaz agua-vidrio. B) Se muestra la relación entre la rigidez de la trampa y la distancia h . Gráfica tomada de la referencia [29]

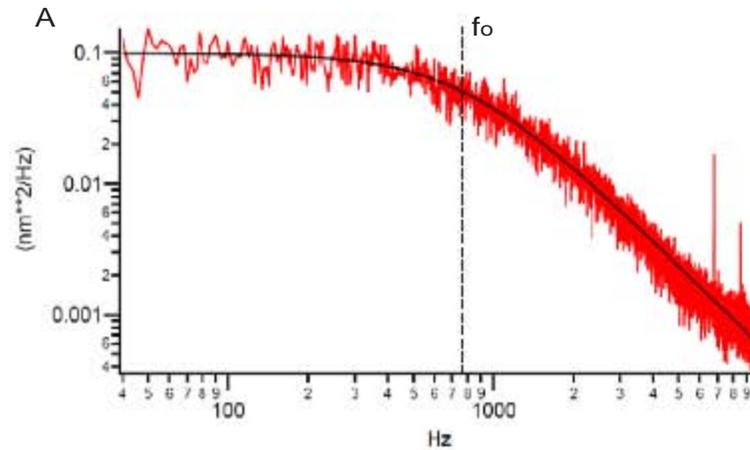
con el que se trabajó es el promedio de las 10 mediciones.

La medición de k_{trampa} por medio del espectro de potencias y del teorema de equipartición de la energía se realizó usando el vi "Power Spectrum.vi", el cual registra la señal del FDP, convierte la señal a nm, calcula la varianza de la posición en x , y y z de la esfera, así como su espectro de potencias (Figura 3.22). Al espectro de potencias le ajusta una Lorenziana y en base a las relaciones mostradas en las Ecuaciones 2.33, 2.32 y 2.28 se obtiene k_{trampa} para cada dirección. Estos valores se tomaron para 5 esferas diferentes, en las tres direcciones (x, y, z) el valor reportado de k_{trampa} para cada método es el promedio de las 5 mediciones (Figura 3.22).

Conocer la rigidez de la trampa no es suficiente, necesitamos saber cual es la región lineal de la trampa, en donde es valido suponer que k_{trampa} es constante. La región lineal se encontró usando el método de Stokes, el cual se automatizo por medio del programa "Drag Stokes.vi". En este método se grafica la posición de la esfera (x_0, y_0, z_0) en función de la velocidad de la platina, que en este caso es igual a la velocidad relativa del fluido en el que esta inmersa la esfera respecto a la esfera atrapada. La relación entre la posición de la esfera y la velocidad del fluido esta dada por la Ecuación 2.26. Para la región en que la fuerza que ejerce la trampa sea proporcional al desplazamiento (x_0, y_0, z_0) la relación entre la velocidad del fluido y la posición de la esfera será lineal.

La región lineal de la trampa se determina como la región de la gráfica (Figura 3.23) donde se puede ajustar una linea recta. A partir de la pendiente de la recta también es posible determinar el valor de k_{trampa} . En la dirección X la región lineal de la trampa es de 210 nm, y en la dirección Y la región lineal de la trampa es de 258 nm.

Una vez obtenida la calibración del FDP, la rigidez de la trampa y la región lineal tanto del FDP como de la trampa, nos encontramos en posibilidad de medir la fuerza aplicada a una macromolécula como el ADN.



B

	Espectro de potencias		Equipartición de la energía
	f_0	Amplitud ($f=0$)	
k_x	0.052 pN nm^{-1}	0.027 pN nm^{-1}	0.024 pN nm^{-1}
k_y	0.047 pN nm^{-1}	0.023 pN nm^{-1}	0.020 pN nm^{-1}
k_z	$0.0053 \text{ pN nm}^{-1}$	$0.0055 \text{ pN nm}^{-1}$	$0.0044 \text{ pN nm}^{-1}$

Figura 3.22: Medición de la rigidez de la trampa A) Se muestra un espectro de potencias obtenido con el Vi "Power Spectrum.vi", así como la curva Lorentziana que se ajusta a los datos experimentales y de donde se calcula el valor de k_{trampa} . B) En la tabla se resumen los valores típicos obtenidos para la rigidez de la trampa.

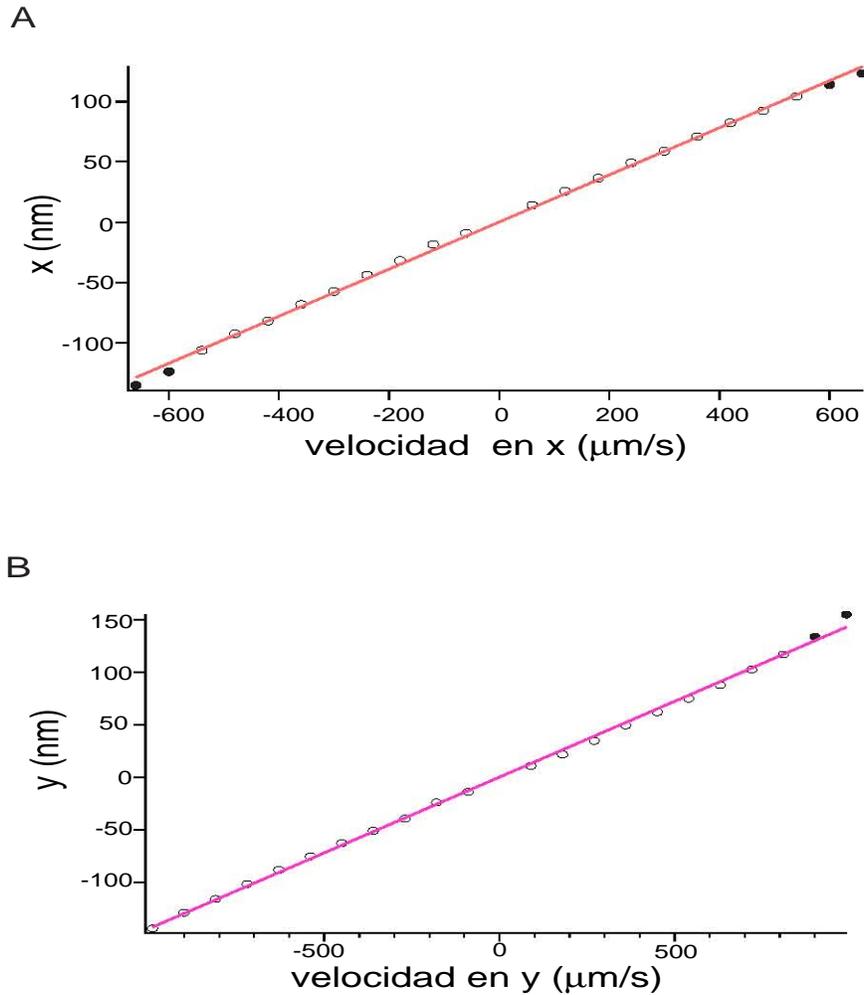


Figura 3.23: Región lineal de la trampa Los círculos en blanco representan los datos que se consideraron para determinar el tamaño de la región lineal. Del valor de la pendiente se puede obtener el valor de la constante de rigidez. Para estos dos ajustes tenemos un valor de $0.035 \text{ pN}\cdot\text{nm}^{-1}$ y $0.047 \text{ pN}\cdot\text{nm}^{-1}$ respectivamente en A y en B, suponiendo que la viscosidad del fluido en el que están las esferas es igual a la viscosidad del agua. A) La región lineal de la trampa en la dirección x es de 210 nm. B) La región lineal de la trampa en la dirección y es de 258 nm

Capítulo 4

Propiedades elásticas del ADN

4.1. El ADN en la biología

El ADN está formado por dos cadenas de ácidos nucleicos entrelazadas en una doble hélice. La unidad estructural que forma a los ácidos nucleicos son los nucleótidos. A su vez, cada nucleótido está formado por una molécula de azúcar (que en el caso del ADN es una desoxirribosa y para el RNA es una ribosa), una base nitrogenada y un grupo fosfato.

Los nucleótidos se unen entre sí por medio de enlaces fosfodiéster entre el carbono 5' y 3' de dos moléculas consecutivas de azúcar. Esta estructura de azúcares y fosfatos forma el esqueleto del ADN y tiene la propiedad de estar cargado negativamente (gracias a la carga del grupo fosfato) y de ser hidrofílico, por lo que se acomoda en el exterior de la molécula de ADN. Al centro del esqueleto, unido al carbono 1' del azúcar, se encuentran las bases nitrogenadas, que por lo general son Adenina (A), Timina (T), Guanina (G) y Citosina (C). Las dos cadenas del ADN se unen entre sí gracias a la complementariedad entre las bases nitrogenadas: la Adenina forma dos puentes de hidrógeno con la Timina, mientras que la Guanina forma tres puentes de hidrógeno con la Citosina [43].

La distancia entre dos bases nitrogenadas consecutivas en una cadena de ADN

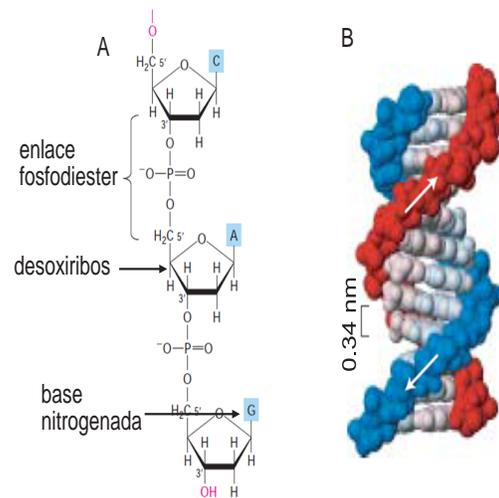


Figura 4.1: Estructura del ADN.A) El esqueleto de una molécula de ADN está formado por azúcares unidas por enlaces fosfodiéster, y la unión entre las dos cadenas se da por medio de las bases nitrogenadas. B) Para un ADN tipo B la distancia entre las bases nitrogenadas que se ha medido por cristalografía de rayos X es de 0.34 nm.

típica¹ se conoce desde 1953, año en el que Watson y Crick interpretaron el patrón de difracción del ADN tomado por Rosalind Franklin, y propusieron un modelo de doble cadena en forma de hélice [39], donde la distancia entre dos pares de bases es de 0.34 nm (Figura 4.1).

Las diferentes secuencias de estas cuatro bases nitrogenadas codifican toda la información necesaria para formar las proteínas y biomoléculas que componen y mantienen vivo a un organismo. El dogma central de la biología molecular establece que hay dos procesos intermedios entre tener la información almacenada en el ADN y tener una proteína formada: 1) La transcripción y 2) La traducción.

La *transcripción* es llevada a cabo por una proteína llamada ARN-polimerasa, la cual reconoce y se une a una secuencia específica en una de las cadenas de ADN llamada promotor. Después de unirse al ADN, la ARN-polimerasa comienza a translocarse a lo largo del ADN y va formando una cadena de ácidos nucleicos de ARN, que tiene las bases complementarias a la cadena de ADN sobre la que se unió² (Figura

¹Existen tres tipos de ADN A, B y Z. Pero en condiciones normales el ADN se encuentra en forma B.

²En el caso del ARN la base nitrogenada Citosina es sustituida por Uracilo

4.2A). La cadena de ARN puede tener una función en sí misma (ribozimas) o bien puede ser *traducida* del código de bases nitrogenadas al código de aminoácidos por un ribosoma, produciendo una secuencia de aminoácidos que al plegarse formen una proteína.

Para un organismo vivo es vital tener un estricto control sobre la información que es extraída del ADN. Por ejemplo: todas las células de un organismo contienen la misma información genética; sin embargo, no todas están produciendo todas las proteínas para las cuales tienen información, pues sería un gasto tremendo de recursos y no permitiría tener células diferenciadas (entre otras cosas). Las células del pulmón y las células del riñón tienen la misma información, pero gracias a procesos de regulación cada una de estas células produce un conjunto diferente de proteínas que le permiten realizar su función. Lo interesante es que muchos de los mecanismos de regulación del ADN a nivel transcripcional se basen en las propiedades elásticas de una molécula de ADN.

Para que la ARN-polimerasa pueda extraer la información del ADN es necesario que tenga acceso a la secuencia del promotor, de modo que algunos de los mecanismos de regulación génica a nivel transcripcional dependen de la tasa de compactación del ADN. *In vivo*, todo el ADN de un organismo se encuentra en diferentes grados de compactación. A la cromatina (todo el ADN más las proteínas que se unen al ADN) compactada y que no presenta actividad transcripcional se le llama heterocromatina mientras que las regiones de cromatina relajada y transcripcionalmente activa se le llama eucromatina. La compactación del ADN es un proceso dinámico donde las regiones de eucromatina y heterocromatina se pueden alternar (Figura 4.2B).

Los altos niveles de compactación que alcanza el ADN también son importantes para poder almacenar toda la información genética en pequeños compartimentos como son el núcleo de una célula eucarionte o la cápside de un virus. Por ejemplo, para el cromosoma humano más pequeño, la secuencia de ADN totalmente extendida mide ≈ 1.4 cm y durante la mitosis se compacta y forma un cromosoma que mide solo $2 \mu\text{m}$ de longitud. Resulta interesante saber qué fuerza es necesaria para alcanzar los niveles de compactación presentes en una célula o virus ya que en ocasiones el empaquetamiento es llevado a cabo por un motor molecular [40], y por otro lado cómo la molécula de ADN soporta estos niveles de compactación sin sufrir deformaciones irreversibles de modo que sigan siendo funcionales transcripcionalmente una vez que la molécula se relaja.

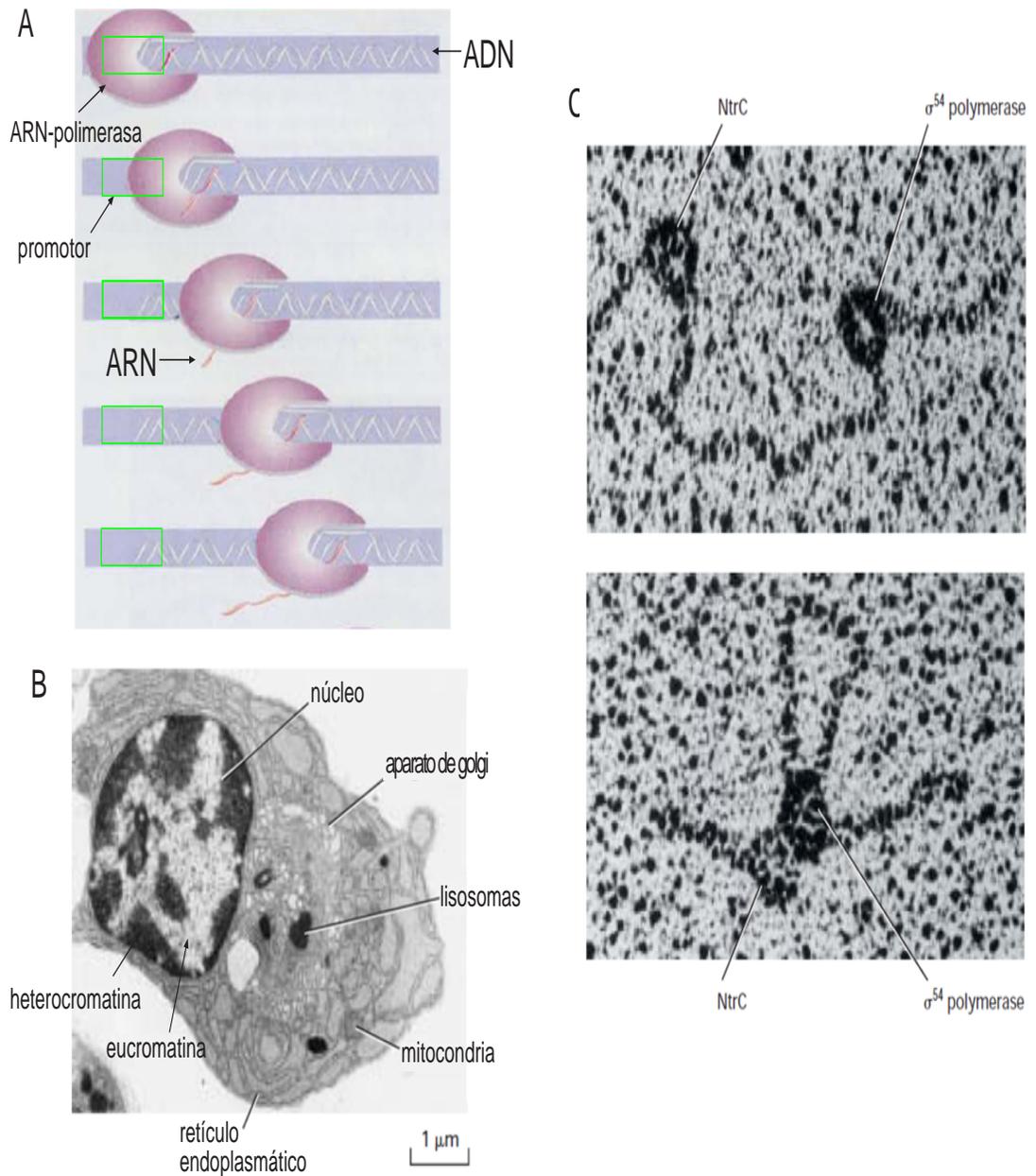


Figura 4.2: La transcripción y algunos mecanismos para su regulación. A) Se esquematiza el proceso de transcripción. B) Es una micrografía electrónica de la cromatina, se señalan las regiones de la heterocromatina y de la eucromatina. C) Arriba: Micrografía electrónica de una cadena de ADN, en un extremo tiene unida la ARN-polimerasa de procariontes y en el otro una proteína potenciadora llamada NtrC. Abajo: Se ve como el ADN se dobla y ambas proteínas entran en contacto. *Imágenes tomadas de la referencia [43].*

Otro mecanismo de control de la transcripción se da con los potenciadores, éstas son regiones de la molécula de ADN, alejadas del promotor, que reclutan proteínas llamadas potenciadoras. Gracias a que el ADN es flexible, la ARN-polimerasa unida al promotor queda en contacto con las proteínas activadoras las cuales, como su nombre lo indica, activan la transcripción (Figura 4.2C).

Desde el punto de vista puramente físico, estudiar las propiedades elásticas del ADN *in singulo* permite poner a prueba los diferentes modelos teóricos que describen polímeros biológicos de la mayor importancia.

4.2. El ADN como polímero

Un polímero es una macro molécula formada por la unión de moléculas más pequeñas llamadas monómeros; de modo que el ADN de doble cadena cumple con ser un polímero, si consideramos que los monómeros que lo conforman son los pares de nucleótidos con bases nitrogenadas complementarias. Una forma de caracterizar las propiedades elásticas de un polímero se obtiene midiendo las deformaciones y cambios en la extensión en respuesta a una fuerza externa. La fuerza externa es compensada por una fuerza elástica interna en el polímero.

En general, la curva fuerza-extensión de un polímero presenta 4 regiones: 1) Un régimen lineal para extensiones y fuerzas pequeñas, 2) Una región de deformación elástica, donde al hacer la fuerza externa cero el polímero regresa a su forma original, 3) Una región de deformación plástica en donde al liberar el polímero este no recupera su forma original, y 4) Finalmente, se presenta un punto de ruptura. Diferentes modelos se han propuesto para explicar las propiedades elásticas de los polímeros, y la mejor forma de saber qué tan bueno es un modelo es probar si el modelo se ajusta a los datos experimentales, de ahí la importancia de poder tener una curva fuerza extensión para **una** sola molécula de ADN.

El modelo mas simple, llamado de *cadena libre* supone que el polímero está formado por n segmentos de longitud b , siendo la longitud total o de contorno $L_c = nb$. En el caso del ADN la L_c se obtiene al multiplicar el número de pares de bases que contiene la cadena por 0.34 nm, que es la distancia entre ellos. En este modelo cada uno de estos segmentos puede orientarse en cualquier dirección, se considera que entre los segmentos no hay interacciones y que los segmentos son

inextensibles.

En 1992, Bustamante y colaboradores [16] lograron medir la curva de fuerza extensión de una sola molécula de ADN de doble cadena utilizando una pinzas magnéticas. A los resultados que obtuvieron se les ajustó el siguiente modelo de cadena libre con segmentos de tamaño b inextensibles:

$$F = \frac{k_B T}{b} L^{-1} \left(\frac{\langle x_{ADN} \rangle}{L_c} \right) \quad (4.1)$$

donde F es la fuerza externa que se aplica, T es la temperatura del baño térmico en el que se encuentre la molécula, k_B es la constante de Boltzmann, L es la función de Langevin³ y x_{ADN} es la distancia entre los extremos del polímero (su extensión). En este modelo mientras mas grande sea b mayor es la rigidez del polímero. Lo que se encontró es que este modelo no se ajusta a los datos experimentales.

Un nuevo modelo fue propuesto en 1995 por John Marko y Erick Siggia: el modelo de gusano inextensible. En este modelo se supone que el polímero es un rodillo delgado, continuo e inextensible [42], cuya curva de fuerza-extensión se ajusta a:

$$F = \left(\frac{k_B T}{L_p} \right) \left[\frac{1}{4(1 - x_{ADN}/L_c)^2} - \frac{1}{4} + \frac{x_{ADN}}{L_c} \right] \quad (4.2)$$

los parámetros del modelo son la longitud de persistencia (L_p) y la longitud de contorno (L_c); mientras mayor es L_p mayor es la rigidez del polímero.

La longitud de persistencia (L_p) describe la resistencia de un polímero a ser deformado por la acción de las fuerzas térmicas del baño en el que está inmerso, y es la longitud a la cual el doblamiento debido a las fuerzas térmicas es apreciable [25]. Se establece el valor de L_p como la distancia a la cual los ángulos tangentes (θ_s) a la trayectoria del polímero(s) se encuentran descorrelacionados (Figura 4.3)

$$\langle \cos(\theta_s(s) - \theta_s(0)) \rangle = \exp \left(\frac{-s}{2L_p} \right). \quad (4.3)$$

Cuando los ángulos θ_s están descorrelacionados la diferencia entre ellos es cualquier valor entre 0 y 2π , de modo que el promedio temporal se hace cero. Del otro lado de la igualdad tenemos que cuando los ángulos estén descorrelacionados será porque la distancia entre los extremos es mayor que la longitud de persistencia $s \gg L_p$.

³La función de Langevin se define como $L(x) = \coth(x) - \frac{1}{x}$

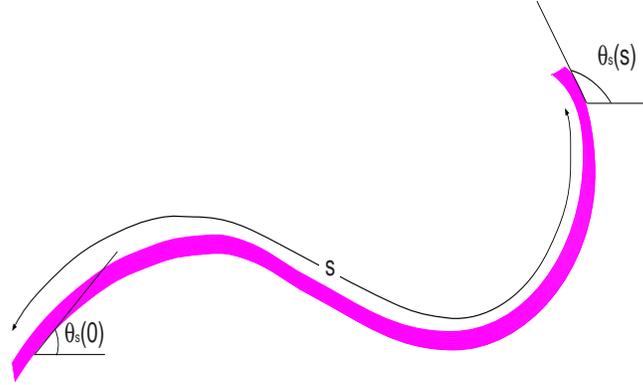


Figura 4.3: Longitud de persistencia. La longitud de persistencia es la distancia a la cual los ángulos tangentes se encuentran descorrelacionados

En 1997, Block y colaboradores [14] midieron la curva de fuerza extensión del ADN de doble cadena utilizando una pinza óptica, y ajustaron diferentes modelos a los datos. Encontraron que el modelo de gusano inextensible (Ecuación 4.2) se ajusta bien a los datos para fuerzas por debajo de los 10 pN.

En ausencia de fuerzas, ambos modelos (el de cadena libre inextensible y el de gusano inextensible) pueden reescribirse en términos de los mismos parámetros [25]. La longitud de contorno es la misma en ambos casos, y $2L_p = b$. Cuando el tamaño del segmento b se da en términos de la L_p se le llama segmento de Kuhn.

En los dos modelos presentados aquí se considera que el polímero se estira en forma reversible, de modo que se puede aplicar la segunda ley de la termodinámica,

$$dU = \delta W + TdS \quad (4.4)$$

donde U es la energía interna del polímero, W es el trabajo mecánico que el polímero puede realizar y es el producto de la fuerza elástica que puede ejercer el polímero por un desplazamiento⁴, T la temperatura y S la entropía. Vemos que la fuerza elástica que el polímero puede ejercer tiene dos fuentes: una entrópica y otra debido al cambio en la energía interna.

Para una cadena **deformable** elásticamente⁵ parte de la fuerza externa aplica-

⁴Para el caso de resortes lineales esta fuerza elástica cumple la ley de Hooke

⁵La deformación debe ser elástica para que el proceso de estiramiento sea reversible

da para tensar el polímero se almacena en forma de energía potencial elástica que aumenta la energía interna del polímero. En este caso la fuerza elástica del polímero tiene una contribución entrópica y otra por la energía interna. Un polímero **no deformable** inmerso en un baño térmico también puede realizar trabajo, pero en este caso es solamente entrópico, ya que el cambio en la energía interna es cero, y se debe a que las moléculas del baño térmico al chocar con el polímero lo llevan de un microestado a otro. Si la distancia x_{ADN} es máxima (con todos los segmentos que conforman al polímero orientados en la misma dirección), entonces cualquier choque de una partícula del baño con el polímero lo llevará a un nuevo microestado donde la distancia x_{ADN} ya no es máxima. Si la distancia x_{ADN} es pequeña los nuevos microestados, producto de las fuerzas térmicas, también son compatibles con el macroestado. De modo que el polímero visita un mayor número de microestados compatibles con el macroestado y tienen una mayor entropía. La fuerza elástica que puede ejercer la liga se debe a que intenta ir a un macroestado de mayor entropía.

Los modelos de las ecuaciones 4.2 y 4.1 consideran un polímero inextensible donde la fuerza elástica es puramente entrópica. Correcciones al modelo de cadena libre que consideran un segmento deformable fueron hechas en 1996 por Bustamante [15] logrando un ajuste del modelo con los datos. También se han propuesto modelos de gusano que consideran un rodillo deformable, extendiendo el rango de fuerzas donde el modelo se ajusta a los datos [14].

A la fecha se han identificado 4 regímenes de fuerza-extensión para moléculas individuales de ADN de doble cadena [41]:

1. El régimen de elasticidad entrópica. Donde el modelo de gusano inextensible (Ecuación 4.2) es una buena descripción pero sólo para fuerzas menores a 10 pN.
2. El régimen de elasticidad intrínseca. Para fuerzas mayores a 10 pN la distancia x_{ADN} se hace mayor a la longitud máxima esperada L_c , indicando que a éstas fuerzas la estructura química del ADN es alterada y la respuesta elástica no es puramente entrópica. Una vez que la molécula es liberada regresa a su estado original sin deformaciones. En este caso los modelos que mejor se ajustan a los datos son los que consideran deformable elásticamente al polímero.
3. Transición de superestiramiento. Cuando se aplican fuerzas de 65 pN o más hay un cambio brusco en la longitud de la cadena aumentando en un 70 % de L_c . Hasta el momento no hay un modelo teórico que contemple esta transición.

4. Ruptura de los enlaces covalentes. Para fuerzas por arriba de los 300 pN la cadena de ADN se rompe de manera permanente.⁶

Hasta la fecha, no se ha reportado una fase de deformación plástica en el ADN, pues pasa de una región de deformación elástica a un punto de ruptura.

En ninguno de los modelos que se han mencionado se considera en forma explícita que la molécula de ADN es una molécula cargada negativamente; estas cargas modifican las propiedades elásticas y el grado de compactación que el ADN puede tener, debido a la repulsión entre ellas. *In vivo*, proteínas cargadas positivamente, como la histonas, se unen al ADN apantallando su carga negativa evitando la repulsión y permitiendo un mayor grado de compactación. La concentración de iones de la solución en la que esta inmersa la cadena de ADN también modifica sus propiedades elásticas, pues los iones apantalla la carga negativa de la cadena. En la Figura 4.4 se resumen los valores reportados para la L_p para una molécula de ADN con diferentes concentraciones de iones [14] [38].

De los datos reportados se ve que aún cuando los modelos no contengan en forma explícita el efecto de tener un polímero cargado, la longitud de persistencia sí refleja este efecto: mientras mayor sea la concentración de iones en la solución, mayor es el apantallamiento de la carga y el valor de la L_p disminuye.

⁶Los valores reportados de la fuerza necesaria para romper un enlace covalente van desde 300 pN hasta 1700 pN, dependiendo del método por el cual se midió [41].

Concentración NaCl mM	L_p , nm (modelo de gusano inextensible)	Composición del Buffer	L_p , nm (modelo de gusano inextensible)
1.86	96.3 +/- 4.8	10 mM Na ⁺ (NaHPO ₄ buffer, pH 7.0)	47.4 ± 1.0 (14)
3.72	70.4 +/- 3.6	150 mM Na ⁺ , 5 mM Mg ²⁺ (NaHPO ₄ buffer, pH 7.0)	43.1 ± 1.3 (5)
5.58	60.5 +/- 3.4	10 mM Na ⁺ , 100 μM spermidine (NaHPO ₄ buffer, pH 7.0)	38.7 ± 1.0 (8)
7.44	47.9 +/- 3.0	20 mM Tris, 130 mM K ⁺ , 4 mM Mg ²⁺ (PTC buffer, pH 8.0)	41.0 ± 0.8 (15)
9.30	62.1 +/- 8.3	20 mM Tris, 130 mM K ⁺ , 4 mM Mg ²⁺ (PTC buffer, pH 8.0)	42.1 ± 2.4 (4)
18.6	52.3 +/- 5.4		
93.0	43.8 +/- 1.4		
189	56.2 +/- 3.1		
589	45.1 +/- 2.1		

Figura 4.4: Valores reportados para la Longitud de Persistencia. Datos tomados de las Referencias [38] [14]

Capítulo 5

Medición de la longitud de persistencia y de la longitud de contorno de una molécula de ADN

De las tres posibles configuraciones para obtener una curva de fuerza extensión de una molécula de ADN presentadas en la Figura 3.2 del Capítulo 3, optamos por atar la molécula entre la superficie del vidrio y una esfera atrapada por la pinza óptica. La muestra se colocó sobre la platina piezoeléctrica, y la posición del láser se mantuvo fija en los experimentos presentados en este capítulo.

La distancia entre los extremos del ADN (x_{ADN}) aumenta a medida que la platina piezoeléctrica se desplaza, pues sobre la platina se encuentra la muestra con uno de los extremos del ADN unido a la superficie mientras que el otro extremo se encuentra atado a la esfera atrapada por la pinza óptica. Cuando la platina se ha desplazado lo suficiente como para extender por completo la molécula de ADN, la esfera que se encuentra atrapada en la trampa -que hasta este momento había permanecido en su posición de equilibrio (x_0, y_0, z_0) - empieza a ser jalada por la molécula de ADN unida al vidrio de la muestra. El cambio en la posición de la esfera (x, y, z) es detectado por el FDP.

A partir de la posición de la platina (x_p, y_p, z_p) , la señal del FDP (V_x, V_y, V_z) , los factores de conversión de volts a nm (F_{cx}, F_{cy}, F_{cz}) y la rigidez de la trampa k_{trampa} en cada dirección (X, Y, Z) , se determinó la fuerza ejercida en función de la

extensión del ADN.

5.1. Implementación del ensayo molecular

Para lograr la configuración molecular deseada es necesario tener algún mecanismo por el cual un extremo del ADN pueda unirse al vidrio y el otro extremo a la esfera. Una opción es amplificar un fragmento de ADN de tamaño conocido por medio de una Reacción en Cadena de la Polimerasa (conocida como PCR por sus siglas en inglés). La idea de esta técnica es partir de una concentración baja de ADN y amplificar ¹ un fragmento específico de la molécula simulando el proceso de replicación del ADN .

Esta técnica utiliza una proteína llamada ADN-polimerasa, que a partir de una cadena sencilla de ADN (cadena molde) produce una segunda cadena complementaria. Una PCR empieza con una concentración baja de ADN de doble cadena; aumentando la temperatura estas cadenas se separan (etapa de desnaturalización) quedando dos cadenas sencillas de ADN. Para que la ADN-polimerasa pueda funcionar, necesita empezar a sintetizar la cadena complementaria a partir de un fragmento de ADN de doble cadena, por lo que es necesario introducir fragmentos de ADN (comúnmente llamados oligos) de ≈ 20 pb de longitud, estos se unen a la cadenas sencillas por complementariedad de bases (etapa de alineamiento) y son empleados como el sustrato necesario para que la ADN-polimerasa sintetice la doble cadena (etapa de elongación). Para la etapa de elongación también es necesario que se añadan a la reacción los nucleótidos que recluta la ADN-polimerasa para sintetizar la cadena complementaria. Estas tres etapas se repiten en ciclos de modo que al final de cada ciclo, aumenta el número de moléculas de ADN de forma exponencial [43].

Los fragmentos de ADN que se amplifican se encuentran enmarcados por los oligos que se añadan. Estos oligos pueden tener *modificaciones en sus extremos*, de modo que al final tendremos amplificado un fragmento de ADN de doble cadena de tamaño conocido y con modificaciones en sus extremos (Figura 5.1).

Como ya se mencionó, la longitud de contorno L_c del ADN se puede estimar si se conoce el número de pares de bases que componen la cadena. En nuestro caso,

¹En este contexto amplificar es aumentar la cantidad de moléculas de ADN.

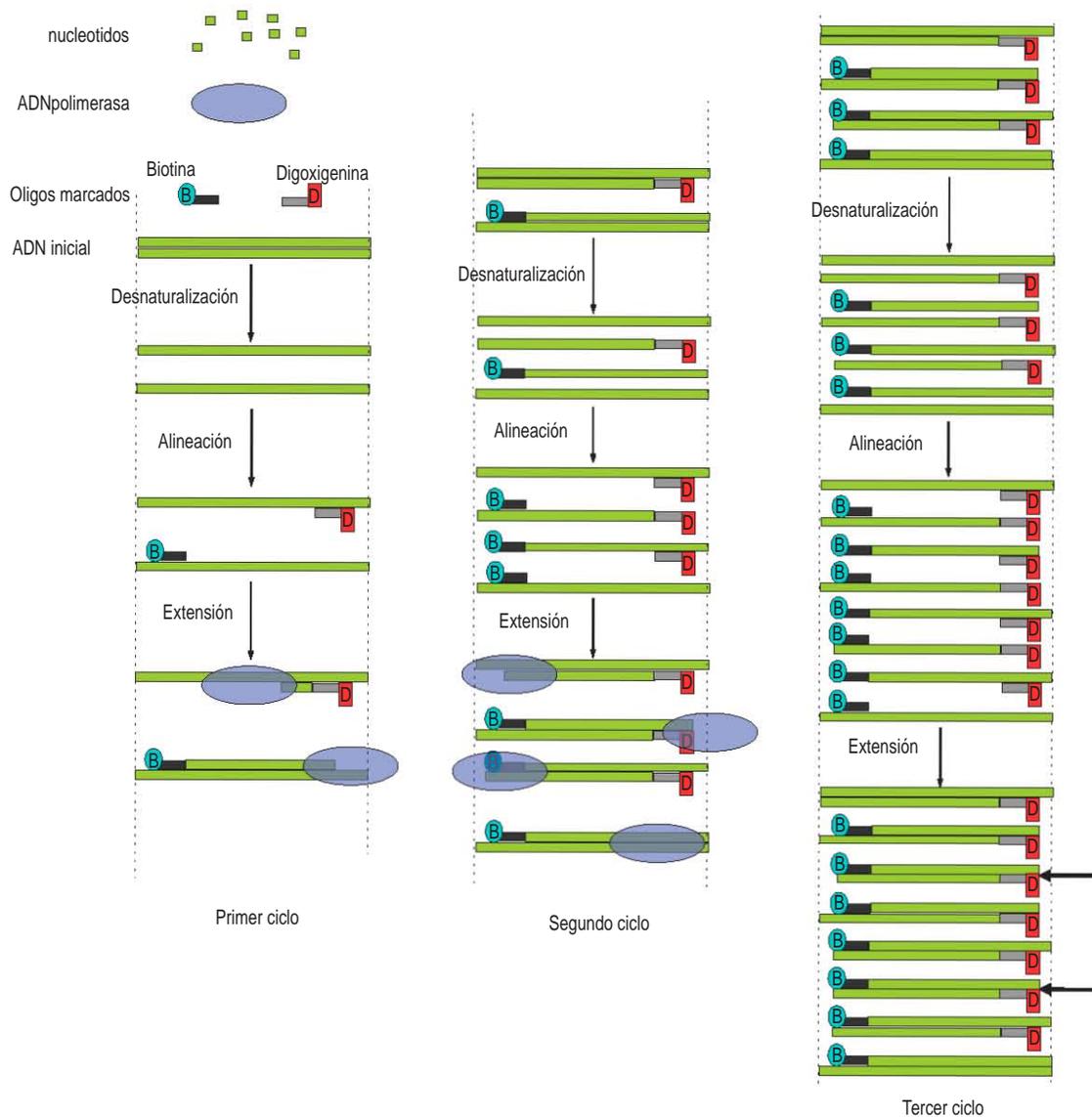


Figura 5.1: Reacción en Cadena de la Polimerasa En el esquema se muestran los tres primeros ciclos del proceso de amplificación para una molécula de ADN. Para regular el paso de una etapa a otra se modifica la temperatura: La etapa de desnaturalización se lleva a cabo a 94°C y dura 30 s, la etapa de alineación dura 30 s, y la temperatura depende de la secuencia de los oligos (se encuentra entre 50 y 60°C). La temperatura en la etapa de elongación es de 72°C y se deja 1 minuto por cada kb que mida el fragmento que se quiere amplificar. La reacción se lleva a cabo durante 25 a 30 ciclos. A partir de tercer ciclo se tienen los primeros fragmentos de ADN enmarcado por los dos oligos marcados (señalados con flechas horizontales). A partir de este ciclo la población de estas moléculas empieza a crecer exponencialmente y al terminar los ciclos su población excederá por mucho a la población de otras moléculas. Por claridad, en el ciclo 3 no se muestra la ADN-polimerasa, pero al igual que en todos los ciclo la ADN-polimerasa sintetiza la segunda cadena.

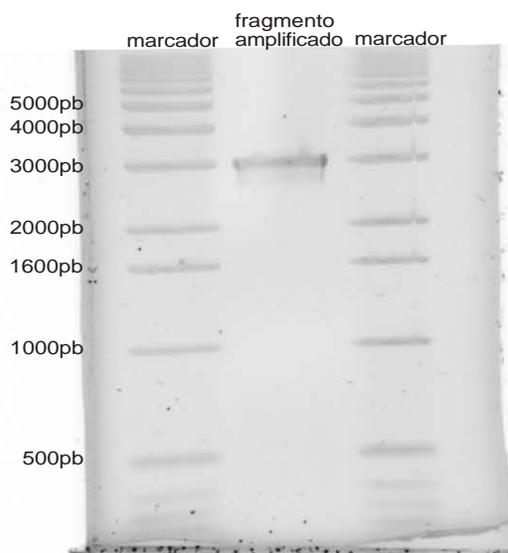


Figura 5.2: Gel de agarosa para verificar el tamaño del producto de la PCR
El producto de la PCR da una sola banda de que mide ≈ 3 kb

los oligos se diseñaron para enmarcar una región de 3068 pb. Para verificar que efectivamente se amplificó únicamente un fragmento de ese tamaño se realizó una electroforesis en gel. Para esto, se colocaron $3 \mu\text{l}$ del producto final de la PCR en uno de los pozos de un gel de agarosa al 1.5% (peso/volumen), y en los pozos adyacentes se colocó un marcador de peso molecular. Este marcador está formado por fragmentos de ADN de tamaño conocido.

Comparando la posición de los fragmentos de ADN del marcador con la posición del fragmento de ADN que se amplificó, se puede estimar el tamaño de éste último (Figura 5.2). Para observar las bandas de ADN mostradas en la Figura 5.2, el gel se sumerge en una solución de Bromuro de Etidio, el cual se intercala entre las moléculas de ADN y emite una luz roja-anaranjada cuando se expone a luz ultravioleta. En la Figura 5.2 se puede ver que sólo se amplificó un fragmento de ≈ 3 kb (3000 pares de bases), la resolución de este gel no es suficiente como para detectar la diferencia entre 3000 pb y 3068 pb. Todas las nuevas cadenas de ADN que se formaron durante la PCR tienen incluidas las dos modificaciones de los oligos. En nuestro caso, uno de los extremos se colocó una molécula de biotina y en el otro extremo se colocó una molécula de digoxigenina. Finalmente, se remueven los reactivos de la PCR (oligos, ADNpolimerasa, nucleótidos y sales) y se recupera solo el ADN. Para esto se usó

el Kit de purificación de Promega.

Las moléculas de biotina se unen en forma no específica pero covalente a las moléculas de avidina, así que usando esferas de poliestireno (de 730 nm de diámetro) recubiertas de avidina se logró atar uno de los extremos del ADN. El otro extremo se ató por medio de una proteína que reconoce específicamente a la digoxigenina (anticuerpo-antidigoxigenina) y que se une de manera no específica a la superficie de vidrio de la muestra. Una vez que el anticuerpo se ha unido a la superficie de vidrio es recomendable bloquear los sitios libres de proteína, para evitar que las esferas se peguen al vidrio de manera inespecífica. Para bloquear la superficie se usa un fragmento de la proteína Albumina Sérica Bovina (BSA por sus siglas en inglés).

El anticuerpo, la BSA, el ADN marcado en sus extremos y las esferas recubiertas de avidina se fluyen en una muestra que tiene un canal de ≈ 0.5 cm de ancho. Este canal se construyó pegando cinta Scotch de doble cara sobre un portaobjetos y después se colocó un cubreobjetos transversalmente. El ensayo que se obtiene se esquematiza en el Figura 5.3. Como la interacción entre el anticuerpo anti-digoxigenina y el vidrio es no específica, es importante contar con una superficie del cubreobjetos limpia. Para eso se usó un "Plasma Cleaner" (Harrick Plasma), el cual realiza un proceso de limpieza por medio de un plasma que levanta la primer capa de moléculas orgánicas sedimentadas sobre la superficie de vidrio del cubreobjetos y deja una carga negativa superficial. Esto ayuda a que el anticuerpo se adhiera al vidrio.

Es importante señalar que a nosotros nos interesan las esferas que tengan unida una y solo una molécula de ADN. Para aumentar la probabilidad de tener ese evento se probaron diferentes concentraciones de esferas y de ADN. El protocolo que se optimizó para obtener una construcción como la mostrada en la Figura 5.3 se puede consultar en el Apéndice A. Uno de los puntos importantes del protocolo es que la solución en la cual queda suspendido el ADN tiene una $[Na^+] = 100$ mM. Esto es importante pues, como se mencionó en el Capítulo 4 la concentración de iones es un parámetro que modifica la longitud de persistencia del ADN.

5.2. Obtención de Datos

Colocada la muestra en el dispositivo experimental (Figura 3.1), lo primero que se hizo fue obtener una calibración de la respuesta del FDP con alguna de las esferas

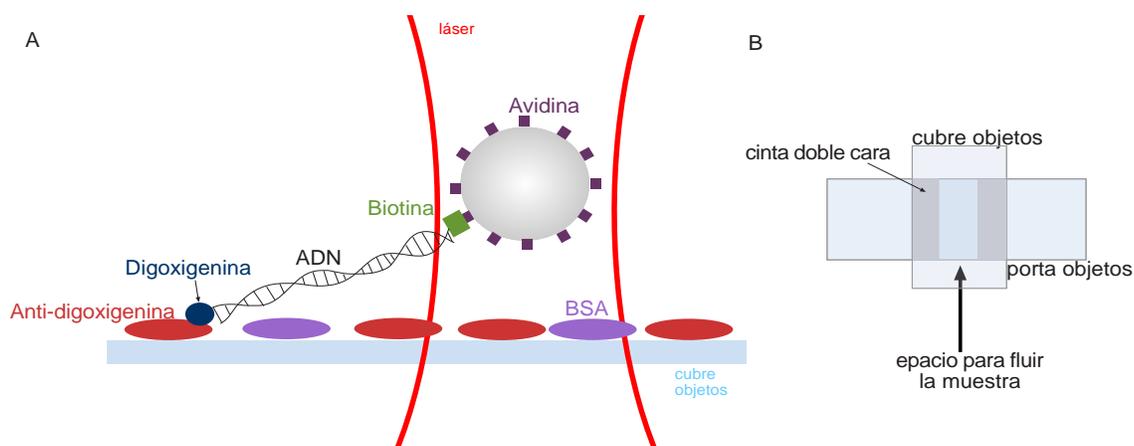


Figura 5.3: Ensayo molecular A) Se esquematiza la construcción molecular para atar los extremos de una molécula de ADN a una esfera y al vidrio de la muestra. B) Se esquematiza el canal formado por un cubre y un portaobjetos, a través de este canal se fluyeron las moléculas en solución necesarias para obtener el ensayo mostrado en A).

(que a pesar del bloqueo con BSA) se logró pegar a la superficie. La calibración del FDP se hizo para 10 esferas diferentes y se tomó como factores de calibración (F_{cx} , F_{cy}) el promedio de las 10 mediciones. Después, se obtuvo la rigidez de la trampa a 300 nm de la superficie usando esferas que no se unieron al ADN, es decir, que quedaron en solución. La rigidez de la trampa se obtuvo para 5 esferas diferentes usando los métodos de espectro de potencias y equipartición de la energía. El valor final que se tomó para la rigidez k_{trampa} , en cada dirección (x, y) , fue el promedio de las 5 mediciones con los 2 métodos. Los métodos de calibración se puede consultar en el Capítulo 3.

Una vez hecha la calibración, buscamos una esfera atada al vidrio por medio de una molécula de ADN. Para identificar estas esferas, se analizó visualmente su movimiento Browniano, seleccionando solo aquellas que se difundiesen dentro del volumen de una esfera cuyo radio fuese aproximadamente igual a la longitud de contorno de la molécula de ADN.

Lo siguiente fue *centrar la esfera*, de modo tal que el punto de unión del ADN al vidrio esté justo por debajo del centro de la esfera atrapada (Figura 5.4), para eso:

1. Se centró manualmente la esfera en la mancha del láser, esto se hizo moviendo

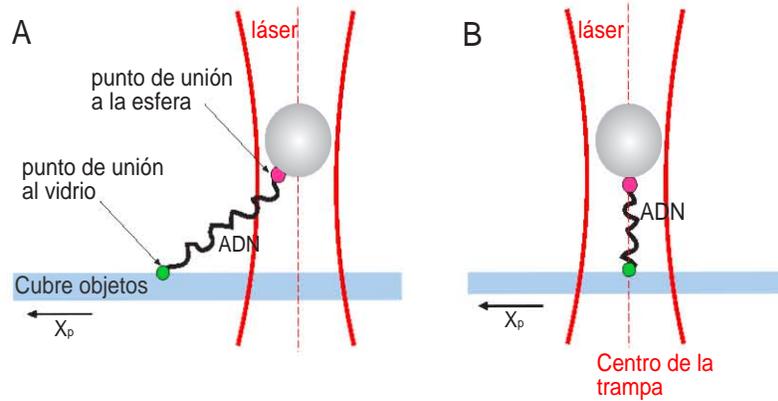


Figura 5.4: Alineación de la esfera y el ADN al centro de la trampa A) Se muestra una esfera que no fue centrada, al empezar a mover la platina la esfera empezara a moverse fuera de su posición de equilibrio x_0 . B) Se muestra una esfera centrada, la platina tendrá que desplazarse una distancia $\approx L_c$ antes de que la esfera empiece a moverse fuera de su posición de equilibrio.

la posición de la platina por medio de un joystick, la comunicación entre el joystick y la platina es a través de una rutina de LabView llamada "Joystick.vi". La esfera centrada en el haz es atrapada por la pinza óptica.

2. La esfera se ubicó a 500 nm de la superficie. A diferencia del procedimiento que se explicó en el Capítulo 3 para encontrar la superficie de la muestra en este caso la señal V_z que se obtiene al mover la platina en la dirección z_p presenta tres regiones: 1) Cuando la esfera, que está atada al vidrio por el ADN, se encuentra por debajo del punto de atrapamiento de la trampa. En ese caso la señal es similar a la de una esfera pegada al vidrio; 2) Cuando la esfera es atrapada por la pinza y la distancia entre la esfera y la superficie es menor a la L_c del ADN, la esfera se comporta como una esfera en solución; 3) Cuando la platina entra en contacto con la esfera atrapada por la pinza y empieza a empujarla. Ubicamos la posición de la superficie en el punto donde la platina empieza a empujar la esfera (Figura 5.5).
3. Se movió la platina un total de $1.5 \mu\text{m}$ (esta distancia corresponde al tamaño de la región lineal del FDP) en dirección x_p y $-x_p$ en pasos de 10 nm, registrando la señal del FDP después de dar cada paso. Puesto que la esfera se encuentra atada a la molécula de ADN, al mover la platina la esfera también es

jalada, modificando la señal del FDP V_x . Cada dato en la señal del fotodetector corresponde al promedio de 200 muestras tomados a una tasa de muestreo de 20000 Hz.

4. La gráfica de V_x en función de la posición de la platina x_p se ajustó a un polinomio de orden 7, de donde se puede estimar el punto de simetría de la función [14].
5. La platina se colocó en este punto de simetría. Se repitió el proceso de centrado (pasos 3, 4 y 5) dos veces más.
6. Se volvió a encontrar la superficie y se colocó la esfera a 50 nm por encima de la superficie .
7. Se volvió a centrar la esfera en dos ocasiones más: la primera con el fin de centrar por ultima vez la esfera. Cuando la señal era simétrica y la región plana era mayor a ≈ 2 micras se consideró que la esfera se encontraba bien centrada. La segunda vez que se centró la esfera se guardaron los datos en un archivo. En este archivo se guardó la posición de la platina x_p y la señal de FDP V_x . En la Figura 5.6 se muestra una traza típica resultante de este procedimiento.

En algunas ocasiones la esfera se quedaba pegada a la superficie del vidrio, lo cual nos indica que tenemos un error de alrededor de ≈ 50 nm en la estimación de la posición de la superficie, y que realmente la esfera se encontraba a ≈ 0 nm por encima de la superficie del vidrio. Esta medición se repitió para 63 moléculas de ADN diferentes, para cada molécula se obtuvieron dos trazas diferentes, una traza al mover la platina en dirección x_p y otra al moverla en dirección y_p .

El movimiento de la platina, la toma de datos, el ajuste del polinomio y la reubicación de la platina para centrar la esfera se hacen de forma automatizada por medio de una rutina programada en LabView "CenteringDNA.vi". Para encontrar la posición de la superficie se utilizó una rutina de LabView llamada "FindSurface-Height.vi".

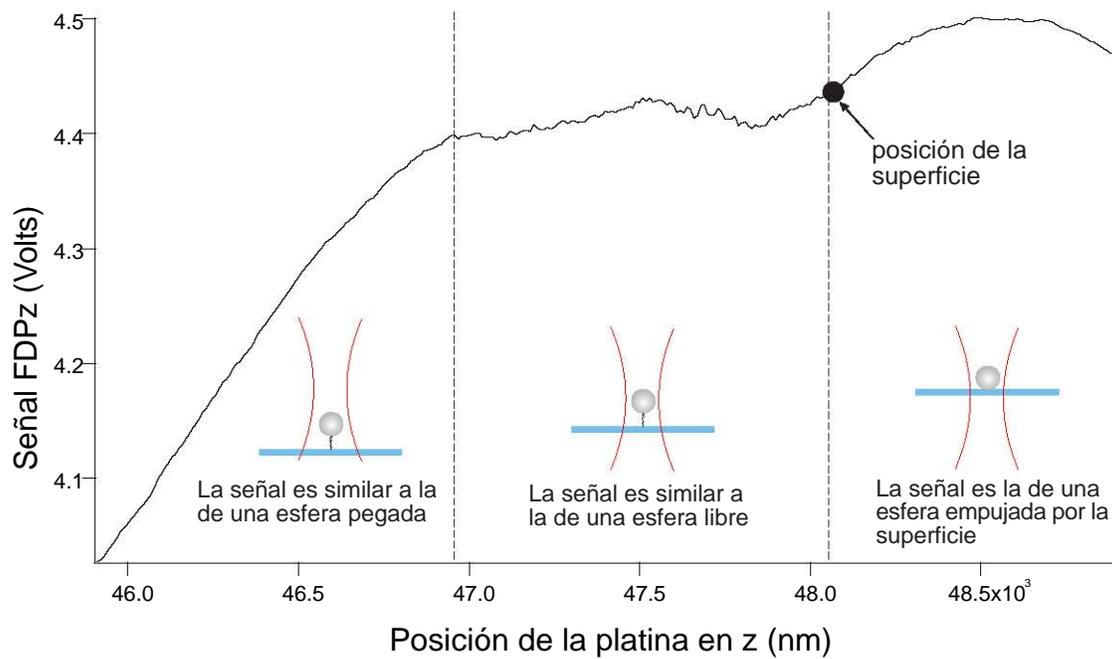


Figura 5.5: Ubicación de la superficie usando una esfera con ADN Se muestra la curva obtenida cuando la esfera tiene un ADN y movemos la platina en la dirección z_p

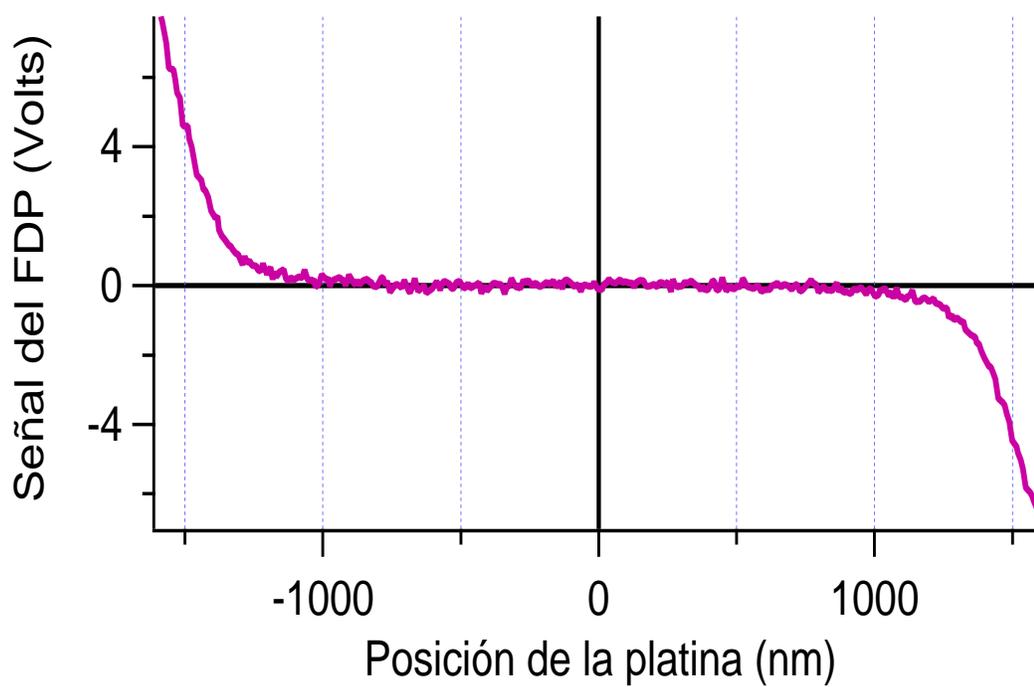


Figura 5.6: Señal de FDP en función de la posición de la platina Esta es una traza típica que se obtiene al estirar una sola molécula de ADN después de centrar la construcción molecular, ADN más esfera, con el centro de la trampa.

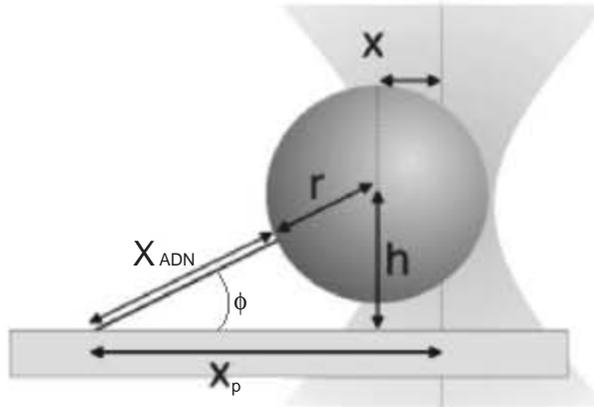


Figura 5.7: Esquema geométrico del ensayo molecular. En este esquema se muestra la relación geométrica entre la extensión del ADN (x_{ADN}), los parámetros que medimos y los parámetros que conocemos h y r . También se aprecia la relación entre la fuerza total y la componente de la fuerza en la dirección en la que se mueve la platina.

5.3. Análisis de los Datos

Del archivo de datos que se guardó al final del proceso de centrado se puede obtener la curva fuerza extensión, pero antes es necesario efectuar una serie de pasos para cada una de las curvas obtenidas:

1. Los datos obtenidos se partieron justo por el centro de la curva y los valores del tercer cuadrante se invirtieron respecto al eje “posición de la platina” y respecto al eje “señal del FDP” para poderlos superponer a los datos del primer cuadrante y concatenarlos todos
2. Utilizando los factores de conversión $F_c x$ y $F_c y$ la señal de voltaje del FDP (V_x, V_y) se convirtió en la posición de la esfera x, y .
3. Conociendo el desplazamiento (x, y) de la esfera y la rigidez de la trampa ($k_{trampa,x}, k_{trampa,y}$) se obtuvo la componente horizontal de la fuerza (F_x, F_y) con la que se estiró el fragmento de ADN para cada posición de la platina.
4. Para obtener los parámetros L_c y L_p necesitamos conocer la distancia entre los extremos de la molécula de ADN x_{ADN} ; ésta se puede obtener de la relación

geométrica (Figura 5.7) entre la posición de la platina x_p , la altura h a la que se encuentra la esfera, el radio de la esfera r y la posición de la esfera x [44]

$$x_{ADN} = \sqrt{h^2 + (x_p - x)^2} - r. \quad (5.1)$$

En nuestro caso observamos que la esfera se encuentra en contacto con la superficie, por lo que en este análisis siempre se tomó la altura h igual al radio de la esfera.

5. De igual forma, debido a la configuración del ensayo (Figura 5.7), la fuerza que se aplica sobre la cadena (y que se obtuvo en el paso 3) es solo una componente de la fuerza total F_T con la que se estira la molécula. La fuerza F_T tiene una componente tanto en la dirección en la que se mueve la platina (x_p) como en la dirección de propagación del láser (Z). De la geometría del ensayo se puede obtener el valor de F_T a partir de la fuerza de restitución de la trampa F_x que resulta de mover la platina en la dirección x_p [14]

$$F_T = \frac{F_x}{\cos \phi}. \quad (5.2)$$

6. La curva de fuerza extensión que caracteriza al ADN se obtuvo graficando F_T en función de la extensión x_{ADN} . Para asegurarnos de estar siempre dentro de la región lineal de FDP, sólo se consideraron los datos donde el valor de la fuerza esté por debajo de los 4 pN.
7. Se ajustó un modelo de gusano inextensible (Ecuación 4.2) a los datos y se obtuvieron los parámetros L_c y L_p . Una traza típica con el ajuste del modelo a los datos de la fuerza total F_T en función de la extensión del ADN x_{ADN} se muestra en la Figura 5.8.
8. Este tratamiento se hizo para las dos direcciones (x, y) en que se estiró cada una de las 63 moléculas, de modo que en total se obtuvieron 126 trazas.
9. Juntamos los parámetros L_p y L_c , obtenidos de ajustar el modelo de gusano (Ecuación 4.2) a las 126 trazas, en dos histogramas: uno para L_c y otro para L_p . Todos el manejo de datos se realizó por medio del programa de análisis estadístico IGOR. Los valores reportados de L_p y L_c corresponden al centro de la función Gaussiana, mientras que el error asociado se obtiene de la desviación estándar del ajuste. (Figura 5.9).

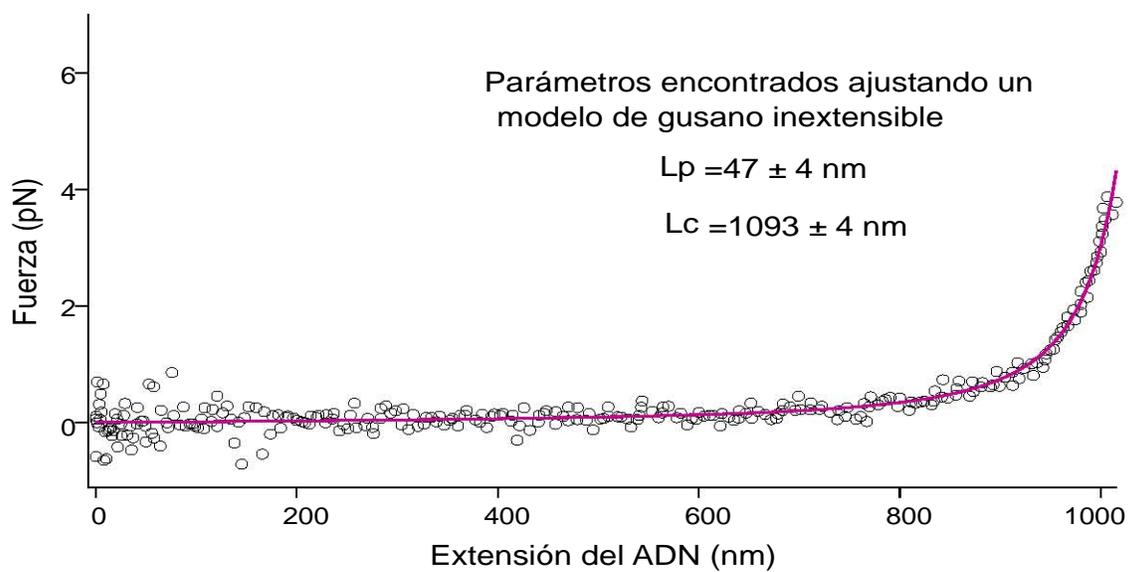


Figura 5.8: Curva de Fuerza Extensión del ADN Los círculos representan los datos obtenidos, la línea continua es el ajuste de los datos a un modelo de gusano inextensible.

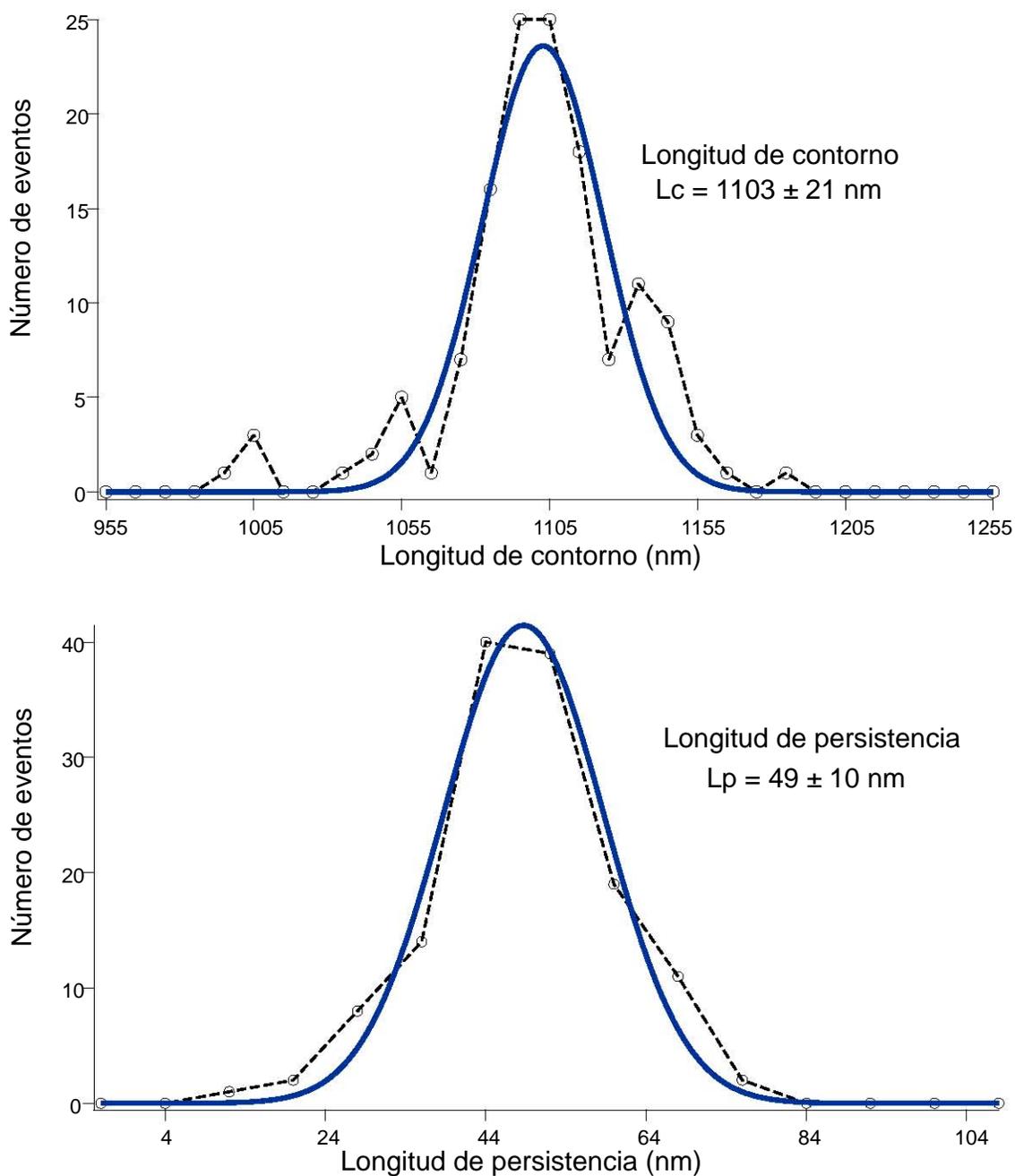


Figura 5.9: Valores medidos de L_c y L_p para 63 moléculas de ADN. Todos los parámetros L_p y L_c obtenidos de ajustar el modelo de gusano inextensible a cada una de las 126 trazas de las 63 moléculas de ADN se reunieron para obtener los histogramas mostrados. Para la L_c el ancho de la clase fue de 10, y para la L_p el ancho de la clase fue de 8. A los histogramas se les ajustó una función Gaussiana (línea azul).

Capítulo 6

Discusión y Conclusiones

Discutiré por separado cada uno de los 3 puntos centrales de este trabajo:

1. La construcción y calibración de la pinza óptica. Se construyó una pinza óptica que puede usarse para estudio *in singulo* de macro moléculas, gracias a que cuenta con una platina piezoeléctrica de resolución nanométrica, un MAO para controlar la posición e intensidad del láser que forma la trampa, y a que la razón señal a ruido es suficiente para efectuar los estudios planeados.

De las tres fuentes de ruido experimental que se caracterizaron, la variación de la potencia del láser, fue la única que tuvo que ser compensada por un sistema de retroalimentación, pues las variaciones medidas en la potencia del láser fueron del orden de entre 15 al 30 %, aunque el fabricante asegura que este modelo de láser debería tener una estabilidad en potencia del 4 al 6 %.

Posiblemente las fluctuaciones en la potencia se deban a la polarización del láser. El fabricante solo especifica que la luz del láser tiene una polarización lineal, pero no especifica que tan estable es la dirección de polarización. Los cambios en la dirección de polarización de la luz al pasar por la lámina retardadora $\lambda/2$ producen cambios en la magnitud de las componentes del campo que son separadas por el cubo polarizador (Figura 3.1).

Para la calibración de la trampa se obtuvo el factor de conversión de V a nm del FDP así como la distancia (≈ 300 nm) donde la relación V a nm es lineal. Se obtuvo que la región lineal de la trampa en la dirección X es de 210 nm y

en la dirección Y es de 258 nm. La constante de rigidez de la trampa se obtuvo por el método de equipartición de la energía y por el método del espectro de potencias. En un futuro podría integrarse a la pinza óptica un sistema para la detección de moléculas fluorescentes.

2. La medición de las propiedades elásticas del ADN. Las 126 trazas de fuerza extensión de la molécula de ADN se tomaron durante un período de 6 días diferentes. Debido a que las trazas obtenidas se reunieron en una misma estadística, es importante considerar la dispersión de los parámetros de calibración $((F_{cx}; F_{cy}; F_{cz}), (k_{trampa,x}; k_{trampa,y}; k_{trampa,z}))$ entre los diferentes días para determinar fuentes de error sistemático y estadístico en nuestros resultados. Primero, el factor de calibración del FDP de cada día corresponde a un promedio tomado sobre 10 esferas diferentes, y el error estadístico encontrado para cada día corresponde al 6 %. Diferentes factores contribuyen a esta dispersión de los datos, entre ellos el más claro es la variación en el tamaño de las esferas debido a que la muestra no es monodispersa. Este error estadístico se propaga a la incertidumbre en la estimación de la posición de la esfera (x, y) .

Luego, los valores de $(k_{trampa,x}, k_{trampa,y})$ obtenidos cada día corresponden al promedio de los valores obtenidos para 5 esferas tanto por el método de equipartición de la energía como por el método del espectro de potencias.

Debido a que los valores obtenidos a partir de la frecuencia de corte resultaron sistemáticamente más grandes que los valores obtenidos a partir de la amplitud de la función lorenziana ajustada al espectro de potencias y también del teorema de equipartición, se tiene un error sistemático en la determinación diaria de la rigidez del 30 %.

Para cada método de obtención de k_{trampa} , el error estadístico asociado con la diferencia entre los valores promedio de cada día es del 12 %.

Finalmente, el error sistemático de k_{trampa} se propaga junto con el error sistemático en la detección de la posición, para determinar el error sistemático en la fuerza. Como la fuerza es $F_x = k_{trampa,x}x$ o $F_y = k_{trampa,y}y$, su error relativo es la suma de los errores relativos de la rigidez del resorte y la posición de la esfera. La fuente más clara de error sistemático para la posición (x, y) , sería que el FDP se encontrase mal alineado respecto al láser. Como antes de cada medición nos aseguramos de que el láser estuviese centrado podemos considerar que la contribución de (x, y) al error sistemático de la fuerza es despreciable comparado con la contribución de k_{trampa} ; el error sistemático en la fuerza es

de 30 %. Este error afecta de manera directa el valor encontrados para L_p y en menor medida el valor de L_c .

En nuestros experimentos encontramos que la L_c de nuestras moléculas de ADN es de 1103 ± 21 nm, mientras que el valor esperado es de 1043 nm. Considerando que la longitud de contorno esperada aumenta unos ≈ 15 nm debido al tamaño de las moléculas usadas para unir el ADN entre el vidrio y la esfera atrapada [14], la diferencia de nuestra medición respecto al valor esperado es del ≈ 4 %. Una posible causa para este error es que la distancia entre nucleótidos que se está considerando es de 0.34 nm, este valor es correcto para un ADN cristalizado [39]. Es posible que la distancia entre dos pares de bases nitrogenadas en una molécula de ADN en solución cambie respecto a un cristal.

En cuanto a la longitud de persistencia de moléculas de ADN de doble cadena, podemos comparar el valor de L_p que nosotros obtuvimos, (49 ± 10) nm para una $[Na^+] = 100$ mM, con el valor reportado en la Referencia [38] de (43.8 ± 1.4) nm a $[Na^+] = 93$ mM. Si consideramos este valor reportado como el valor esperado, la diferencia con nuestra medición es del 10 %, sin embargo, los valores reportados en la Referencia [38] presentan una gran dispersión, y no podemos asumir que la diferencia de 7 mM en la concentración de iones no modificarían sensiblemente el valor de la longitud de persistencia.

Es posible que esta diferencia entre el valor medido y valor reportado más cercano a las condiciones experimentales que se usaron aquí se debe en parte al error sistemático del 30 % en la estimación de la fuerza. El valor de L_p depende inversamente de la fuerza de modo que la incertidumbre sistemática del 30 % en la fuerza se traduce en una incertidumbre sistemática del 30 %¹ en el valor medio de la distribución de L_p (Figura 5.9).

Por otra parte, la incertidumbre estadística de L_p corresponde al ancho de la distribución, y en nuestro caso es del 20 %. Este valor se podría disminuir aumentando el número de mediciones.

Finalmente, sumando por cuadraturas las incertidumbres sistemáticas y estadísticas, reportamos una incertidumbre del 36 % en la medición de L_p con nuestro sistema de pinzas ópticas.

3. Recordemos que la motivación para realizar este trabajo era tener una pinza

¹Considerando solo el error sistemático que la fuerza introduce al error sistemático en la medición, de modo que: $L_p = aF^{-1}$ con a constante, entonces $\delta L_p/L_p = 1\delta F/F$

óptica para el estudio *in singulo* de la cinesina, entre otras múltiples posibilidades. Para poder realizar estos estudios faltaría por un lado lograr el ensayo molecular y por otro lado necesitamos que las mediciones tengan una incertidumbre menor al 10 %. Para lograr esto debemos de disminuir el error sistemático en la estimación de la fuerza y deberemos de hacer mediciones sobre un número grande de moléculas para disminuir el error estadístico. Una vez logrado esto estaríamos listos para realizar las mediciones *in singulo* de la cinesina.

Las perspectivas inmediatas de este trabajo serán: realizando digestiones parciales, caracterizar la curva de fuerza extensión de una molécula de ADN con muescas en una de sus cadenas; y expresar la proteína cinesina para implementar el ensayo molecular.

Apéndice A. Protocolos

6.1. Obtención del ADN

Para poder caracterizar una cadena de ADN amplificamos por medio de una PCR un segmento de 3068 pares de bases con modificaciones en los extremos 5' de la cadena de nucleótidos. En el extremo 5' del oligo *forward* se añadió una molécula de biotina y en el extremo 5' del oligo *reverse* se añadió una molécula de digoxigenina. Para un volumen final de 25 μl se mezcló:

- 2.5 μl Buffer de PCR
- 2.5 μl Cloruro de Magnesio
- 0.5 μl Mezcla de nucleótidos ($dNTP_s$)
- 0.5 μl Oligo *reverse*
- 0.5 μl Oligo *forward*
- 1.0 μl Templado (ADN molde)
- 1.5 μl Polimerasa *Thermus aquaticus* (Taq polimerasa)
- 17.0 μl Agua MiliQ

Usando una termocicladora programable se realizaron 25 ciclos de amplificación con una temperatura de alineamiento de 58°C. Para desnaturalizar el ADN se aumento la temperatura hasta 94°C durante 5 minutos. Después de los 5 minutos el termociclador empieza a operar en ciclos. La primera etapa del ciclo son 30 segundos a

la temperatura de desnaturalización, después se bajó hasta la temperatura de alineamiento (que para estos oligos fue de 58°C) y se mantuvo esta temperatura por 30 segundos. Finalmente el tiempo de extensión fue de 3 minutos a 72°C . Una vez concluidos los 25 ciclos, la termocicladora se dejó 10 minutos a la temperatura de extensión (72°C) para que la polimerasa completara la extensión de los tramos que quedaron incompletos.

Para verificar la amplificación del fragmento seleccionado de ADN hicimos electroforesis con un gel de agarosa al 1.5% w/v:

1. Pesamos 1.5 g de agarosa y añadimos 100 ml de Buffer TAE 1x. Calentamos hasta disolver por completo la agarosa (el agua evaporada se repuso) y vertimos la solución en un molde de plástico rectangular con una peineta en la parte superior para formar los pozos. Una vez fría y solidificada la agarosa retiramos la peineta y colocamos el gel en la cubeta de electroforesis.
2. La cubeta se llenó con Buffer TAE 1x y en el primer y tercer pozo cargamos $2\ \mu\text{l}$ del marcador de peso molecular, en el segundo pozo cargamos $3\ \mu\text{l}$ del producto final de la PCR mas $1\ \mu\text{l}$ de Buffer de carga. El Buffer de carga contiene glicerol para ayudar a precipitar el ADN hasta el fondo del pozo, y tres colorantes: xilencyanol que marca la ubicación de la banda de 2 Kb, Azul Bromofenol que marca la ubicación de la banda de 500 pb y Naranja G que marca la posición de la banda de 100 pb. El uso de estos colorantes durante la electroforesis ayuda a ubicar cuánto ha migrado el ADN.
3. Se dejó correr el ADN por 45 minutos a 90 V.
4. Después de los 45 minutos se sumergió el gel en una solución con bromuro de etidio durante 30 minutos
5. El gel se expuso a luz UV y se tomó la imagen.

Los $23\ \mu\text{l}$ de la PCR que no se utilizaron se purifican para retirar todos los componentes de la PCR y solo dejar el ADN. Esto se hizo según las instrucciones del Kit de purificación Promega

6.2. Protocolo para limpiar los vidrio

1. Se colocan los cubre objetos (Corning, no. 2940-224) en un soporte cerámico.
2. Se introduce el soporte cerámico a la cámara del Plasma Cleaner.
3. Se prende una bomba de vacío hasta alcanzar dentro de la camara una presión de 1 Torr.
4. Se enciende la radio frecuencia y se dejan los prendida durante 5 minutos.
5. Se apaga la radio frecuencia y se ventila la cámara.
6. Se retira el soporte cerámico con los vidrio. Los vidrios se pasan a un soporte de teflon y se guardan en una caja herméticamente cerrada.

Durante todo el proceso se deben usar guantes.

6.3. Protocolo de incubación

1. Se construye un canal de ≈ 0.5 cm de diámetro adhiriendo cinta doble cara en un porta objetos y transversalmente se coloca un cubre objetos limpio (se limpia por medio del Plasma Cleaner).
2. Se diluyen 10 μl de anticuerpo a una concentración de 5 mg/ml en 90 μl de Buffer de fosfatos salino. Se fluyen 15 μl (aproximadamente el volumen del canal) en el canal y se deja incubar durante 10 minutos.
3. Se lava el canal con 200 μl de Buffer de lavado y se deja durante 2 minutos.
4. Se fluye ADN a una concentración de 0.25 nM disuelto en Buffer de fosfato y se dejo incubando durante 10 minutos
5. Se lavó el canal con 200 μl de Buffer de lavado y se deja durante 2 minutos.
6. Se fluyeron 30 μl de esferas disueltas en Buffer de fosfato y a una concentración final de 0.38 pM. Las esferas se sonicaron previamente en hielo durante 10 minutos.
7. Se selló el canal usando esmalte para uñas.

6.3.1. Buffer de lavado (1 ml)

- 250 μl de Albumina Sérica Bovina a 20 mg/ml
- 750 μl de Buffer de fosfatos con 0.1 % de Tween

6.3.2. Buffer de fosfato (100 mM, 100 ml)

- 7.74 ml de solución 1 M de Na_2HPO_4
- 92.26 ml agua miliQ

El pH ya esta ajustado, la solución se hace pasar por un filtro de 0.22 μm (tamaño del poro). Se almacena a 4°C

6.3.3. Buffer de fosfatos salino

- 137 mM NaCl
- 2.7 mM KCl
- 10 mM Na_2HPO_4
- 2 mM KH_2PO_4

Se ajusta el pH a 7.4, la solución se hace pasar por un filtro de 0.22 μm (tamaño del poro). Se almacena a 4°C

Apéndice B. Automatización de la pinza: Lista de VI's

Todas estas rutinas fueron escritas originalmente por el grupo de trabajo del Dr. Steven Block, y se modificaron para que funcionaran de acuerdo a nuestras necesidades y dispositivos. En todos los programas se tiene la opción de guardar los datos, si se selecciona esa opción se genera un archivo con el nombre del vi y la hora, dentro de la carpeta con la fecha del día.

Feedbackpower.vi Por medio de este programa se controla la amplitud de la señal sinusoidal que se envía al MAO. Lo primero que hace el programa es enviar al generador de funciones un valor para la amplitud y frecuencia de la señal sinusoidal que debe enviar al MAO. Después detecta la señal del foto-detector durante 1 minuto y el valor promedio se establece como el punto de referencia para el sistema de retroalimentación, también se puede establecer de forma manual el voltaje de referencia. El programa registra constantemente el valor del voltaje en el foto-detector y lo compara con el valor de referencia, la diferencia entre estos valores se multiplica por los factores integrales y proporcionales que el usuario determine, y el número resultante se suma al valor de la amplitud de la señal sinusoidal que se manda al MAO.

CenterStuckbead.vi Este programa mueve la platina en pasos, primero en la dirección x_p y luego en la dirección y_p . Cada vez que la platina da un paso, el FDP adquiere 200 muestras (a una tasa de muestreo de 20000 Hz) y los promedia para dar un único punto. En el panel frontal se despliegan dos gráficas, una para la señal del FDP en función de la posición de la platina x_p y otra en función de y_p . A cada una de estas curvas el programa le ajusta la derivada de una Gaussiana, y coloca la platina en el centro de la derivada.

ScanStageLookingForSurface.vi Este programa mueve en pasos la platina en la dirección z_p , después de dar un paso el FDP adquiere 8000 muestras (a una tasa de muestreo de 40000 Hz) y los promedia para dar un único punto. En el panel frontal se grafica en tiempo real la señal del FDP en función de la posición de la platina. Una vez que la platina ha dado el número de pasos indicados vuelve a su posición inicial y mueve de nuevo la platina en la dirección z_p . Esta acción se repite hasta que se indica, apretando un botón del panel, que ya no queremos tomar más trazas. Todas las trazas obtenidas se empalmen en la misma gráfica en el panel frontal.

CenterStuckbead91%.vi Este programa mueve en pasos la platina en la dirección z_p , después de dar un paso el FDP adquiere 200 datos (a una tasa de muestreo de 20000 Hz) y los promedia para dar un único punto. En el panel frontal se grafica la señal del FDP en función de la posición de la platina. Después encuentra el valor máximo y mínimo de en la señal del FDP y a la diferencia entre estos valores le asigna un valor del 100%. Después calcula la posición a la cual el valor del voltaje es el 91%, y mueve la platina a esta posición.

Find Surface Height.vi Este programa mueve en pasos la platina en la dirección z_p , después de dar un paso el FDP adquiere 2000 datos (a una tasa de muestreo de 20000 Hz) y los promedia para dar un único punto. En el panel frontal del programa se grafica la señal del FDP en función de la posición de la platina. Tanto el tamaño de los pasos de la platina, como el número de pasos son parámetros que el usuario debe especificar al programa. Otro de los parámetros de entrada del programa le pregunta al usuario la distancia a la que quiere colocar la platina respecto a la superficie. Una vez obtenida la curva el programa le pide al usuario que coloque el cursor sobre el punto de la curva donde se encuentra la superficie, una vez colocado el cursor se debe de apretar el botón de “cursor listo” y el programa mueve la platina a la posición indicada por encima de la superficie.

PowerSpectrum.vi Este VI toma como entradas los valores de los factores de calibración del FDP para convertir la señal de V a nm. El programa colecta datos 32768 muestras (a una tasa de muestreo de 65568 Hz), esta toma de datos la hace en forma iterativa el número de veces que se especifique, por lo general 20 veces. A partir de estos datos el programa calcula el espectro de potencias y le ajusta una Lorentziana. A partir de los parámetros obtenidos del ajuste (frecuencia de corte y amplitud de la Lorentziana) se obtiene la rigidez de la trampa. Usando los mismos datos el programa calcula la varianza en la señal y usando el método de equipartición de la energía encuentra la rigidez de la trampa. En el panel frontal del programa se

despliega una gráfica con el espectro de potencias para cada coordenada (x, y, z) y una tabla con los valores estimados de k_{trampa} para cada método y para cada eje.

CenteringDNA.vi Este programa realiza diferentes acciones, dependiendo de los botones que se activen, pero en todos los casos mueve la platina en pasos, primero en la dirección x_p y luego en la dirección y_p . Cada vez que la platina da un paso el FDP adquiere 200 muestras (a una tasa de muestreo de 20000 Hz) y los promedia para dar un único punto. En el panel frontal se grafica el voltaje del FDP en función de la posición de la platina. Uno de los botones da la opción de ajustar la derivada de la Gaussiana, otro botón da la opción de ajustar una línea recta entre la posición de dos cursores. La ubicación de los cursores sobre la gráfica queda a cargo del usuario. Otro botón ajusta un polinomio de 7 orden a los datos. En los tres casos se puede decidir si queremos que al terminar el ajuste la platina se mueva al valor correspondiente con el centro de la gráfica.

Drag Stokes.vi Este programa permite mover la platina a una velocidad constante especificada por el usuario. Dado que la esfera pasa de estar en reposo hasta una velocidad constante, hay un tiempo en el cual la esfera se acelera, y en el cual no se toman datos. En la región en la cual la velocidad es constante, el programa mide el desplazamiento de la esfera respecto a su posición de equilibrio. En forma automática le programa incrementa la velocidad de la platina, en intervalos dados por el usuario, y genera una gráfica de velocidad contra la posición desplazada de la esfera. A partir de la pendiente de la gráfica se obtiene el valor de la rigidez de la trampa asumiendo que la viscosidad es la del agua y que la esfera está a una altura dada por el usuario.

Bibliografía

- [1] 'There's plenty of room at the bottom', Richard Feynmann, 1959
<http://www.zyvex.com/nanotech/feynman.html>
- [2] Acceleration and trapping of particles by radiation pressure, *Physical Review Letters*, Vol. 24, 156-159, 1970.
- [3] Optical levitation by radiation pressure, *Applied Physics Letters*, Vol. 19, 283-85, 1970.
- [4] Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles, *Optics Letters*, Vol. 11, 288-290, 1986.
- [5] How is all began, (Interview), *Nature Photonics*, Vol. 5, 316-317, 2011.
- [6] *In singulo* Biochemistry: When Less is More, *Annual Reviews of Biochemistry*, Vol. 77, 45-50, 2008.
- [7] Biological applications of optical forces, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, Vol. 23, 247-85, 1994.
- [8] Optical Trapping and Manipulation of Viruses and Bacteria, *Science*, Vol. 235, 1517-1520, 1987
- [9] Internal cell manipulation using infrared laser traps, *Proceedings of the National Academy of Science*, Vol. 86, 7914-7918, 1989.
- [10] Use of laser -induced optical force trap to study chromosome movement of the mitotic spindle, *Proceedings of the National Academy of Science*, Vol. 86, 4539-4543, 2005.

- [11] Directed positioning of nuclei in living *Paramecium tetraurelia*: use of the laser optical force trap for developmental biology, *Developmental Genetics*, Vol. 13, 235-240, 1992.
- [12] Laser induced cell fusion in combination with optical tweezers: the laser cell fusion trap, *Cytometry* Vol. 12, 505-510, 1991.
- [13] Force and Velocity Measured for single Kinesin molecules, *Cell*, Vol. 77, 773-784, 1994.
- [14] Stretching DNA with Optical Tweezers, *Biophysical Journal*, Vol. 72, 1335-1346, 1997.
- [15] Overstretching B-DNA: The Elastic Response of individual Double-stranded and single stranded DNA molecules, *Science*, Vol. 271, 795-799, 1996.
- [16] Direct Mechanical Measurements of the Elasticity of Single DNA Molecules by Using Magnetic Beads, *Science*, Vol. 258, 1122-1126, 1992.
- [17] A practical guide to single-molecule FRET, *Nature Methods*, Vol. 5, 507-516, 2008.
- [18] The titin-telethonin complex is a directed, superstable molecular bond in the muscle Z-disk, *Proceedings of the National Academy of Science Early Edition*, 1-4, 2009
- [19] Direct Measurement of the full, sequence- dependent folding landscape of nucleic acid, *Science*, Vol. 314, 1001-1004, 2006.
- [20] Introduction to electrodynamics, David J. Griffiths, Third edition, 1999.
- [21] Single-Molecule studies of kinesin family motor proteins (PhD thesis), Polly Fordyce, 2006
- [22] Light, action: optical tweezers, *Contemporary Physics*, Vol. 43, 241-258, 2002.
- [23] Optical Tweezers a Tool for Nonintrusive Micromanipulation of Biological Objects (PhD thesis), Erik Fallman, 2001.

- [24] Optical trapping, *Review of Scientific Instruments*, Vol. 75, 2787-2809, 2004.
- [25] *Mechanics of motor proteins and the cytoskeleton*, Jonathon Howard, Publishing House Sinauer, pp 63-69.
- [26] The Smallest Tweezers in the world, *The Physics Teacher*, Vol. 46, 467-472, 2008.
- [27] http://es.wikipedia.org/wiki/Proporcional_integral_derivativo
- [28] Recent Advances in Optical Tweezers, *Annual Reviews of Biochemistry*, Vol. 77, 205-228, 2008.
- [29] Photonic force microscope calibration by thermal noise analysis, *Applied Physics A*, Vol. 66, S57-S78, 1998.
- [30] Interference model for back-focal-plane displacement detection in optical tweezers, *Optics Letters*, Vol. 23, 7-9, 1998.
- [31] Kinesin hydrolyses one ATP per 8-nm step, *Nature*, Vol. 388, 386-390, 1997.
- [32] Precision steering of an optical trap by electro-optic deflection, *Optics Letters*, Vol. 33, 599-601, 2008.
- [33] Measurement of the effective focal shift in an optical trap, *Optics Letters*, Vol. 30, 1318-1320, 2005.
- [34] *Óptica*, Hecht, tercera edición en español, 2000, capítulo 10.
- [35] *Video Microscopy*, Shinya Inoué, Plenum 1986, chapter 5.
- [36] *Molecular Expression. Optical Microscopy Primer*; <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/index.html>
- [37] Acusto-optic modulators; <http://electron9.phys.utk.edu/optics507/modules/m7/acousto.htm>
- [38] Ionic effects on the elasticity of single DNA molecules, *Proceedings of the National Academy of Science*, Vol. 94, 6185-6190, 1997.
- [39] *Molecular Structure of Nucleic Acids*, *Nature*, Vol. 171, 737-738, 1953.

- [40] Revisiting the Central Dogma One Molecule at a Time, *Cell*, Vol. 144, 480-497, 2011.
- [41] Single-molecule studies on DNA mechanics, *Current Opinion in Structural Biology*, Vol. 10, 279-285, 2000.
- [42] Stretching DNA, *Macromolecules*, Vol. 28, 8759-8770, 1995.
- [43] *Molecular cell biology*, Lodish, 5 edition.
- [44] Optical trapping for undergraduates, *American Journal of Physics Teachers*, Vol. 75, 5-14, 2007.