



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

“NANOFABRICACIÓN DE BOBINAS USANDO ADN COMO MEDIADOR”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

PRESENTA:
ING. DAVID DANIEL RUIZ ARCE

TUTOR PRINCIPAL:
DR. ENRIQUE C. SAMANO TIRADO
CENTRO DE NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA

MIEMBROS COMITÉ TUTOR:
DRA. ELIZABETH PONCE RIVAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR DE
ENSENADA

DR. GERARDO SOTO HERRERA
CENTRO DE NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA

ENSENADA, B. C., MÉXICO, JUNIO 2017



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.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
I.1. Hipótesis	5
I.2. Objetivos.....	5
I.2.1. Objetivo general	5
I.2.2. Objetivos particulares	5
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	6
II.1. Propiedades relevantes del ADN.....	6
II.2. Autoensamblaje y entrecruzamientos de ADN	9
II.3. Principios y construcción de origami de ADN.....	14
II.4. Funcionalización con nanopartículas de oro	20
II.5. Nanobobinas.....	27
CAPÍTULO III: TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	29
III.1. Técnicas experimentales	29
III.1.1. Electroforesis	29
III.1.2. Espectrofotómetro UV-Vis	33
III.1.3. Microscopia de fuerza atómica	35
III.2. Procedimiento experimental	41
III.2.1. Diseño de Nanobobinas en caDNAno y simulación en CanDo.....	42
III.2.2. Resuspensión de grapas	47
III.2.3. Elaboración de “pools” de grapas (ssDNA).....	48
III.2.4. “Annealing” de origami de ADN.....	49
III.2.5. Preparación de grapas tioladas.....	51
III.2.6. Tratamiento de nanopartículas de oro.....	54
III.2.7. “Freeze and Squeeze”	56
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58
IV.1. Electroforesis en gel de agarosa	58
IV.2. Visualización de origami de ADN.....	61
IV.3. Funcionalización de origami de ADN con nanopartículas de oro en superficie	67



CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO	74
CAPÍTULO VI: REFERENCIAS.....	77
APÉNDICES.....	88
Apéndice A: Diseño del Mini-Círculo en el software caDNAno	88
Apéndice B: Secuencia del Mini-M13.....	89
Apéndice C: Secuencia de los oligonucleótidos del Mini-Círculo	91
Apéndice D: Secuencia de oligonucleótidos extendidos y “backfill” del Mini-Círculo	95



Índice de figuras

Figura 1. Esquema de la molécula de azúcar desoxirribosa.	7
Figura 2. Una molécula de azúcar desoxirribosa unida a un grupo fosfato.	7
Figura 3. Pequeño segmento de una doble hélice que muestra las diferentes partes del ADN [1].	8
Figura 4. Esquematación de la unión Holliday y unión artificial creada por el Prof. Seeman. a) Unión Holliday natural móvil. b) unión Holliday sintética fija. c) uso de “sticky-ends” complementario al inciso b) para formar redes (adaptado de [12]).	11
Figura 5. Representación de los cinco isómeros de doble entrecruzamiento (DX) (adaptado de [33]).	12
Figura 6. Imágenes en AFM de estructuras de ADN de un a) tetraedro, b) dodecaedro, c) fullereno y d) nanotubos formados por tres, cuatro y cinco brazos de ADN [42]. Las vistas de las imágenes reconstruidas por crió-TEM se incluyen en en a), b) y c) [41].	13
Figura 7. Desarrollo de nanotecnología basada en ADN (traducción de [11]).	14
Figura 8. Representación esquemática de los pasos principales de la técnica de origami de ADN para crear una cara sonriente (adaptado de [45]).	16
Figura 9. "Tall rectangle". a) diseño de nanoestructura con un programa de dibujo, e b) imagen de AFM correspondiente a la nanoestructura después de ser sintetizada.	17
Figura 10. Tres diseños obtenidos por caDNAno de origami se muestran en el panel izquierdo: a) un círculo, d) un “spike” y g) un triángulo. Imágenes de AFM de $2 \times 2 \mu\text{m}$ correspondientes a los diseños de origami (b, e y h) e imágenes con un barrido de $500 \times 500 \text{ nm}$ (c, f, e i) para mostrar los detalles de su topografía.	19
Figura 11. Funcionalización de AuNPs de origami de ADN. a) conjugados de AuNP-ADN se crean uniendo la secuencia complementaria (líneas rojas) de la AuNP vía enlace disulfuro. b) el bioconjugado se une a la superficie de origami para encontrar su secuencia complementaria (líneas azules).	23
Figura 12. Diferentes arreglos geométricos de AuNPs de 5 nm en el "rectángulo". a) Dos AuNPs colocadas en dos vértices opuestos. b) AuNPs colocadas de manera tal que forman una "H". c) origami de ADN con AuNPs alrededor del perímetro (anillos). d) cuatro esquinas, barras paralelas, forma de "H" y los anillos forman en el "origami alto rectangular.	24
Figura 13. Metalización por reducción iónica de un origami de ADN funcionalizado sobre un sustrato. La reducción de plata o de oro que ocurre en la superficie de nanopartículas por metalización es tal que ocurre AuNPs vecinas incluso podrían unirse cuando estén lo suficientemente cercanas.	24
Figura 14. Conjunto de micrografías de SEM: a) nanoestructuras metálicas con forma de "H", b) amplificación de una de las nanoestructuras mostradas en a), un nanoalambre, c) La misma nanoestructura metálica que se muestra en b) después de depósito de paladio inducido por haz de electrones para ser utilizados como extensiones para contacto eléctrico del nanoalambre, d) entorno que rodea a la estructura mostrada en c) después de aumentar la longitud de las extensiones pero ahora con oro y usando litografía.	25
Figura 15. Esquematación de la fabricación de un transistor usando grapas de ssDNA y andamio para construir un origami de ADN de forma rectangular, funcionalización de AuNPs para su colocación de una forma estratégica, metalización y formación de contactos eléctricos.	26
Figura 16. Vector del campo magnético B de una carga que circula en una espira.	27

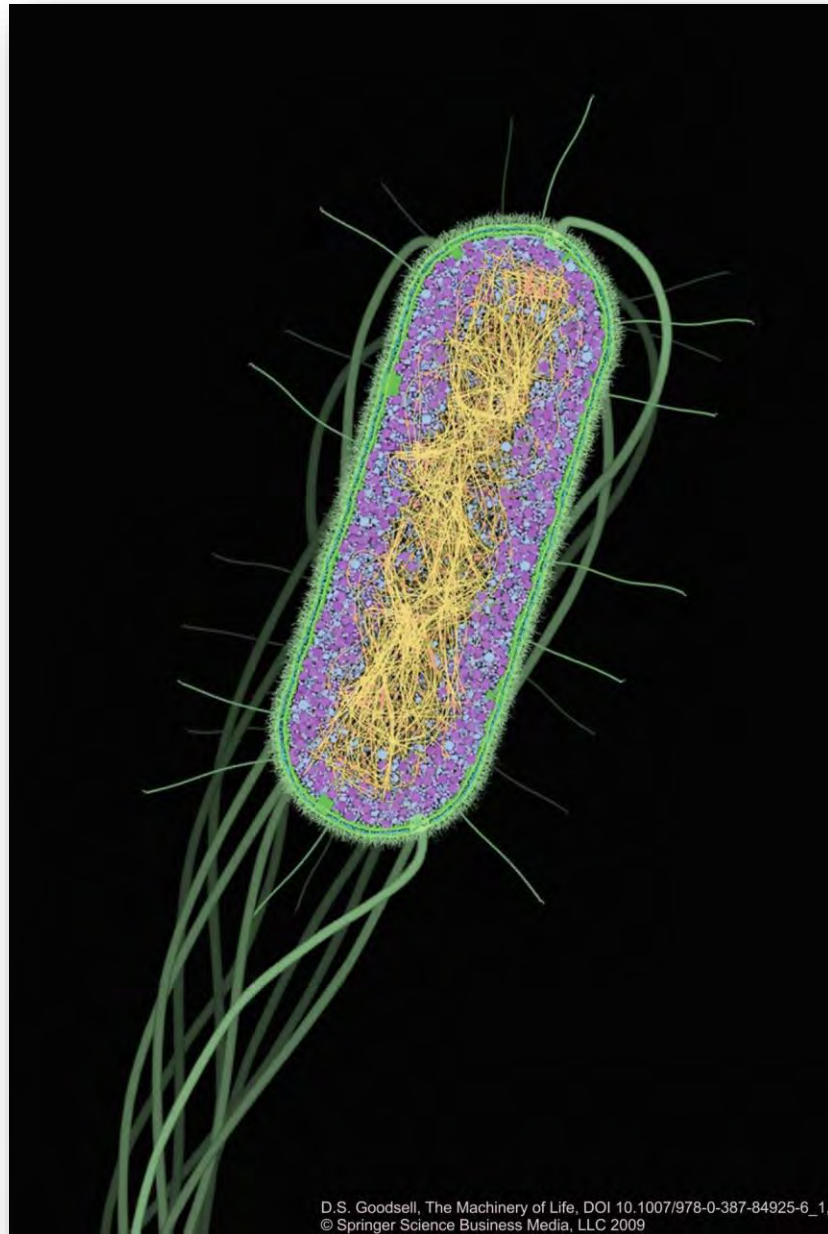


Figura 17. Esquema de cámaras de electroforesis indicando el sentido de migración de una muestra. a) vertical y b) horizontal [67].....	30
Figura 18. Esquematación de cámara de electroforesis vertical que consiste de: a) cámara, b) fuente de poder, c) procedimiento de colocación de muestra y d) representación de corrimiento de gel (adaptado de [67]).....	32
Figura 19. a) Equipo de espectrofotometría comercial NanoDrop 2000c de Thermo Scientific, b) detalle mostrando la forma en que se carga la muestra en el pedestal del NanoDrop, c) y d) procedimiento automático para lectura de muestra [74]).	35
Figura 20. Imagen de un microscopio de fuerza atómica.	36
Figura 21. Esquema de operación del AFM en modo “tapping” [77].	37
Figura 22. Principios de operación de un AFM [77].	38
Figura 23. Dibujos mostrando diferentes cantilévers: a) triangular, c) rectangular sin esquinas y e) rectangular. Las micrografías en SEM correspondientes a cada uno de estos cantilévers se exhiben en las micrografías realizadas en SEM en b),d) y f). (Figura adaptada de [77]).....	39
Figura 24. Celda de fluido modelo MTFML-V2 de la compañía Bruker AFM Probes.	40
Figura 25. Diagrama de flujo mostrando las diversas etapas para la fabricación de nanoestructuras por la técnica origami de ADN. a) boceto o idea, b) diseño en caDNAno, c) simulación en CanDo, d) “annealing” y e) visualización en AFM (Forma adaptada de [82]).	41
Figura 26. a) Boceto de círculo y b) diseño de círculo en el software caDNAno.	43
Figura 27. Simulación obtenida por CanDo de la estructura circular de origami de ADN. a) Vista frontal, b) vista horizontal y c) vista lateral mostrando fluctuaciones térmicas.	44
Figura 28. Grapas seleccionadas para funcionalizarlas y distancias entre nanopartículas (la numeración indica las diferentes secuencias utilizadas).	45
Figura 29. Esquematación de funcionalización de origami de ADN con AuNPs.	46
Figura 30. Gel de electroforesis de la nanoestructura circular de origami de ADN. a) Línea 1: Escalera; línea 2: grapas 50 nM (flecha amarilla); línea 3: andamio 5 nM (flecha azul); línea 4: estructuras de origami de ADN 5 nM (flecha verde); línea 5: estructura circular de origami con grapas extendidas 5 nM (flecha roja). b) Línea 6: origami de ADN funcionalizado con AuNPs 5 Nm (flecha negra) y c) esquematización con perfil de bandas del corrimiento.	61
Figura 31. Imagen de estructuras circulares de origami de ADN con una relación molar de 1:60; barra de escala de 200 nm.	63
Figura 32. Imagen de estructuras circulares de origami de ADN con una relación molar de 1:10; barra de escala de 200 nm.	63
Figura 33. Imagen de nanoestructuras circulares en un barrido de 5 x 5 μm ; barra de escala de 500 nm.	64
Figura 34. Imagen de nanoestructuras circulares en un barrido de 1 x 1 μm ; barra de escala de 200 nm.	65
Figura 35. Acercamiento a las nanoestructuras circulares en la esquina superior izquierda de la figura 34 en un barrido de 400 x 400 nm; barra de escala de 100 nm.	65
Figura 36. Análisis de corte seccional horizontal de una nanoestructura circular en un barrido de 500 x 500 nm.	66
Figura 37. Análisis de corte seccional vertical de una nanoestructura circular en un barrido de 500 x 500 nm.	67
Figura 38. Imagen de AFM a una escala de barrido de 5 x 5 μm de origami de ADN con forma circular funcionalizado con nanopartículas de oro; escala de barra de 500 nm.....	69



Figura 39. Imagen del conjugado AuNPs-Origami observado por AFM a una escala de 400 nm; barra de escala de 50 nm.	70
Figura 40. Imagen de una estructura circular funcionalizada con 3 AuNPs (800 x 800 μm); barra de escala de 50 nm.	71
Figura 41. Análisis de sección transversal del conjugado AuNPs-Origami mostrado en la figura 40 posicionado en una sola nanopartícula.	72
Figura 42. Análisis de sección transversal del conjugado AuNPs-Origami mostrado en la figura 40 posicionado a lo largo de dos nanopartículas.	73





“DNA is more than just the secret of life-it is also a versatile component for making nanoscopic structures and devices”

Nadrian C. Seeman



AGRADECIMIENTOS

Todo esto nunca hubiera sido posible sin el apoyo incondicional, el amor y paciencia de Karen Lizbeth Cardos Tisnado quien me ha enseñado, inspirado y motivado en cada instante desde que tuve la fortuna de conocerla. Y al ser maravilloso que estamos esperando, a ti bebé te dedico todo este esfuerzo. A mi padre Jorge Alberto Ruiz Cacho y a mi madre María Aurora Arce García, por creer en mí, amarme, por formarme como una persona libre y de buenas costumbres. A mis hermanos Roberto, Jorge, Luis y Thamara, gracias por siempre creer en mí, los amo.

Quiero agradecer al Dr. Enrique C. Samano Tirado por su sabiduría, dedicación y su valiosa amistad. Expresarle mi gratitud a Amanda Martínez por su ayuda y conocimiento, pero sobre todo por su amistad. También me gustaría dar las gracias al Profesor Thom LaBean y a Jacob Majikes de la Universidad del Estado de Carolina del Norte por permitirme usar sus “juguetes” de laboratorio y por sus valiosas contribuciones a mi tema de tesis.

Estoy especialmente agradecido con la Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad que me ha brindado de formarme en el Centro de Nanociencias y Nanotecnología, con sus diversos programas de apoyo a proyectos de investigación e innovación tecnológica (PAPIIT) con el proyecto IG100417, de igual forma doy gracias por el apoyo recibido por el programa de apoyo a los estudios de posgrado (PAEP). Y sobre todo mi gratitud al Consejo Nacional para la Ciencia y la Tecnología (CONACYT), por la beca que me brindó para poder realizar estos estudios. Un especial agradecimiento a CONACYT por el financiamiento a la investigación con número 176352 para la elaboración del proyecto “Síntesis de nanoestructuras metálicas basadas en ADN y sus aplicaciones”.



RESUMEN

El estudio de nuevos materiales con un propósito específico dentro de ingeniería implica la búsqueda de la relación entre síntesis, estructura, propiedades y rendimiento, los cuales dependen de los materiales y el método de fabricación. En la actualidad, se desarrolla un creciente interés en materiales bioinspirados o biomiméticos, por lo que el ADN ha cobrado cada vez más importancia no sólo como un sistema que encripta nuestro código genético sino también como un material de construcción. Gracias a la especificidad de la unión Watson-Crick, el ADN conduce a interacciones intra e intermoleculares que son predecibles y programables. Como resultado, todo un campo en nanotecnología, llamado nanotecnología basada en ADN, ha evolucionado y tiene como objetivo la construcción de nanoestructuras cada vez más complejas con la potencialidad de poseer múltiples funcionalidades. Uno de los mayores avances en la nanotecnología estructural de ADN ha sido la técnica de origami de ADN; ideada, desarrollada y demostrada por el Profesor Paul Rothemund.

La capacidad de organizar una gran variedad de objetos orgánicos y/o inorgánicos abre la puerta a la creación de nanoestructuras altamente multifuncionales. En este proyecto de tesis se describe una estructura de origami de ADN que fue diseñada aproximadamente con un tercio de la longitud del genoma bacteriófago M13, correspondiente a 2,404 bases, que permitió generar una nanoestructura de geometría reconocible con tamaño mínimo. En el desarrollo de esta tesis se abordan los principios de diseño y construcción de una nanoestructura con forma circular basada en el método de origami de ADN, se propone la unión precisa de nanopartículas de oro a lo largo de la periferia como un método alternativo para fabricar bobinas a escala nanométrica.



ABSTRACT

The study of new materials with a specific purpose in engineering implies the search of the relationship between synthesis, structure, properties and performance, which depend on the materials and the method of manufacturing. Nowadays there is a growing interest in bio-inspired or biomimetic materials, so DNA has become increasingly important not only as a system that encrypts our genetic code but as a building material as well. Thanks to the specificity of the DNA Watson-Crick base pairing, the DNA allows intra- and intermolecular interactions that are predictable and programmable. As a result, a whole new field in nanotechnology has emerged and evolved, called DNA nanotechnology; it is aimed at building increasingly complex nanostructures with the potential of harnessing multiple functionalities. One of the major breakthroughs in DNA structural nanotechnology has been the DNA origami technique; conceived, developed and proven by Professor P. Rothemund.

The ability to organize a wide variety of inorganic and/or organic objects opens the door to the creation of highly multifunctional nanostructures. In this thesis a particular DNA origami structure is described. This one was designed using approximately one third of the length of the M13 phage genome, having 2,404 bases, which allows the creation of a nanostructure with a minimum size but discernable geometry. The present work addresses the principles of design and construction of a nanostructure having the shape of a circle utilizing the DNA origami technique. Besides, the precise binding of gold nanoparticles along the perimeter of the circle is proposed as an alternative method for building coils at the nanoscale.



CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

En la Naturaleza, los organismos vivos "eligieron" una amplia gama de materiales híbridos que combinan componentes orgánicos blandos, como proteínas, y componentes inorgánicos duros, como la apatita, a lo largo de la evolución. Éstos a menudo tienen formas fascinantes, además que casi siempre tienen propiedades físicas extraordinarias (mecánicas, ópticas, etc.) en comparación con las de los materiales artificiales. Estas propiedades generalmente están relacionadas con el alto grado de especialización que los seres vivos tienen sobre la estructura, tamaño, forma, orientación, textura y ensamblaje de sus constituyentes. Inspirados en ello, los esfuerzos realizados en los campos de la química, la física y la ciencia de los materiales a través de los años han llevado a una multitud de materiales inorgánicos e híbridos dirigidos a una amplia variedad de aplicaciones. Sin embargo, el diseño y la fabricación de materiales compuestos orgánicos-inorgánicos con estructura y morfología controlada sigue siendo un reto importante en la actualidad [1].

Aunque muchos aspectos de los procesos nanotecnológicos aún no se han resuelto, en las dos últimas décadas se han reconocido algunas estrategias importantes que ahora están listas para ser implementadas en la síntesis de materiales. Esto proporcionará nuevas rutas para la fabricación de materiales híbridos orgánicos-inorgánicos especializados, tales como andamios de ingeniería de tejidos, polímeros reforzados, sensores e incluso dispositivos optoelectrónicos. El presente proyecto de tesis se centrará en los enfoques actuales para la síntesis de materiales híbridos bioinspirados que utilizan propiedades biológicas, principalmente el ADN, para crear nuevos materiales con estructuras y propiedades prediseñadas a escala nanométrica con alto impacto en nuevas tecnologías.



Nuestra sociedad está fascinada con la nueva tecnología, y el mercado de nuevos productos crece continuamente. Nuestras actividades diarias dependen de al menos un dispositivo electrónico. Por ejemplo, el “smartphone” se ha vuelto un objeto omnipresente y necesario; de tal relevancia que hoy en día pareciera a una prótesis en el cuerpo humano. Es difícil de creer que la existencia de casi todos estos aparatos se basan en el transistor y el desarrollo de circuitos integrados. Los “gadgets” portátiles de alta velocidad con una gran capacidad de memoria requieren de un número cada vez mayor de transistores en cada circuito integrado. Para satisfacer esta demanda y mantener simultáneamente un bajo precio para el consumidor, la industria de semiconductores produce chips electrónicos que contengan una alta densidad de transistores. Esto sólo puede realizarse disminuyendo el tamaño de los transistores en un área reducida, como lo predijo Gordon Moore en 1965 [2].

Sin lugar a dudas, los nuevos equipos electrónicos requieren que el tamaño de los componentes sea, ya no de escala micrométrica (1 micra = 10^{-6} m), sino nanométrica (1 nanómetro = 10^{-9} m), que es el orden de tamaño de las moléculas. Desafortunadamente, en la actualidad los métodos tradicionales de fabricación en la industria electrónica enfrentan retos científicos y tecnológicos crecientes para manufacturar componentes con tamaños menores a 100 nm [3]. Dos de estos retos son: el límite en el tamaño de los nanocomponentes y la disipación del calor generado. El primero está relacionado con el hecho de que se está alcanzando el límite físico de una ulterior miniaturización de los componentes por el método tradicional de manufactura (fotolitografía), y el segundo surge debido a que cada componente se ve afectado por el efecto Joule [4].



Desafortunadamente, hay un límite físico en el proceso de miniaturización de transistores de acuerdo con el actual enfoque "top-down" usado en la industria de semiconductores. Por lo tanto, hay un empuje en la investigación de nuevos métodos para satisfacer las necesidades de una sociedad "hambrienta" de nuevos productos tecnológicos. En el discurso de Richard Feynman "There is plenty of room at the bottom" abre la posibilidad de crear tecnología desde una nueva perspectiva basada en la manipulación y el control de objetos tan pequeños como los propios átomos [5]. Entre otros temas, predijo un proceso de fabricación donde la manipulación átomo por átomo en una superficie podría ser posible de una manera altamente controlada mediante un "gizmo" no inventado todavía en 1959. Esta idea fue materializada en 1991 cuando Don Eigler y Eric Schweizer en Almaden Research Center de IBM escribieron el nombre de su empresa manipulando 35 átomos de xenón utilizando un microscopio de barrido, precisamente el "apparatus" predicho por Feynman a finales de los 1950's [6,7]. En realidad, Feynman es considerado como el padre de la nanotecnología. Pero, ¿de qué trata esta disciplina?

La nanociencia es la ciencia emergente que explica los fenómenos que ocurren en la nanoescala, la escala de objetos en el intervalo de uno a cien nanómetros. Ésta es la medida de las moléculas más grandes y las estructuras más pequeñas hechas por la naturaleza, como un virus [8]. La capacidad de controlar la materia en la nanoescala ha llevado a la ciencia a nuevas e inesperadas aplicaciones que guían a una revolución en la industria, y sobre todo en la nanotecnología. El gobierno de los Estados Unidos alentó esta visión mediante la creación de la Iniciativa Nacional de Nanotecnología (NNI) en 2000 [9].



Los editores de Nature Nanotechnology han publicado recientemente un estudio sobre el impacto de esta iniciativa y han encontrado que los temas principales en el área de nanotecnología son: nanotoxicología, grafeno, nanoporos y nanotecnología basada en ADN [10]. Este último tema ha “prometido” cumplir con el requisito de un esquema factible para la fabricación de nuevos materiales con estructuras prediseñadas y propiedades con resolución espacial en la nanoescala basado en el uso del ADN como mediador, esta es una de las áreas más fructíferas para la investigación futura [11,12].

La nanotecnología basada en ADN representa un contraste comparado con otras áreas de la nanotecnología, pero con poderosos enfoques en la manipulación de la materia [11]. Uno de estos enfoques, es la técnica de origami de ADN, la cual ha tenido mucho éxito en la construcción de nanoestructuras prediseñadas en 2D y 3D utilizando las propiedades únicas de autoensamblaje, reconocimiento molecular y direccionamiento del ADN [13,14].

El presente trabajo se basa en el uso de la técnica de origami de ADN como un medio de construcción para el desarrollo de nuevos dispositivos electrónicos. La idea básica es utilizar la tercera parte del genoma del bacteriófago M13mp18 (2,404 pares de bases) con sus componentes complementarios (oligos diseñados sintéticamente) que den lugar a la conformación de una nanoestructura con forma circular. A su vez, se propone funcionalizar los oligos sintéticos con nanopartículas de oro a lo largo de la periferia como una propuesta novedosa en la fabricación de una bobina a escala nanométrica.



I.1. Hipótesis

Es posible utilizar la tercera parte del genoma del bacteriófago M13mp18 (7,249 b); es decir, constando de 2,404 bases, como medio de construcción para fabricar bobinas con geometría distinguible a escala nanométrica.

I.2. Objetivos

I.2.1. Objetivo general

Ampliar las posibilidades de fabricación de nanodispositivos electrónicos por medio de técnicas de origami de ADN.

I.2.2. Objetivos particulares

- Diseñar una estructura *ad hoc* que tenga una forma equivalente a un círculo usando el software caDNAno y corroborar su estabilidad usando CanDo.
- Estudiar la colocación y posicionamiento de nanopartículas de oro por medio de la funcionalización de “grapas” a lo largo de la periferia de la nanoestructura.
- Realizar verificaciones experimentales de los objetivos anteriores empleando diversas técnicas (AFM, electroforesis, etc.) y calcular su rendimiento.



CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

II.1. Propiedades relevantes del ADN

A principios de 1950 Erwin Chargaff descubrió que la composición base de ADN (ácido desoxirribonucleico) varía entre las especies pero que existía un mismo número de bases de adenina que las de timina y, así mismo, el mismo número de citosinas que de guaninas [15,16]. Pocos años después, basándose en los análisis de rayos-X obtenidos por Rosalind Franklin; Maurice Wilkins, Francis Crick y James Watson descubrieron que la estructura del ADN era una doble hélice, siendo un gran avance en la comprensión de los procesos genéticos de todas las especies vivas [17].

El objetivo de esta sección es proporcionar los conocimientos básicos sobre la topología y la composición química del ADN. Hay que mencionar que la especificidad y programabilidad del apareamiento Watson-Crick en el ADN permite no sólo verlo como un material hereditario sino también como un medio de construcción de materiales en la nanoescala [18]. El ADN es un biopolímero que consiste en una secuencia lineal de subunidades conocidas como nucleótidos. Cada nucleótido está compuesto de tres partes: un azúcar de cinco carbonos, unidos a un grupo fosfato (de aquí el nombre de ácido desoxirribonucleico), y una base nitrogenada [19].

Los grupos fosfato y los azúcares constituyen la columna vertebral del ADN de cada secuencia de nucleótidos no apareada, también llamada cadena sencilla de ADN (ssDNA). Los diferentes tipos de nucleótidos difieren sólo en el tipo de base nitrogenada que contiene. Las bases en el ADN se dividen en dos clases: purinas y pirimidinas. Las purinas son adenina (A) y guanina (G), mientras



que las pirimidinas son citosina (C) y timina (T) [20]. Estas bases se unen al azúcar y se pegan lateralmente en ssDNA. Cada ssDNA está determinada por su secuencia y dirección; esto se da enumerando los átomos de carbono en el azúcar de desoxirribosa como se muestra en la figura 1.

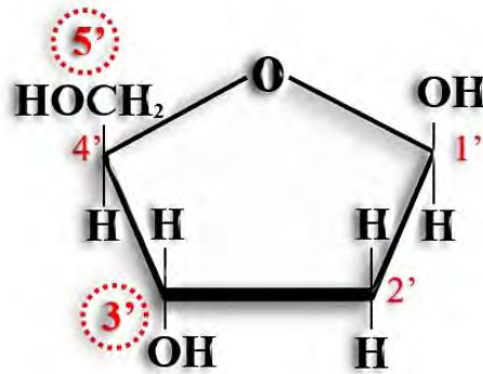


Figura 1. Esquema de la molécula de azúcar desoxirribosa.

Los nucleótidos se unen a dos fosfatos contiguos a través del extremo 5' de la desoxirribosa para uno de ellos y a la posición 3' del otro fosfato, en este caso correspondiendo a una dirección 5' → 3' [19]. Por lo tanto, cada ssDNA tiene un 5'-fosfato libre en un extremo y un 3'-hidroxilo libre en el otro, como se muestra en la figura 2 [20].

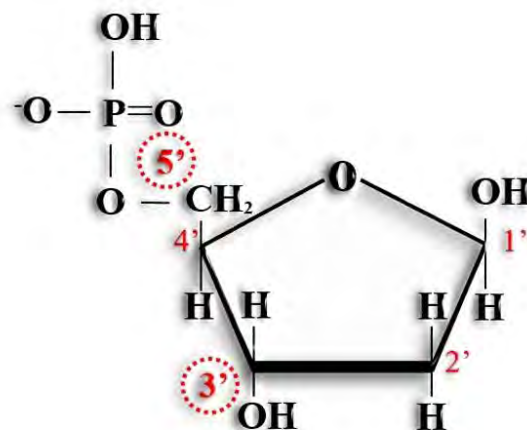


Figura 2. Una molécula de azúcar desoxirribosa unida a un grupo fosfato.



En la naturaleza, el ADN se encuentra normalmente como una biomolécula de cadena doble (dsDNA). Esto ocurre a través del apareamiento Watson-Crick de dos cadenas sencillas antiparalelas de ADN tal que se unen adenina con timina (A-T) y guanina con citosina (G-C) por medio de dos y tres enlaces puente de hidrógeno, respectivamente. Este apareamiento complementario permite que los pares de bases se empaqueten de una forma energéticamente favorable dando lugar a la formación de la muy conocida doble hélice (la forma B es la más conocida con una helicidad tal que obedece a la regla de la mano derecha) [5,20]. Como ya se mencionó, una condición necesaria para autoensamblar una dsDNA a partir de dos ssDNA es que éstas sean antiparalelas (una debe ser 5' → 3' y la otra 3' → 5'), como se muestra en la figura 3 [19,21].

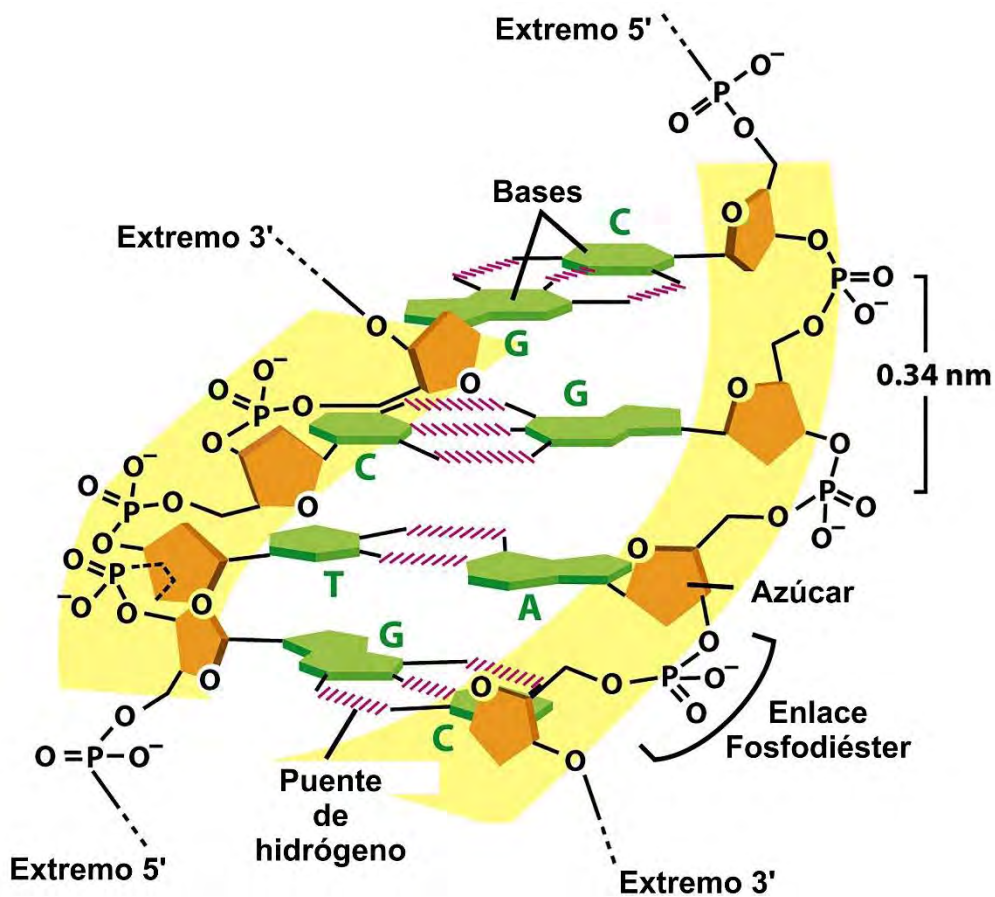


Figura 3. Pequeño segmento de una doble hélice que muestra las diferentes partes del ADN [1].



La doble hélice del ADN es inherentemente un objeto en la nanoescala. Tiene un diámetro de aproximadamente 2 nm, una distancia de 0.34 nm entre bases consecutivas y una longitud de aproximadamente 10.5 pares de bases (pb), o 3.34 nm, para una vuelta completa (360°) en la estructura de doble hélice [22-23]. El ADN es generalmente un biopolímero lineal, sin ramales, o puede tener una estructura totalmente envuelta en si misma cuando forma un cromosoma.

En la Naturaleza, el ADN rara vez da lugar a la creación de extensiones o ramales. La excepción a esta regla es la unión de Holliday [24]. Esta unión trata de una estructura de ácido nucleico ramificado en forma de cruz cuyas cadenas son móviles durante el proceso de recombinación genética. Esto ocurre cuando dos dsDNA se separan en cuatro cadenas con el fin de intercambiar segmentos de información genética, como se muestra en la figura 4a. Esta unión fue una inspiración para el Profesor Nadrian Seeman en la creación del nuevo campo de Nanotecnología basada en ADN [25]. La posibilidad de desarrollo de este nuevo campo es factible actualmente ya que la realización de la síntesis, purificación y caracterización de oligonucleótidos sintéticos de ADN de cualquier secuencia y longitud se puede llevar a un costo accesible y gran precisión como consecuencia de la revolución en biotecnología.

II.2. Autoensamblaje y entrecruzamientos de ADN

El campo de la nanotecnología de ADN fue creado por el nanotecnólogo y cristalógrafo Nadrian Seeman a principios de 1980. Gracias a la diversidad de ingeniosos procesos que se han desarrollado durante 37 años, la nanotecnología estructural del ADN es hoy en día una de las técnicas más estudiadas en el mundo científico. En la década de los 80's, el Prof. Seeman, estaba



tratando de hacer una matriz cristalina macromolecular para experimentos de difracción con proteínas pero en cada intento fracasaba [26]. Afortunadamente para la ciencia, su frustración lo llevó a la idea de que la unión Holliday, pese a ser una estructura móvil (como se encuentra en su estado natural), podría utilizarse para construir un enrejado o malla en tres dimensiones para colocar proteínas de forma periódica [27]. Se dio cuenta de que sí sintetizaba cadenas de ADN que carecieran de simetría; es decir, que no tengan una secuencia complementaria entre las cuatro cadenas, podría formar estructuras ramificadas donde los puntos de unión o ramales fueran inmóviles. Esto es precisamente contrario a lo que ocurre en la naturaleza con las uniones Holliday. Sin embargo, esto no bastaba para poder generar las estructuras que tenía en mente [12,28].

En un primer intento, fue capaz de lograr un entrecruzamiento de ADN inmóvil usando cuatro ssDNA, como se muestra en la figura 4b [25]. Basado en estos resultados, y para completar el diseño, Prof. Seeman ideó la forma en que éstas cuasi-estructuras se unieran en sus distintos extremos con segmentos cortos de oligonucleótidos llamados “sticky-ends” y usados en ingeniería genética, véase figura 4c, que fuesen complementarios de manera tal que al auto-ensamblarse formarían redes [18]. Como consecuencia, muchos mosaicos se han fabricado con diferentes diseños estructurales, los cuales poseen cinco, seis, ocho y doce brazos o ramales [29-30].



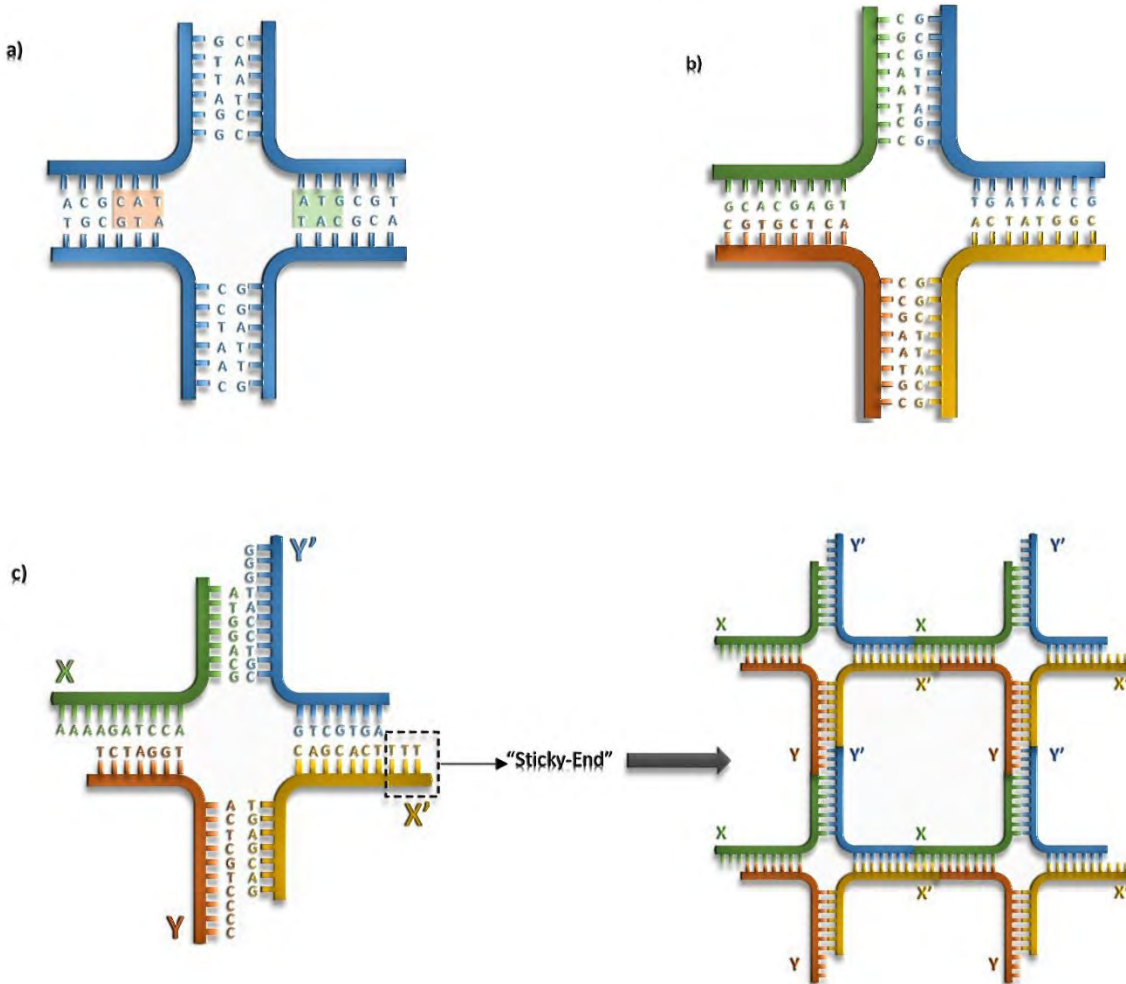


Figura 4. Esquematización de la unión Holliday y unión artificial creada por el Prof. Seeman. a) Unión Holliday natural móvil. b) unión Holliday sintética fija. c) uso de “sticky-ends” complementario al inciso b) para formar redes (adaptado de [12]).

Sin embargo, uno de los problemas para producir redes formadas por uniones de múltiples brazos de ADN a gran escala es la tendencia a ser flexible, aunque inmóvil [31]. Para evitar la plasticidad en estas estructuras de ADN, se diseñó el doble entrecruzamiento (DX, “double-crossover” por sus siglas en inglés) [32]. Estas estructuras consisten en la unión de cuatro cadenas ramificadas y unidas en dos brazos adyacentes. Existen cinco isómeros distintos de DX, como se muestra en la figura 5, donde la primera letra (D), se refiere a DX. La segunda letra puede ser A o P que indica



si la cadenas estructural, en azul en la fig.5, es antiparalela (DAE y DAO) o paralela (DPE, DPOW y DPON) y la tercer letra corresponde a si el número de semi-hélices entre los cruces es par (E) o impar (O), respectivamente [33-34]. Las cadenas de ADN se dibujan como estructuras en zig-zag helicoidales, donde dos líneas perpendiculares consecutivas corresponden a un giro completo helicoidal de una cadena de ADN [35].

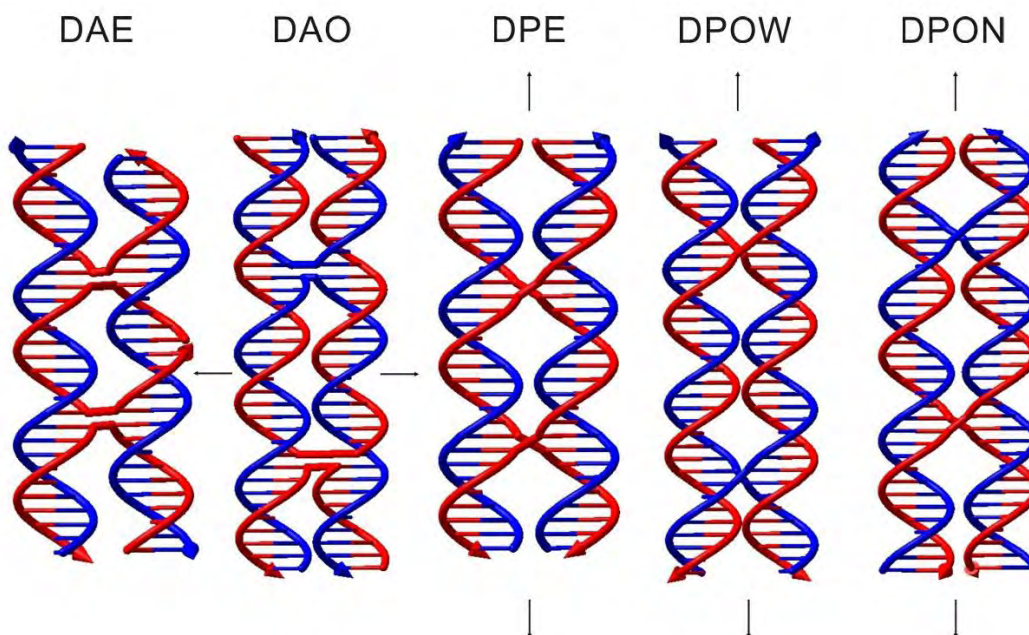


Figura 5. Representación de los cinco isómeros de doble entrecruzamiento (DX) (adaptado de [33]).

El DX más usado en el área es el doble entrecruzamiento antiparalelo de número par de medias vueltas, DAE, ya que ha demostrado ser el más estable para nanoconstrucciones [36]. Este segmento rígido combinado con un método de ensamblaje jerárquico permite una fabricación de tamaño finito, totalmente accesible y programable precisamente basado en redes de ADN [37-39]. Así, la flexibilidad inherente de la arquitectura de brazos múltiples se ha utilizado para construir diferentes objetos tridimensionales, como se muestra en la figura 6 [40-42].



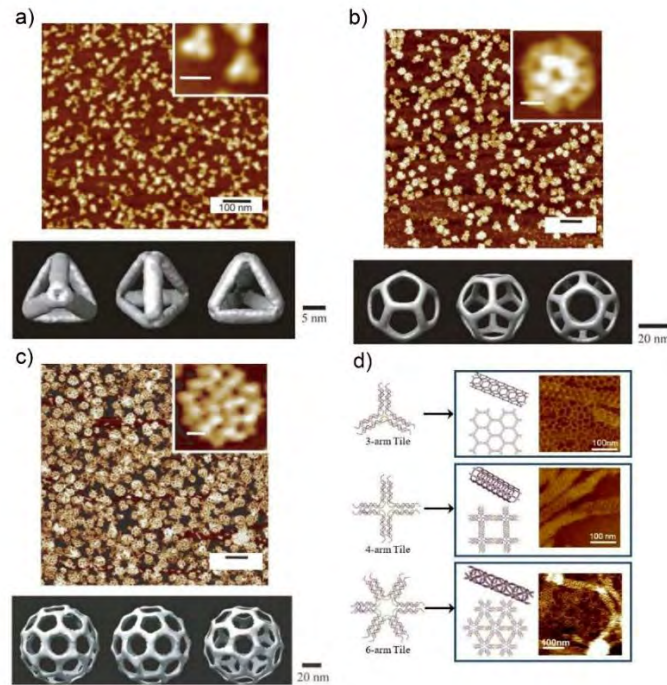


Figura 6. Imágenes en AFM de estructuras de ADN de un a) tetraedro, b) dodecaedro, c) fullereno y d) nanotubos formados por tres, cuatro y cinco brazos de ADN [42]. Las vistas de las imágenes reconstruidas por crio-TEM se incluyen en en a), b) y c) [41].

La síntesis de estructuras relativamente complejas mediante el concepto de brazos múltiples de ADN basados en DX implica un gran desafío y laborioso esfuerzo desde el diseño de secuencias de ADN para los azulejos jerárquicos hasta la nanoestructura ideada. Además, los oligonucleótidos para la síntesis de cada azulejo requieren ser purificados por varios procesos de reacción para armarlos por secciones. Probablemente, esto explica los bajos rendimientos de las nanoestructuras basadas en el concepto de brazos múltiples. Afortunadamente, la técnica que planteó el Prof. Seeman generó un gran avance en la nanotecnología basada en ADN ya que ha abierto un abanico de materiales de ADN flexibles de origen natural como tema central y subdivisiones como ADN decorado con nanopartículas, azulejos rígidos de ADN y origami de ADN, véase el diagrama de árbol en la figura 7. Esta última área comprende el tema central del presente proyecto de investigación [11].

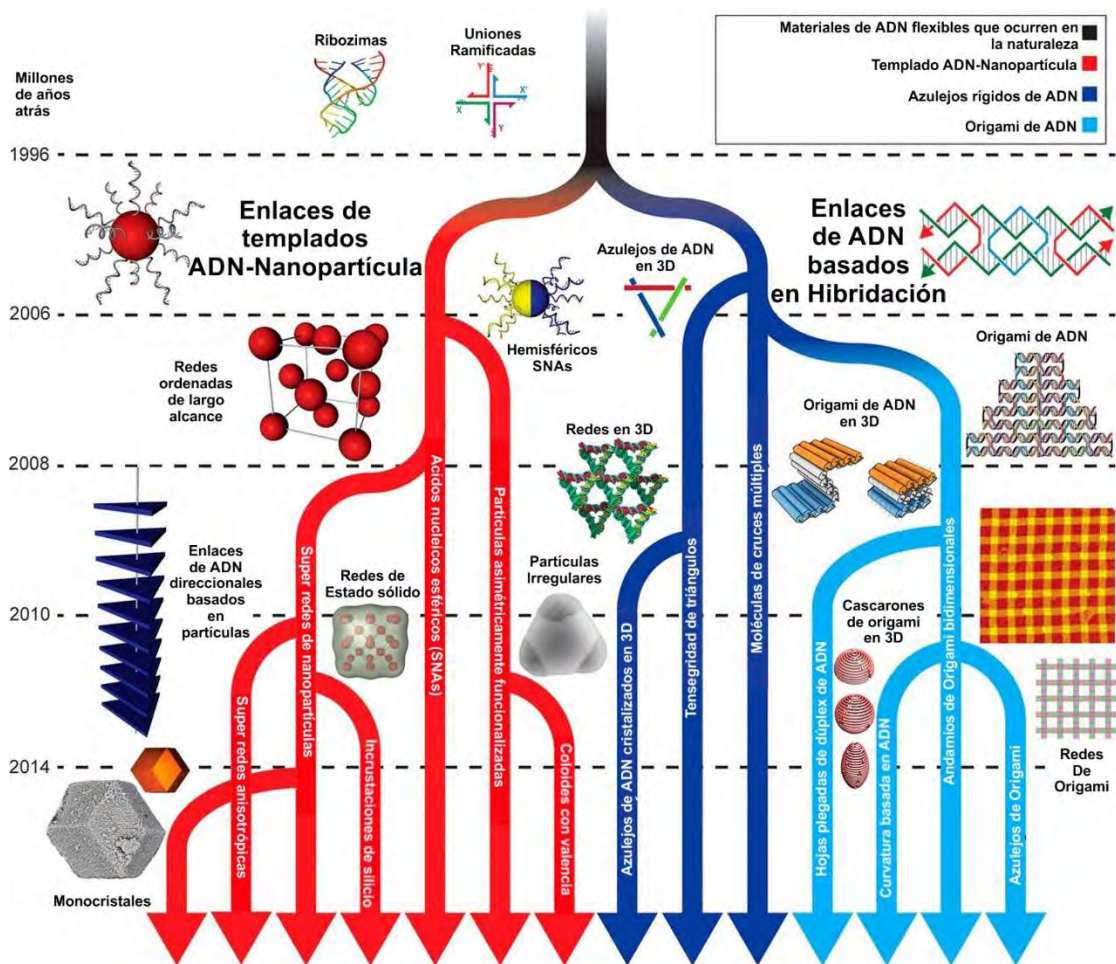


Figura 7. Desarrollo de nanotecnología basada en ADN (adaptado de [11]).

II.3. Principios y construcción de origami de ADN

Han transcurrido once años desde que Paul Rothemund presentó los principios generales de una técnica revolucionaria en nanotecnología basada en ADN, conocida como origami de ADN, donde en un solo paso (“one-pot”) se forman nanoestructuras de ADN. El Prof. Rothemund, inspirado en la combinación de la ciencia y el arte, desarrolló un método versátil que permite un control sin precedentes sobre las estructuras moleculares diseñadas. Los principios de la técnica de origami de ADN se dieron a conocer formalmente en el año 2006 [43].



Rothemund introdujo el tema mostrando diseños en computadora e imágenes de AFM de nanoestructuras en dos dimensiones como un rectángulo, una estrella y una cara feliz [13]. Utilizando el genoma conocido de un virus (*e.g.*, M13mp18 ssDNA) como “scaffold” (andamio), Rothemund diseñó varios fragmentos cortos de ADN, conocidos como “staples” (grapas), que fueran complementarias al andamio en lugares específicos. Al hacerlo de esta manera, el andamio se plegaba y doblaba sobre sí mismo hasta obtener el patrón de un diseño previamente programado. Posteriormente, en el laboratorio se lleva a cabo el proceso de “annealing”, por lo que se le da el nombre “one-pot”; en un tubo de PCR (“polymerase chain reaction” por sus siglas en inglés). En éste se mezclan el andamio y las “grapas” a concentraciones molares adecuadas en un “buffer” o solución amortiguadora para obtener la nanoestructura deseada por hibridación [13], como se muestra esquemáticamente en la figura 8. Al igual que el arte tradicional japonés de origami, donde una hoja de papel se dobla para crear una variedad de diseños, la técnica de origami de ADN pudiera verse del mismo modo, y de ahí el nombre de esta técnica [44].



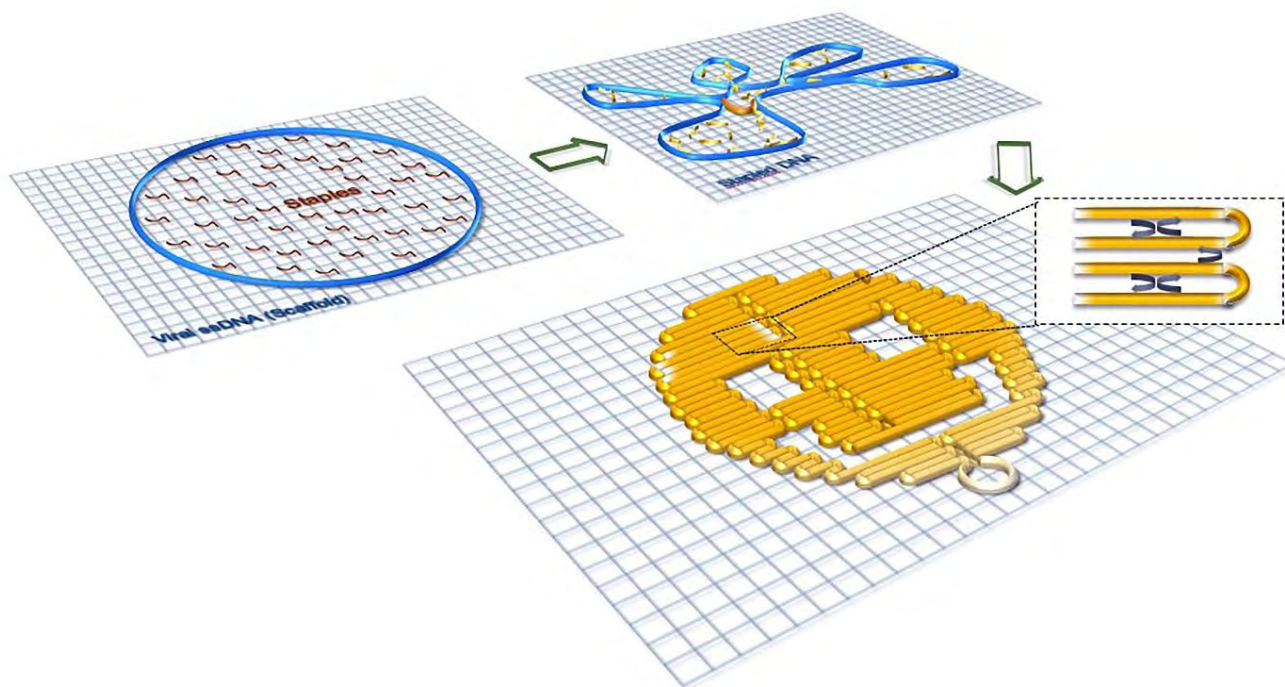


Figura 8. Representación esquemática de los pasos principales de la técnica de origami de ADN para crear una cara sonriente (adaptado de [45])

La técnica de Origami de ADN proporciona muchas características nuevas que no eran factibles anteriormente en la síntesis de nanoestructuras usando el concepto de brazos múltiples y dobles entrecruzamientos de ADN que se muestra en la sección II.2. Estas características son programabilidad, secuencia específica en estructuras grandes utilizando la direccionalidad de las bases nucleotídicas y el alto rendimiento en el auto-ensamble [46]. Además, el uso de dobles y triples entrecruzamientos contiene complejas reglas basadas en las propiedades del ADN y complejos pasos de titulación en el laboratorio. Los pasos de diseño y asignación de secuencias en las grapas para los primeros diseños fueron “hechos a mano”, como se muestra en la figura 9. El proceso era muy lento y estaba propenso a errores incluso a los más experimentados en la nanotecnología basada en ADN [47].

Afortunadamente, varias herramientas computacionales *ad hoc* se han desarrollado y probado actualmente para acelerar y hacer más eficiente el proceso de diseño mediante el análisis de la secuencia del andamio y grapas. Además, estos programas incluyen métodos de cálculo de las posiciones de cruce ideal entre hélices del ADN [48], lo cual permite concentrarse sólo en el diseño de cualquier idea que se tenga en mente.

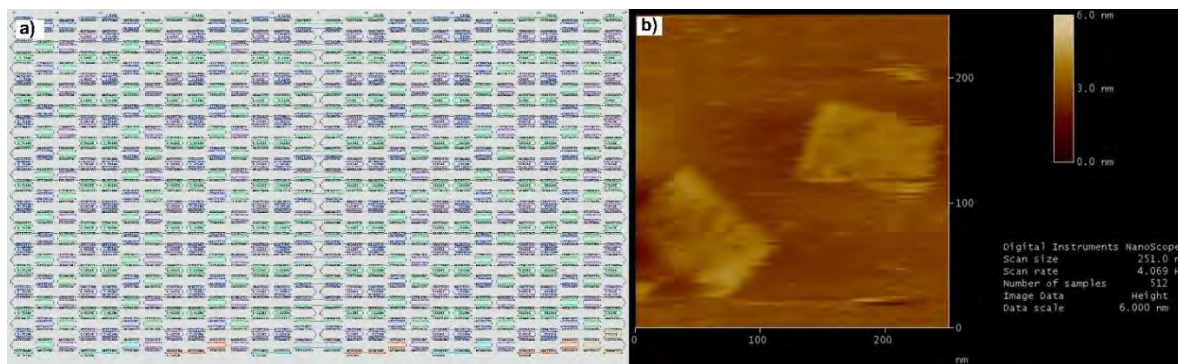


Figura 9. "Tall rectangle". a) diseño de nanoestructura con un programa de dibujo, e b) imagen de AFM correspondiente a la nanoestructura después de ser sintetizada.

Las herramientas más populares para el diseño de estructuras de origami de ADN son caDNAno, “Computer-Aided Design for DNA Nanostructures” por sus siglas en inglés, y CanDo, “Computer-aided engineering for DNA origami” por su acrónimo en inglés. Ambos softwares están disponibles en internet de manera gratuita. CaDNAno simplifica y mejora el proceso de diseñar nanoestructuras de ADN, sustituyendo el método tedioso y propenso a errores de utilizar programas de dibujo como Paint [49-51]. CanDo toma en cuenta la curvatura o torsión de modelos atómicos para determinar fluctuaciones térmicas que son determinadas por análisis numérico basado en el método de elemento finito, usando un software comercial llamado ADINA (“Automatic Dynamic Incremental Nonlinear Analysis” por sus siglas en inglés). Como resultado,



se obtiene una simulación mostrando deformaciones de la nanoestructura predicha por caDNAo por medio de fluctuaciones térmicas debidas a esfuerzos internos [49,51-52].

Las nanoestructuras de ADN que se han hecho con la ayuda de los softwares descritos anteriormente han mostrado grandes resultados experimentales. Sin embargo, la estabilidad de la estructura depende de diferentes factores que intervienen en la síntesis [14,53]. La síntesis de nanoestructuras de ADN se hace usando todo el plásmido del fago M13, o la tercera parte del genoma de este fago (también referido como mini-M13), como andamio [53]. El andamio y las grapas se mezclan en un “buffer” y se colocan en un termociclador usando una rampa de temperatura controlada para tener éxito en el proceso de “annealing” de las cadenas sencillas para obtener la estructura programada [13]. La figura 10 muestra tres nanoestructuras con geometría reconocible usando el mini-M13 como andamio.

El AFM, descrito en la sección III.1.3, se ha convertido en la técnica más popular para visualizar nanoestructuras de origami de ADN debido a que tiene la ventaja de que puede operarse bajo condiciones atmosféricas o, incluso, en líquidos, véase las imágenes en b, c, e, f, h, i en la figura 10. Además de que, la preparación de la muestra es un proceso sencillo. A su vez, la técnica de origami de ADN se ha convertido hoy en día en una plataforma prometedora para la organización y colocación de nanomateriales inorgánicos y orgánicos para aplicaciones en electrónica, fotónica, química y biomedicina debido a su capacidad de direccionalidad, control estructural y la posibilidad de organizar entidades moleculares con alta precisión [54].



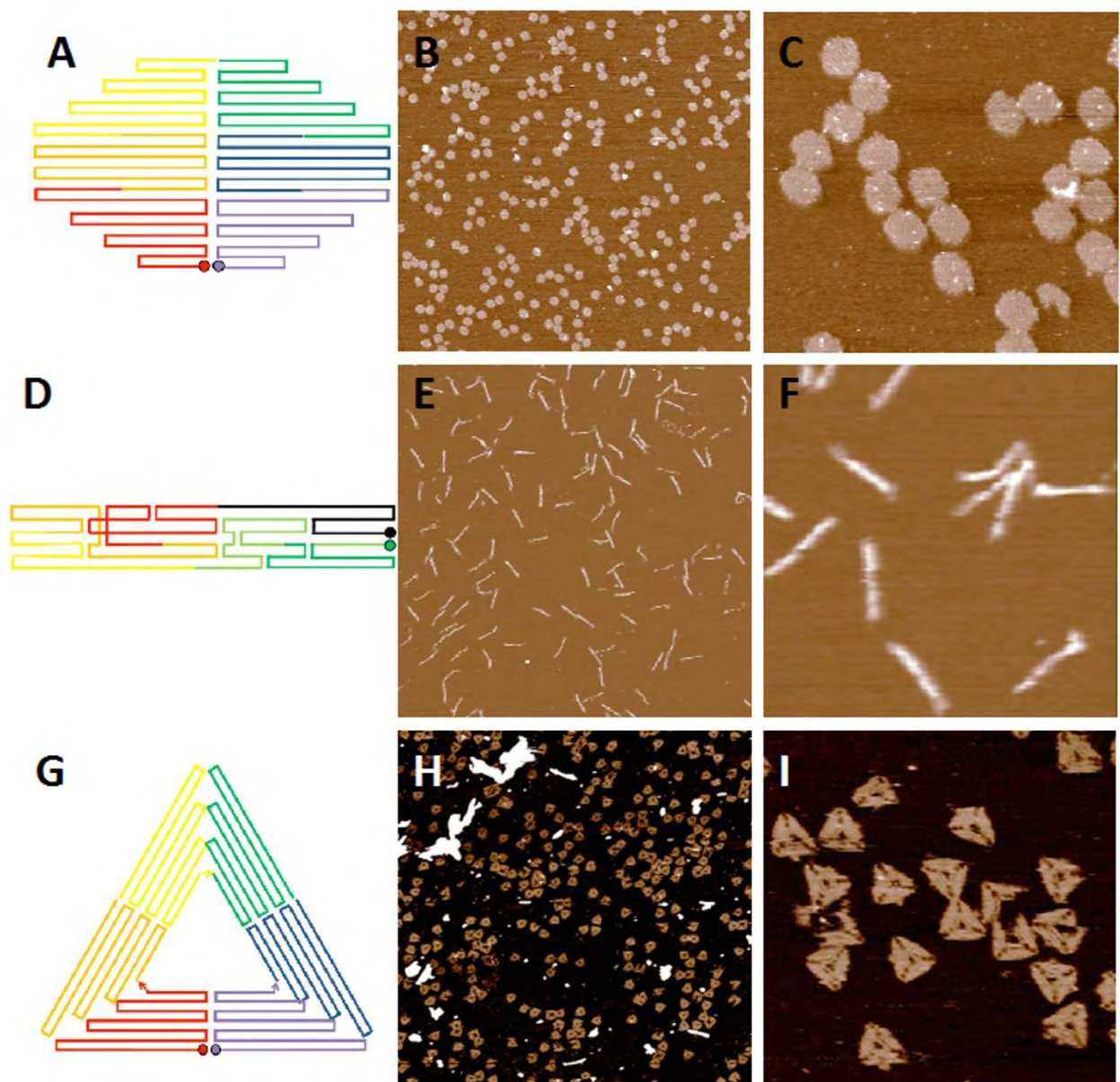


Figura 10. Tres diseños obtenidos por caDNAno de origami se muestran en el panel izquierdo: a) un círculo, d) un “spike” y g) un triángulo. Imágenes de AFM de $2 \times 2 \mu\text{m}$ correspondientes a los diseños de origami (b, e y h) e imágenes con un barrido de $500 \times 500 \text{ nm}$ (c, f, e i) para mostrar los detalles de su topografía.

II.4. Funcionalización con nanopartículas de oro

Como se mencionó en la introducción del capítulo I, la necesidad de fabricar dispositivos electrónicos y fotónicos funcionales a escala nanométrica ha llevado al desarrollo de dos estrategias principales para la creación de nanoestructuras metálicas haciendo uso del autoensamble de ADN: colocación de partículas preformadas en sustratos de ADN y metalización de ADN por técnicas de depósito químico. Si la organización de las biomoléculas es posible vía origami de ADN; por lo tanto, es posible reunir otros materiales por este medio también. Origami de ADN es un método que proporciona estabilidad, uniformidad y geometría específica de nanoestructuras que pueden ser utilizadas para otros procesos como la funcionalización.

La funcionalización de nanopartículas metálicas significa la modificación química de la superficie de la partícula debido a la creación de sitios activos. El conocimiento previo de la secuencia de origami de ADN hace posible enlazar nanopartículas de plata y oro (AgNPs y AuNPs) sobre su superficie en una posición y separación predefinidas. La estrategia de este método es extender las grapas específicas del sitio donde se desee fijar a la nanopartícula. Ahora bien, en caso necesario, es posible incrementar su tamaño, o incluso unir las, por medio de un procedimiento de metalización que cubra a las nanopartículas generando una estructura final que estará en función de la posición de las AuNPs y la distancia entre ellas. Existen kits de metalización disponibles comercialmente que se usan habitualmente y que contienen un iniciador, activador y moderador [14].



Cadenas sencillas de ADN se pueden hibridar explícitamente con sus cadenas complementarias para formar nanoestructuras compuestas por hélices de ADN. En particular, nanopartículas metálicas químicamente modificadas con secuencias de ADN pueden ensamblarse con su contraparte para formar nanoestructuras metálicas. Un método típico para modificar AuNPs y AgNPs es autoensamblar oligos de ADN tiolados a las nanopartículas de oro debido al fuerte enlace químico que existen entre ellos. Un enlace covalente a través del tiol o grupos amino de oligos de ADN ocurre debido a la gran afinidad de estos grupos químicos con Au y Ag. Las AuNPs se saturan de cadenas de ADN tioladas mostrando alta hibridación entre ellas. Este esquema fue desarrollado y reportado por Alivisatos P. *et al* en 1996 [55].

Además, origami de ADN proporciona una plantilla sin precedentes (o “pegboard”) para la fabricación de nanoestructuras metálicas de manera precisa y deseable. Yan *et al* han reportado una organización específica de AuNPs en estructuras de origami de ADN rectangulares y triangulares [56-57]. También encontraron que el uso de enlazadores (“linkers”) bivalentes tiol-Au aumenta el rendimiento de anclaje a la superficie del origami. Dos estudios recientes demostraron que las organizaciones quirales de AuNPs en origami exhibían efectos de dicroísmo plasmónico bien definido y dispersión óptica rotativa [58-59]. Este es un paso importante en la búsqueda de métodos factibles para fabricar nanoestructuras plasmónicas mediante un proceso de metalización.

Por otro lado, la literatura reporta varios procedimientos para modificar y convertir plantillas de ADN en nanoestructuras electrónicas funcionales; por ejemplo, nanohilos, transistores, bobinas, etc. La nucleación y crecimiento de “clusters” metálicos en ADN viral, por localización de un



agente reductor acuoso, es el enfoque principal de metalización de plantillas de ADN [14]. Braun y colaboradores han sido los primeros en construir y probar un nanocable de ADN conductor de nanopartículas nucleado por plata a través de un método de depósito no electrolítico [60].

Sin embargo, los nanohilos metálicos usando ADN como mediador, muestran con frecuencia falta de cristalinidad y uniformidad, morfologías de granos gruesos. La intención de esta sección es evidenciar la factibilidad de fabricación de estructuras bidimensionales con nanopartículas metálicas con aplicaciones potenciales en electrónica y fotónica. Arreglos de nanopartículas de oro en origami de ADN ya han sido reportados por varios grupos [14].

Se están desarrollando estructuras de origami de ADN como andamios para mejorar la fabricación de nanocables y otras nanoestructuras electrónica y ópticamente activas [61]. El posicionamiento y la colocación de nanoestructuras metálicas sobre un sustrato tecnológicamente útil, como silicio, son muy importantes para aplicaciones fotoelectrónicas. Recientemente se ha demostrado el control en la colocación de una estructura metálica básica sobre un sustrato de silicio [62].

En particular, el presente trabajo propone un procedimiento de funcionalización para la producción de estructuras metálicas complejas con dimensiones en la nanoescala y diseño programable. Como ejemplo de este procedimiento, la figura 11 muestra estructuras rectangulares de origami de ADN que fueron modificadas creando sitios de unión y adsorción sobre sustratos de óxido de silicio. Las



nanopartículas de oro funcionalizadas con una secuencia complementaria a los sitios de unión han demostrado ser altamente controlables. Como una prueba de este concepto, dos AuNPs fueron ubicadas en dos esquinas opuestas en el origami rectangular, como se muestra en la figura 12a. Este paso fue utilizado para desarrollar una metodología para la fabricación de nanoestructuras metálicas con geometrías complejas. Por ejemplo, un conjunto de AuNPs fue colocado en la superficie de origami del rectángulo para formar una "H", como se muestra en la figura 12b y alrededor del perímetro del rectángulo, anillo, como se muestra en la figura 12c. La figura 12d resume las cuatro variedades diferentes de AuNPs en la nanoestructura de origami rectangular, las barras de escala en las imágenes AFM son de 250 nm, incluyendo las cuatro esquinas y líneas paralelas, además de anillos y forma "H".

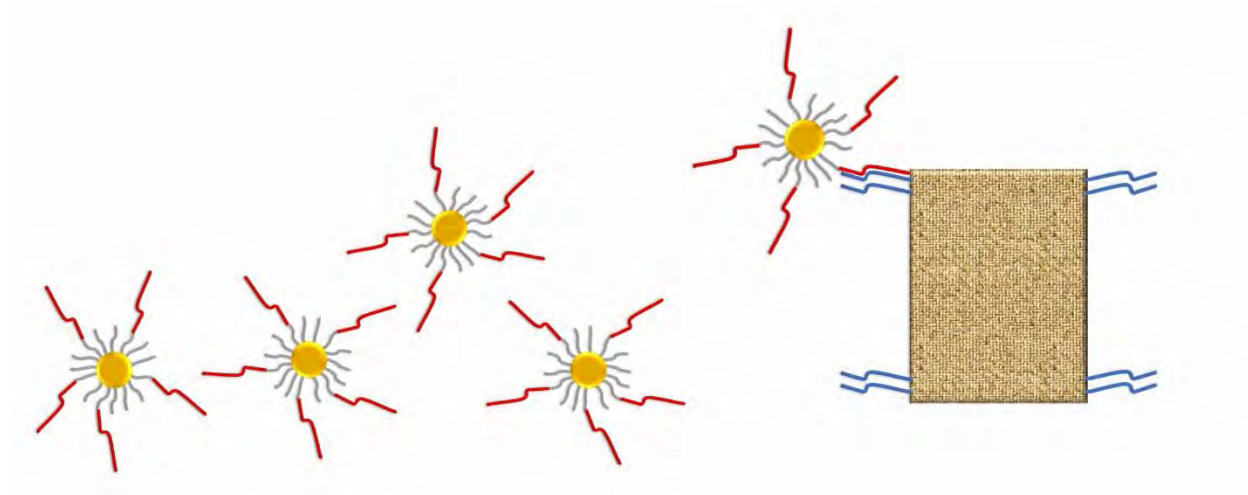


Figura 11. Funcionalización de AuNPs de origami de ADN. a) conjugados de AuNP-ADN se crean uniendo la secuencia complementaria (líneas rojas) de la AuNP *vía* enlace disulfuro. b) el bioconjugado se une a la superficie de origami para encontrar su secuencia complementaria (líneas azules).

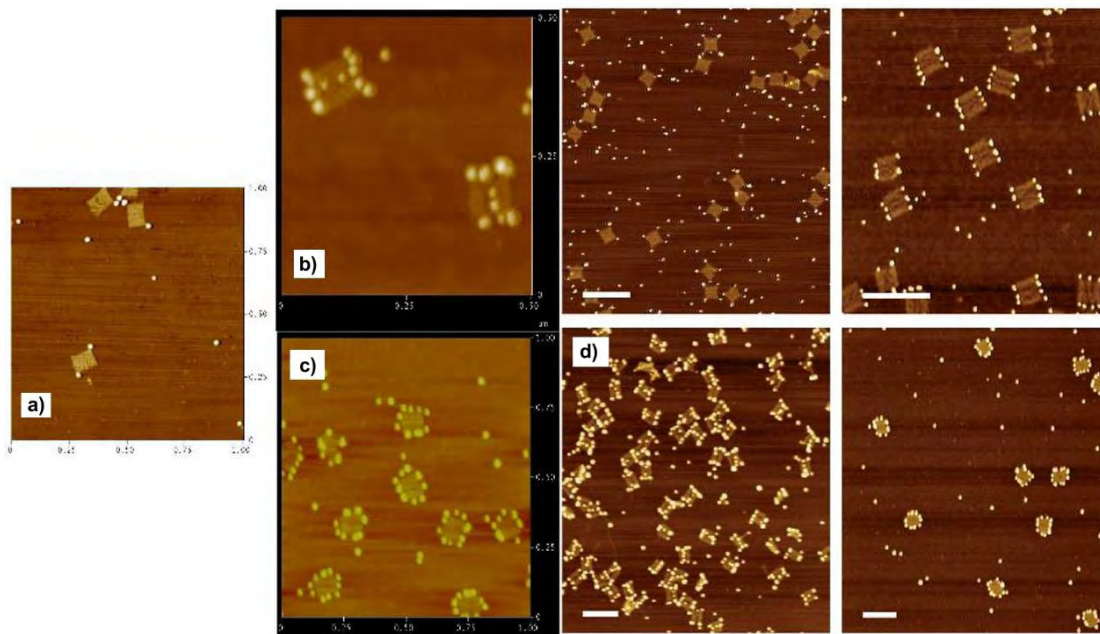


Figura 12. Diferentes arreglos geométricos de AuNPs de 5 nm en el "rectángulo". a) Dos AuNPs colocadas en dos vértices opuestos. b) AuNPs colocadas de manera tal que forman una "H". c) origami de ADN con AuNPs alrededor del perímetro (anillos). d) cuatro esquinas, barras paralelas, forma de "H" y los anillos forman en el "origami alto rectangular".

Como ya se mencionó, si se desea, es posible aumentar el tamaño de las nanopartículas, e incluso unir las, por metalización por depósito químico electrolítico de plata, como se esquematiza en la figura 13.



Figura 13. Metalización por reducción iónica de un origami de ADN funcionalizado sobre un sustrato. La reducción de plata o de oro que ocurre en la superficie de nanopartículas por metalización es tal que ocurre AuNPs vecinas incluso podrían unirse cuando estén lo suficientemente cercanas.

De esta manera, ha sido posible generar un nanocable metálico basado en el diseño de la forma de "H" (figura 12b), al utilizar una técnica de depósito no electrolítico de plata por medio de un agente reductor, como se muestra en la figura 14a. En general, la figura 14 exhibe una serie de imágenes de SEM en un intento por alambrear una nanoestructura metalizada con forma de "H" para llevar a cabo mediadas de transporte eléctrico. Las figuras 14b y c muestran a una de estas nanoestructuras antes y después, respectivamente, de una prueba de extender los contactos por medio del método de depósito de paladio inducido por la disociación de un organometálico usando un haz de electrones (EBID). La figura 14d es representada a través del esquema de la figura 15c mostrando los contactos de paladio en la nanoestructura metálica en un patrón hecho por litografía de haz de electrones (EBL).

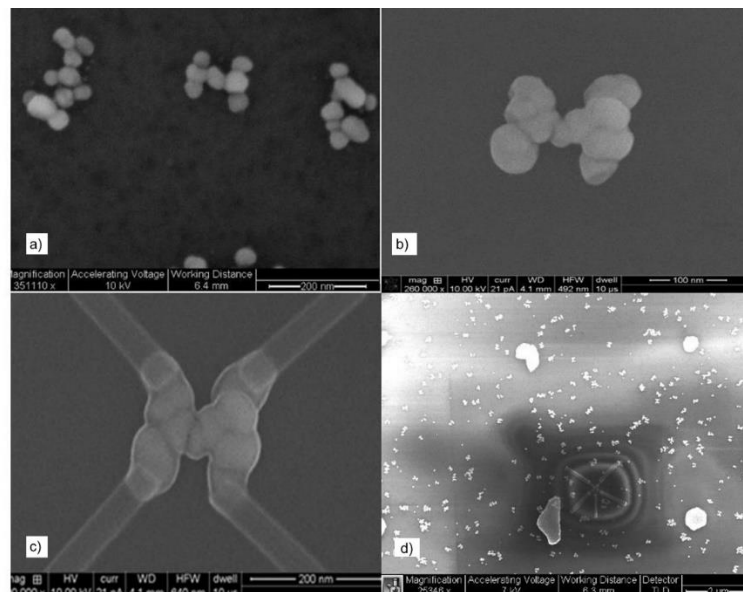


Figura 14. Conjunto de micrografías de SEM: a) nanoestructuras metálicas con forma de "H", b) ampliación de una de las nanoestructuras mostradas en a), un nanoalambre, c) La misma nanoestructura metálica que se muestra b) después de depósito de paladio inducido por haz de electrones para ser utilizados como extensiones para contacto eléctrico del nanoalambre, d) entorno que rodea a la estructura mostrada en c) después de aumentar la longitud de las extensiones pero ahora con oro y usando litografía.



Un posible proceso de integración de los métodos descritos anteriormente se esquematiza en la figura 15. La estructura particular que se muestra serviría como un transistor de un solo electrón (SET) [63] y podría utilizarse en circuitos bien diseñados para representar bits computacionales (1 o 0) por un electrón que se bloquea a la vez. En general, el esquema descrito podría adaptarse para a la fabricación de una diversidad de dispositivos electrónicos, resonadores, guías de onda y sensores, entre otros. Este proceso de biofabricación muestra la factibilidad en el uso de métodos biológicos en la manufactura de nanodispositivos, la técnica de origami de ADN parece ser un camino prometedor hacia la nanofabricación de dispositivos electrónicos a escala nanométrica.

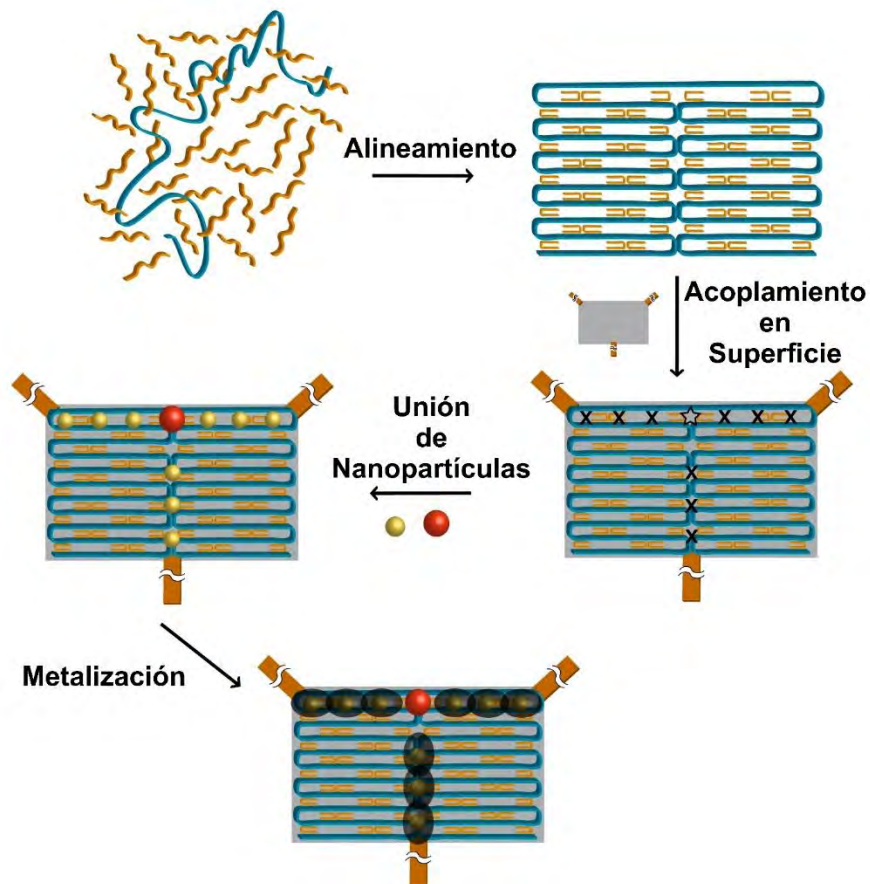


Figura 15. Esquematización de la fabricación de un transistor usando grapas de ssDNA y andamio para construir un origami de ADN de forma rectangular, funcionalización de AuNPs para su colocación de una forma estratégica, metalización y formación de contactos eléctricos.

II.5. Nanobobinas

Como se mencionó en el capítulo I la finalidad de este trabajo es la fabricación de una bobina a escala nanométrica capaz de crear un campo magnético perpendicular al plano de la bobina e intensidad constante en el centro. Estos dispositivos se pueden describir como una primera aproximación a partir del análisis de la corriente a través de una espira, bajo los principios físicos descritos a continuación.

El efecto del campo magnético, observado por primera vez por Hans Christian Orsted en 1819, puede verse como la fuerza que ejerce sobre una partícula cargada q que se desplaza a una velocidad \mathbf{v} en la vecindad de una espira, como se muestra en la figura 16. La expresión de este fenómeno se representa por medio de la ley de fuerza de Lorentz (Ec.1), donde \mathbf{F} representa la fuerza debida a un campo eléctrico \mathbf{E} y magnético \mathbf{B} sobre una partícula de carga q [64]:

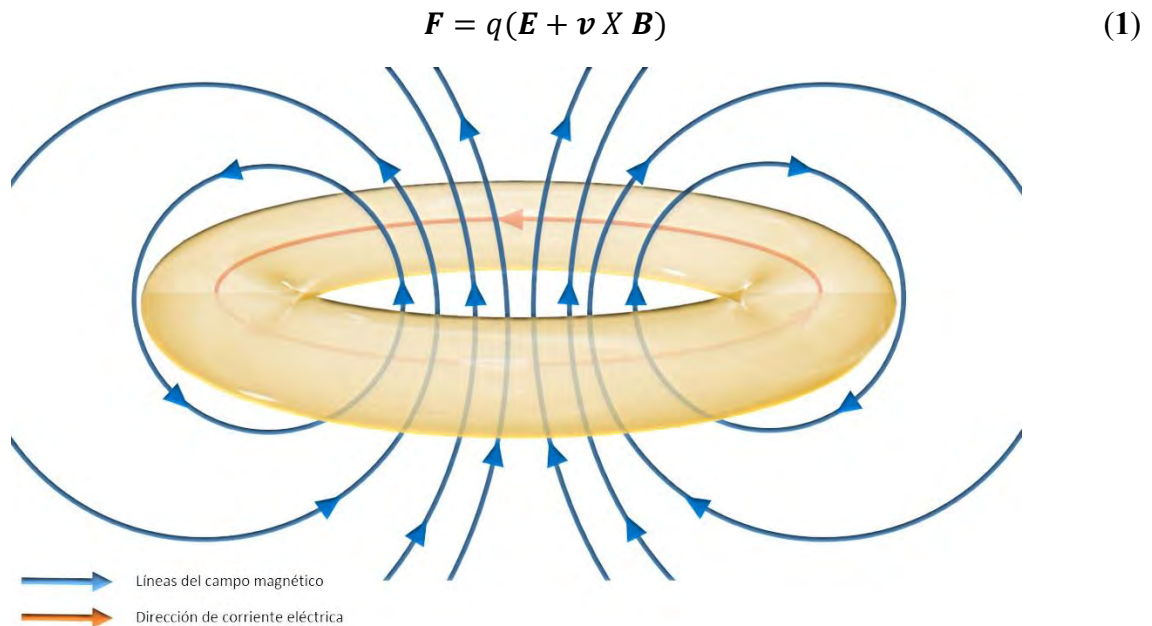


Figura 16. Vector del campo magnético \mathbf{B} de una carga que circula en una espira.

La ley de Biot y Savart estima el campo magnético producido por una intensidad de corriente I que circula por un conductor eléctrico circular. El campo magnético producido por esta espira circular en un punto arbitrario es muy difícil de calcular, debido a que las integrales son elípticas y no existe simetría; sin embargo, si sólo se consideran puntos sobre el eje de simetría, la expresión de B es relativamente simple. De modo que,

$$B_z = \frac{\mu_0 I}{2} \frac{a^2}{(a^2 + z^2)^{3/2}} \quad (2)$$

donde:

B_z es el campo magnético en un punto P

I intensidad de corriente

μ_0 constante de permeabilidad

a radio de la espira

z distancia en dirección axial del centro de la espira al punto P

La ecuación 2 es la expresión para el campo magnético total, de esta manera se describe el funcionamiento de una espira, que en este trabajo se propone sea de dimensiones nanométricas. El confinamiento de los electrones en estas nanobobinas, se espera que genere dispositivos más eficientes que los actuales [64-65].



CAPÍTULO III: TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

III.1. Técnicas experimentales

Gracias a la inspiración en la complejidad y capacidad de adaptación de los entes biológicos; la nanotecnología busca aprender e imitar a la naturaleza para reproducir formas y funciones de estos sistemas que controlen a la materia a escala nanométrica. Mientras que las estructuras van reduciendo su dimensión, los desafíos para caracterizarlas van en aumento [66]. Por lo que la elección de las técnicas de análisis y caracterización, permiten generar una estrategia para facilitar los procedimientos en la investigación. Entre otras cosas, la presente sección describe el principio y funcionamiento de varias técnicas experimentales empleadas en esta tesis. Las subsecciones III.1.1 y III.1.2 detallan los principios y usos más frecuentes de la cámara de electroforesis y el espectrofotómetro UV-Vis, respectivamente. La caracterización es uno de los pilares más importantes en este proyecto de tesis, dado que con ello se corrobora la formación de las nanoestructuras de origami de ADN, así como la funcionalización con nanopartículas de oro. Por lo que el uso del microscopio de fuerza atómica descrito en la sección III.1.3, hace que sea una técnica de visualización idónea para estudiar estas estructuras inmersas en un fluido.

III.1.1. Electroforesis

En el área de la biología molecular, existe una gran cantidad de técnicas que requieren el uso de la electroforesis, por lo que supone una parte importante del procedimiento sistemático del análisis (separación, purificación y preparación) de los ácidos nucleicos y las proteínas [67]. Gran parte de las biomoléculas poseen una densidad eléctrica específica y la separación es una función de sus distintas velocidades de migración sometidos a un campo eléctrico [68]. Dicho de otra forma,



cuando un campo eléctrico se aplica en una cámara de electroforesis, las especies con carga tendrán a moverse en el gel que se comporta como un tamiz molecular; la separación se produce cuando los cationes (iones cargados positivamente) se mueven hacia el cátodo y los aniones (cargas negativas) se mueven hacia el ánodo, en función de su tamaño y forma [69].

Esta técnica de gran versatilidad permite llevar a cabo separación y purificación de especies biológicas en diferentes tipos de solventes o geles, de tal manera que abre un abanico de clasificaciones y usos de los aparatos de electroforesis. Las más usuales son electroforesis vertical y horizontal. La primera es para geles de poliacrilamida donde su uso es casi exclusivo para purificar proteínas o separar cadenas de ADN pudiendo resolver del orden de unos pares de bases (ver figura 17a). La electroforesis horizontal (véase figura 17b) empleada usualmente para geles de agarosa para separar ácidos nucleicos. Dicho lo anterior, nos enfocaremos en el empleo de la cámara de electroforesis con el uso del gel de agarosa, ya que esta técnica proporciona actualmente el método más efectivo para análisis de alta resolución y separación de nanoestructuras de origami de ADN [70].

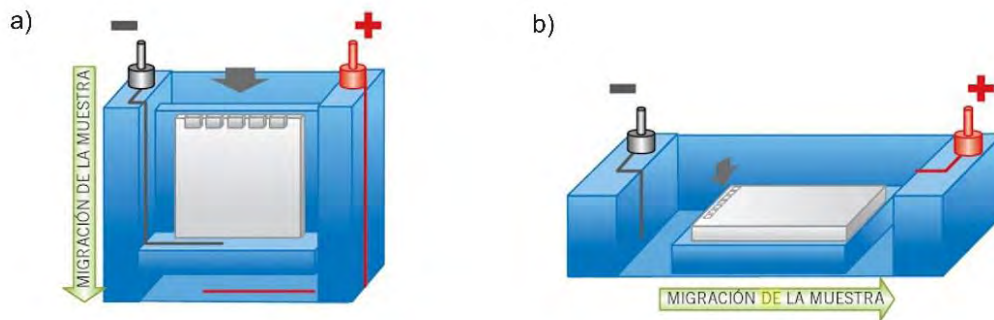


Figura 17. Esquema de cámaras de electroforesis indicando el sentido de migración de una muestra. a) vertical y b) horizontal [67].

En el caso de los geles de agarosa, que es una molécula lineal neutra y esencialmente libre de sulfatos, que consiste en cadenas repetidas de unidades alternadas β -1,3 D-galactosa y α -1,4 3,6-anhidro-L-galactosa. Tiene la propiedad de mantenerse sólido a temperatura ambiente y se torna líquida a temperaturas mayores a 50 °C y se solidifica cuando se enfría en una base perfectamente nivelada formando un gel altamente poroso. Las concentraciones varían dependiendo de la muestra, usualmente a concentraciones de agarosa entre el 1% al 3%, ya que de eso depende la porosidad del gel. Por otro lado, la sustancia amortiguadora o “buffer”, también conocida como solución de tapón, cumple un rol fundamental ya que sin ella no existiría un corrimiento en el gel, ya que proporciona el medio electrolítico para el paso de la corriente eléctrica mientras se realiza el experimento.

En el caso de la separación de ácidos nucleicos, pueden emplearse TBE (Tris, Borato, EDTA) o TAE (Tris, Ácido Acético, EDTA) como “buffer” ya que éste evita que el gel se seque como consecuencia del calentamiento producido por la corriente [71]. Dentro de este orden de ideas, en la figura 18 se aprecia el proceso de electroforesis que comprende las siguientes etapas: a) preparación del gel de agarosa y colocación en la cámara, b) imagen típica de la fuente de poder donde se seleccionan las condiciones experimentales tales como el voltaje, amperaje y tiempo, c) se ejemplifica la forma correcta de poner la muestra en el gel ya inmerso en el “buffer”, y d) esquema de un gel de agarosa, con ácidos nucleicos y “ladder”, después haber efectuado el corrimiento [67].

Existen diversas formas para visualizar geles de electroforesis; una de ellas es usar colorantes como el colorante 6 × Orange, tinte de carga que se utiliza como marcador para el seguimiento visual de



migración del ADN durante la electroforesis. El bromuro de etidio (EtBr) es una sustancia química ampliamente utilizada como agente intercálate, su uso reside en las propiedades fluorescentes del compuesto que se intercala cada 2.5 pares de bases por fuerzas Van der Waals [72]. Las visualizaciones de geles teñidos con estas sustancias son comúnmente analizados con un fotodocumentador de luz ultravioleta.

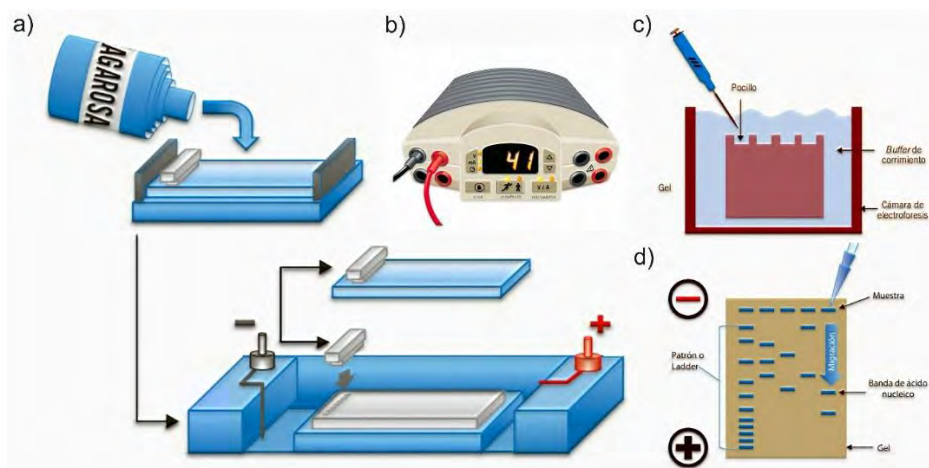


Figura 18. Esquematación de cámara de electroforesis vertical que consiste de: a) cámara, b) fuente de poder, c) procedimiento de colocación de muestra y d) representación de corrimiento de gel (adaptado de [67]).

El cuidado, preparación y manejo repercute en la precisión de los resultados, por ello es necesario conocer cada uno de los componentes y procedimientos de la cámara de electroforesis. En síntesis, la aplicación básica de esta técnica es la separación de fragmentos de ADN en la muestra y visualización para comprobar aspectos como el tamaño, la concentración y la formación de algún compuesto. A su vez, los fragmentos de interés pueden purificarse a partir del gel mediante diferentes técnicas de extracción y utilizarse para diferentes propósitos (separación de exceso de cadenas sencillas de ADN del origami, exceso de grapas en nanopartículas de oro tioladas, exceso de AuNPs en origami funcionalizado, etc.).



III.1.2. Espectrofotómetro UV-Vis

Esta técnica es casi enteramente utilizada para el análisis cuantitativo; es decir, la estimación de la cantidad de un compuesto que se encuentra presente en una muestra. Es una técnica de uso general que durante los últimos 35 años se ha convertido en una de las técnicas analíticas modernas más importantes en el laboratorio ya que presenta gran simplicidad, versatilidad, velocidad, precisión y rentabilidad [74]. Esto la ha convertido en una de las técnicas de análisis y caracterización ubicuas en la ciencia.

Esta técnica es casi enteramente utilizada para el análisis cuantitativo; es decir, la estimación de la cantidad de un compuesto que se encuentra presente en una muestra. La espectrometría abarca mediciones en un rango espectral ultravioleta-visible aproximado de 200 a 700 nm [73]. El intervalo de análisis de esta técnica permite medir una variedad de tipos de muestras como péptidos (205nm), DNA y RNA (260nm), proteína purificada (280nm), tintes industriales (490nm), nanopartículas de oro (520nm), etc. Cabe recalcar que esta técnica se basa en la ley de Beer-Lambert para calcular la concentración de las muestras [74].

Esta ley establece que cada capa de igual espesor de un medio material absorbe una fracción igual de la energía radiante que la atraviesa. La fracción de energía radiante transmitida por un espesor dado del medio absorbente es independiente de la intensidad de la radiación incidente, siempre que la radiación no altere el estado físico o químico del medio. Por lo tanto, cuando se toma la lectura de una muestra se registra la intensidad de la luz que se transmitió a través de la muestra con respecto al blanco, intensidad de luz incidente, de acuerdo con la siguiente ecuación:



$$I = I_0 e^{-\alpha x} \quad (2)$$

donde:

I , I_0 , son las intensidades incidente y transmitida, respectivamente.

$A = \alpha x = \epsilon c l$, es la absorbancia que puede calcularse también como:

$$A = -\log \left[\frac{I (\text{Intensidad de la muestra})}{I_0 (\text{Intensidad del blanco})} \right]$$

x, l , es la longitud que atraviesa por la luz en el medio (cm).

c , es la concentración (M).

α , es el coeficiente de absorción (A).

ϵ , es el coeficiente de extinción L/mol-cm.

Una de las aplicaciones más útiles de la ley de Beer-Lambert en técnicas de biología molecular es en el equipo comercial NanoDrop de Thermo Scientific (ver figura 19), donde una de las características plausibles de este equipo es que las mediciones se llevan a cabo en un pedestal requiriéndose de sólo 0.5 – 2 μ L de volumen de la muestra. Teniendo en cuenta estas ventajas de este sistema, se seleccionó para conocer la concentración de ADN y nanopartículas de oro.





Figura 19. a) Equipo de espectrofotometría comercial NanoDrop 2000c de Thermo Scientific, b) detalle mostrando la forma en que se carga la muestra en el pedestal del NanoDrop, c) y d) procedimiento automático para lectura de muestra [74]).

III.1.3. Microscopia de fuerza atómica

El microscopio de fuerza atómica, mejor conocido como AFM (Atomic Force Microscope, por sus siglas en inglés) es un instrumento muy utilizado para la visualización de superficies de materiales en la escala micro- y nanométrica, véase figura 20, en aire y en fluido. Fue desarrollado en 1986 por Binnig, Quate y Gerber como una colaboración entre IBM y la Universidad de Stanford partiendo del concepto básico de funcionamiento del STM (Scanning Tunneling Microscope, por sus siglas en inglés) [75]. Este método ha permitido aplicaciones en varios campos de la ciencia tales como: materiales, ciencias de la vida, polímeros, biofísica, biotecnología y nanotecnología.

Pero, ¿cómo determina el AFM la topografía de una muestra? Metafóricamente hablando, al igual que un ciego determina patrones y/o estructuras, el AFM “ve” la morfología de una muestra por



medio del tacto. La diferencia es que mientras el sentido del tacto depende de la sensibilidad de las yemas de los dedos como herramienta de contacto con las terminaciones nerviosas como sensores, el AFM depende de un conjunto de componentes tales como láser, fotodetector, cantiléver con punta, piezoeléctrico, controlador y computadora. El AFM tiene dos modos básicos de rastreo para la caracterización de la superficie de una muestra, “contact mode”, contacto permanente, o “tapping mode”, contacto intermitente o de resonancia [75].

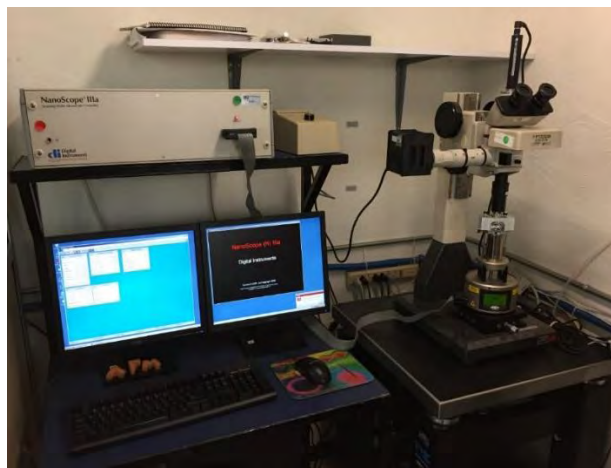


Figura 20. Imagen de un microscopio de fuerza atómica.

Los principios básicos por los que se rige un AFM pudieran parecer bastante sencillos; sin embargo, la ingeniería y la física que existe detrás de su funcionamiento lo convierten en un instrumento muy sofisticado y preciso. La figura 21, muestra un bosquejo de la operación en el modo “tapping”, que es el utilizado en la visualización de las muestras del presente trabajo, incluyendo el movimiento controlado de la muestra por medio de un piezoeléctrico. En la observación por medio del modo “tapping” en aire, la punta en el cantiléver vibra sinusoidalmente con una frecuencia de resonancia entre 70-400 kHz y una amplitud constante en el rango de 20-100 nm al acercarse a la superficie de la muestra [76-77].



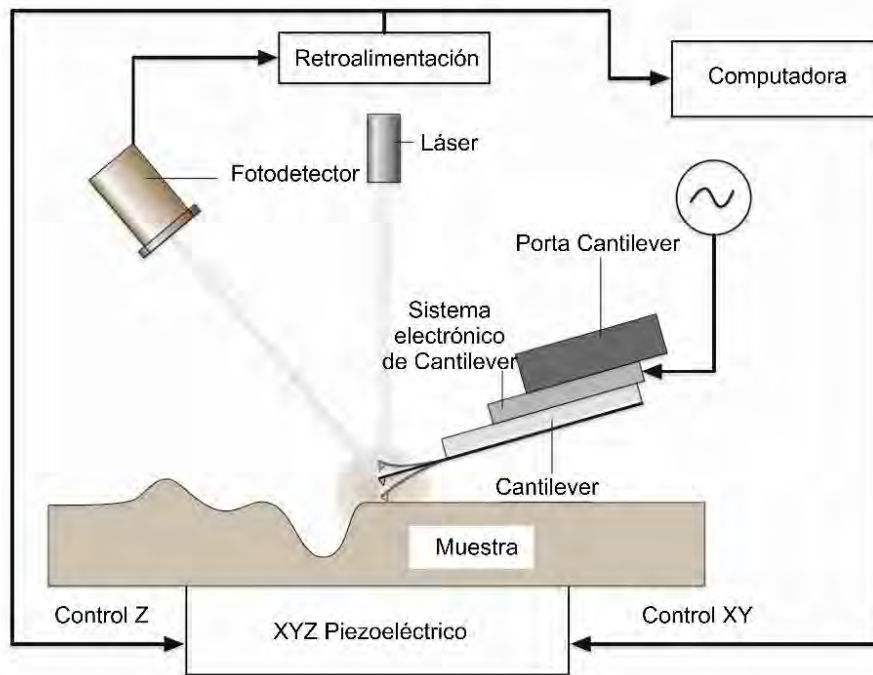


Figura 21. Esquema de operación del AFM en modo “tapping” [77].

En otras palabras, la topografía superficial se mide por la reflexión del láser que se centra en la cara posterior del cantilévver con un fotodetector (fotodiodo) de cuatro cuadrantes (A, B, C, D). La señal $(A+B)-(C+D)$ es una medida de flexión, mientras la señal $(A+B)-(B+D)$ es una medida de torsión del cantilévver. Esos pequeños cambios en el ángulo del cantilévver se traducen en grandes cambios en la posición del punto laser en el fotodiodo, escaneando lateralmente la muestra bajo la punta mientras que simultáneamente se mide la fuerza dependiente de la separación o gradiente de fuerza entre la punta y la superficie, tal como se muestra en la figura 22 [66].

El piezoeléctrico, también conocido como escáner, es un material ferroeléctrico no-lineal conectado a un sistema de retroalimentación que dependiendo del voltaje, y donde éste se aplique, responde con movimientos en los ejes X, Y y Z. Estos movimientos del piezoeléctrico

corresponden a desplazamientos en la superficie de la muestra en el plano X - Y, siendo Z la dirección de aproximación de la punta [78].

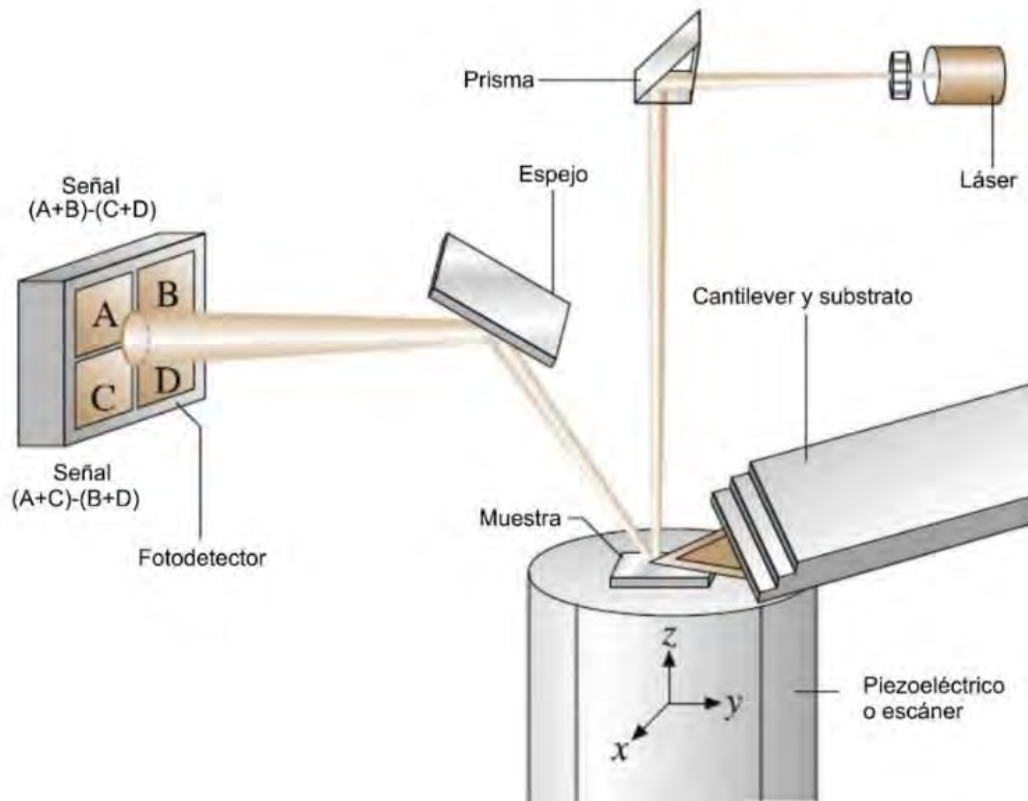


Figura 22. Principios de operación de un AFM [77].

La resolución en el AFM a diferencia de otros microscopios está dada principalmente por la punta que se utilice. Las más convencionales son las puntas de nitruro de silicio con un radio de curvatura de entre 30 a 50 nm [79]. La figura 23 muestra una diversidad de cantilévers con sus correspondientes puntas con diferentes geometrías y radios de curvatura: a) cantiléver triangular con punta cuadrada piramidal de SiN_4 , b) cantiléver rectangular con punta cuadrada piramidal echa de un solo cristal de silicio, y c) cantiléver rectangular de acero con punta de diamante piramidal con tres lados.

Por ejemplo, en muestras biológicas se pueden tomar imágenes en cualquiera de los dos modos ya descritos del AFM, pero debido a que estos materiales son sumamente delicados, tanto en fluido como en aire, las fuerzas que son ejercidas sobre la muestra con la punta en modo contacto permanente pudiera comprimir, desgarrar, o removerlo de la superficie. Caso contrario con el modo contacto intermitente, “tapping”, que en fluido presenta la ventaja de reducción de las fueras de corte, permitiendo que la muestra no sufra modificaciones [80-81].

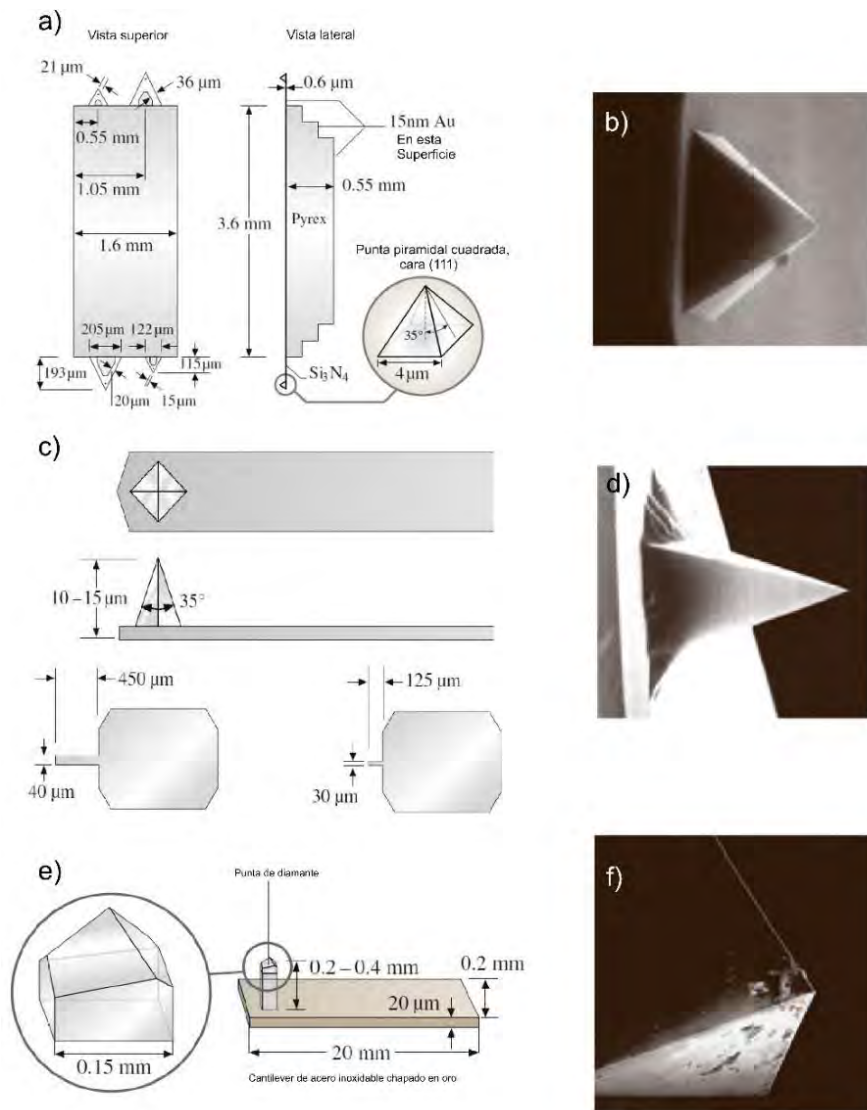


Figura 23. Dibujos mostrando diferentes cantilévers: a) triangular, c) rectangular sin esquinas y e) rectangular. Las micrografías en SEM correspondientes a cada uno de estos cantilévers se exhiben en las micrografías realizadas en SEM en b), d) y f). (Figura adaptada de [77]).

Por lo tanto, “tapping mode” es el modo más comúnmente usado para capturar imágenes de materiales muy blandos utilizando una celda de fluido como la que se observa en la figura 24. Este tipo de celdas se ha utilizado con éxito para reproducir imágenes como muestras de polímeros, proteínas y ácidos nucleicos, así como otras numerosas muestras frágiles húmedas. De aquí que la selección de modo de operación, puntas y otros parámetros en el AFM, hacen de éste una herramienta con gran poder de resolución para caracterizar las nanoestructuras de origami de ADN.

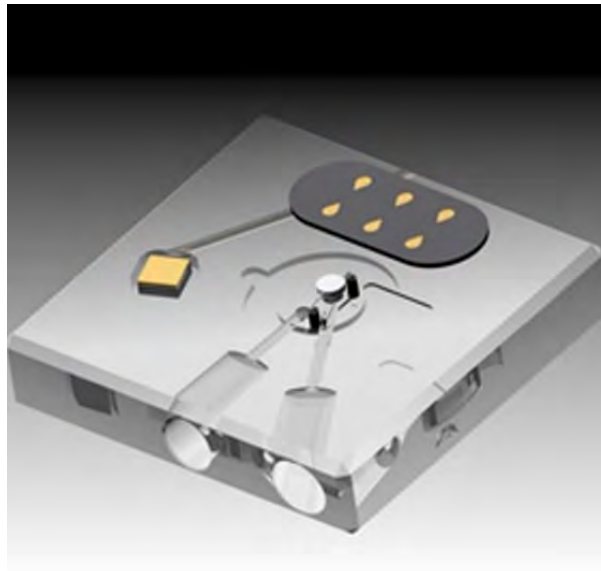


Figura 24. Celda de fluido modelo MTFML-V2 de la compañía Bruker AFM Probes.

III.2. Procedimiento experimental

Aunque el título de esta sección se refiere al procedimiento experimental, en realidad comprende una combinación de uso de software y técnicas experimentales para el diseño, síntesis y caracterización de las nanobobinas utilizando la técnica de origami de ADN como un método de construcción. La figura 26 resume por medio de un diagrama de flujo las etapas para la fabricación de nanoestructuras de origami de ADN. Las etapas que involucran el uso de software van desde a) la concepción de la idea, b) el diseño en caDNAno y c) la simulación en CanDo. Estas simulaciones se retroalimentan entre sí para asegurar que la nanoestructura tenga diseño y estabilidad óptima. Los siguientes incisos son meramente experimentales desde d) la síntesis por “annealing” en un termociclador, previamente habiendo obtenido las grapas necesarias para el origami, hasta e) la visualización de las estructuras por AFM en una celda de fluido.

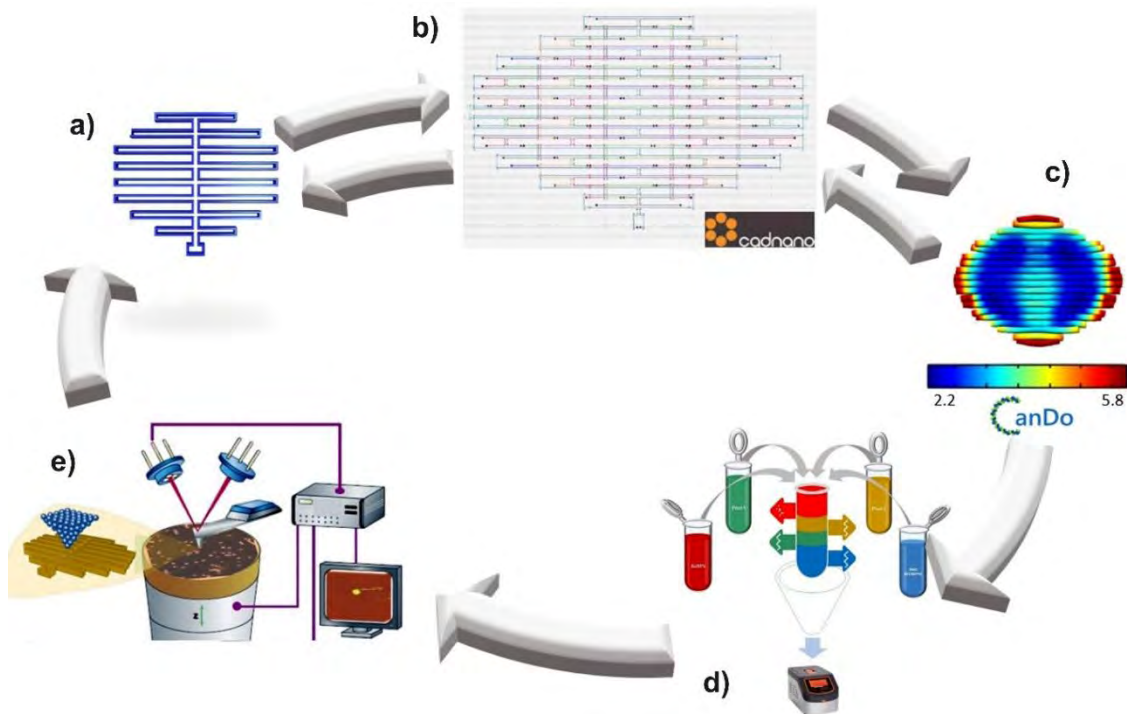


Figura 25. Diagrama de flujo mostrando las diversas etapas para la fabricación de nanoestructuras por la técnica de origami de ADN. a) boceto o idea, b) diseño en caDNAno, c) simulación en CanDo, d) “annealing” y e) visualización en AFM (Forma adaptada de [82]).



En esta sección donde se describen los procedimientos experimentales para fabricar nanoestructuras de origami de ADN, se subdivide en 7 secciones. La sección III.2.1 corresponde al diseño de nanobobinas en caDNAno y simulación en CanDo, en donde se consideró criterios mencionados en el capítulo II, posteriormente se detalla el proceso realizado para la resuspensión de grapas (sección III.2.2). De igual forma se planteó protocolos como: elaboración de “pools” (sección III.2.3), “annealing” o recalentado de origami de ADN en la sección III.2.4, preparación de grapas tioladas (sección III.2.5), tratamiento de nanopartículas de oro en la sección III.2.6 y “Freeze and Squeeze” (sección III.2.7). Con el propósito de realizar una congruente discusión de resultados, la etapa de visualización en AFM se encuentra en el capítulo IV.

III.2.1. Diseño de Nanobobinas en caDNAno y simulación en CanDo

La manipulación de la materia a escala nanométrica abre la posibilidad de diseñar una infinidad de formas y estructuras con características específicas para fines específicos. Tal es el caso del presente trabajo, donde la técnica de origami de ADN nos permite manipular a dicha escala características que se limitan a las reglas mencionadas en la sección II.3. Para el proceso de diseño del nanomaterial se basó en el procedimiento descrito en la sección II.4 para lo cual se realizó un boceto que fuese lo más cercano a una geometría circular y plana (es decir con un grosor no mayor al mismo diámetro de las hélices de ADN) como se puede observar en la figura 26a.



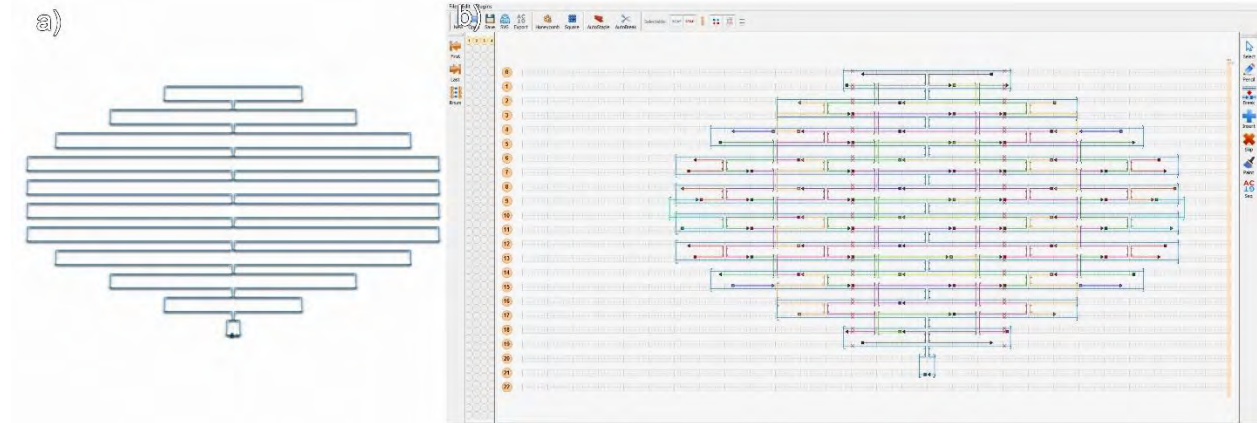


Figura 26. a) Boceto de círculo y b) diseño de círculo en el software caDNAno.

Posteriormente, con la asistencia del software caDNAno se realizó el diseño del círculo y grasas para formar la nanoestructura utilizando la plantilla de red cuadrada (“square lattice” en inglés como se muestra en la figura 26b para poder obtener una estructura en 2D. Cabe señalar que el diseño se basó en el uso de la tercera parte del bacteriófago M13mp18, conocido en el área como Mini-M13 (2,404 b), el cual fue desarrollado por Brown, *et al* en 2015 como andamio (“scaffold”) para formar origami de ADN a menor escala con geometría reconocible. En la periferia de la nanoestructura se anuló algunas bases no sólo para dar una forma circular, sino también, para evitar interacciones entre las nanoestructuras de ADN. Posteriormente, se realizaron simulaciones para conocer la estabilidad de la nanoestructura con el uso software CanDo. La simulación mostro que la nanoestructura más estable corresponde a fluctuaciones térmicas que oscilan entre 1.1 a 2.8 nm (figura 27 a, b y c). Una vez obtenido el diseño optimizado, se procedió a ordenar las grasas necesarias para la conformación de la nanoestructura.



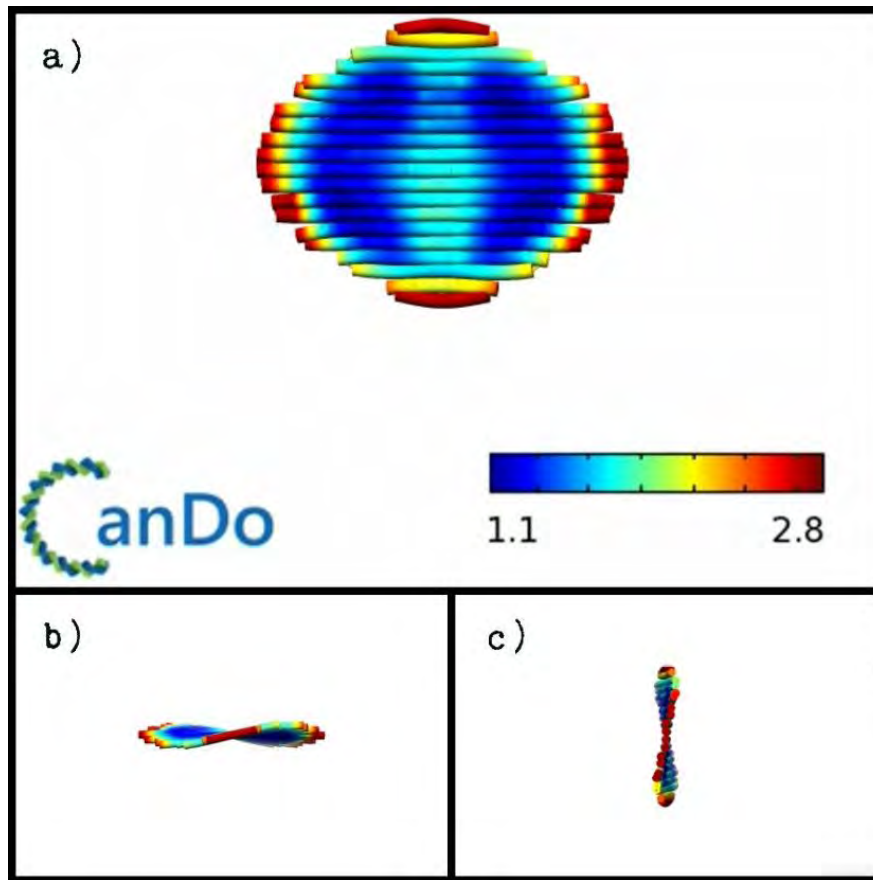


Figura 27. Simulación obtenida por CanDo de la estructura circular de origami de ADN. a) Vista frontal, b) vista horizontal y c) vista lateral mostrando fluctuaciones térmicas.

Además, el posicionamiento de las grapas se realizó pensando en la funcionalización, ya que ciertas grapas debían de cumplir una longitud de mínimo 16 pb unidas al andamio con la finalidad de extenderlas y tengan mayor amarre con la estructura. Para ello fue necesario calcular las distancias aproximadas entre centro y centro de cada nanopartícula (para evitar problemas estéricos con las AuNPs). Ya que conocemos la longitud por el número de pares de bases y el ancho está dado por el diámetro del ADN (~ 2 nm), donde también se considera el gap entre hélices (~ 1 nm) [2]. En base a lo que se muestra en la figura 28 la selección de las 20 grapas que fueron extendidas (ver apéndice D) en donde cada nanopartícula tiene una separación aproximada de 25.5 a 26.7 nm y un diámetro de la nanoestructura de 50 nm fundamentado en lo dicho anteriormente.



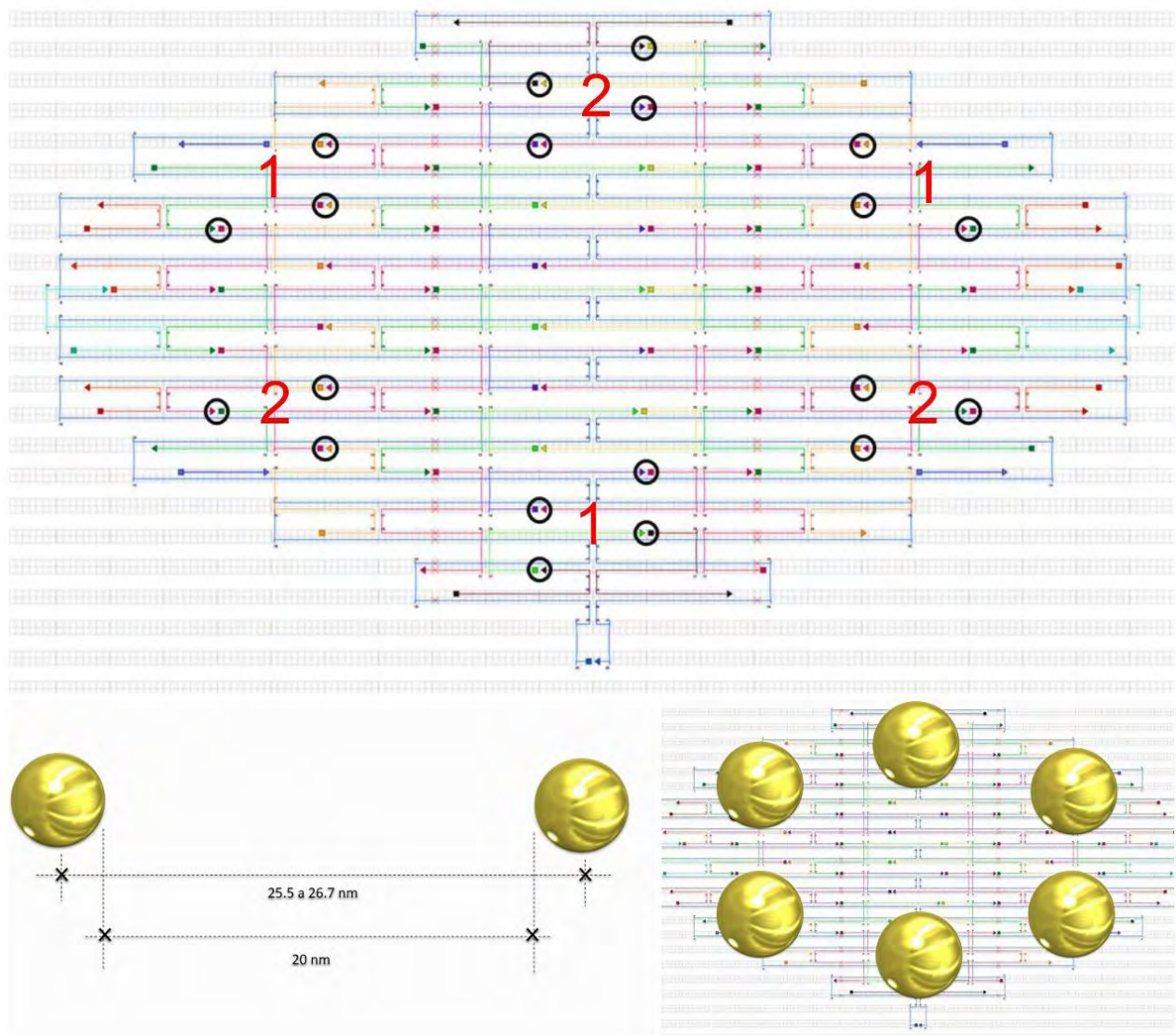


Figura 28. Grapas seleccionadas para funcionalizarlas y distancias entre nanopartículas (la numeración indica las diferentes secuencias utilizadas).

Dichas grapas se extendieron en dirección $3' \rightarrow 5'$, Grapa TTTT TAA TAA TAA TAA TAA y en dirección $5' \rightarrow 3'$, Grapa TTTT AAA AAA AAA AAA AAA. Donde las primeras cuatro timinas (T) cumplen la función de “espaciador” entre la nanoestructura y la nanopartícula. La secuencia posterior a las timinas, se basa en la idea de Kuzyk, *et al*, donde en su artículo “Autoensamblaje



basado en ADN de nanoestructuras plasmónicas quirales con respuesta óptica adaptada” diseñaron dicha secuencia con la finalidad de lograr altas probabilidades de unión antiparalela de AuNPs a las estructuras de origami de ADN. A su vez las grasas complementarias a las extendidas corresponderán en dirección contraria es decir: para la secuencia de 3' → 5' en las AuNPs será de 5' → 3', ATT ATT ATT ATT ATT TTTT- SH y para la secuencia 5' → 3' en las nanopartículas corresponderá de 3' → 5', TTT TTT TTT TTT TTT TTTT- SH, tal como se muestra en la figura 29 [59].

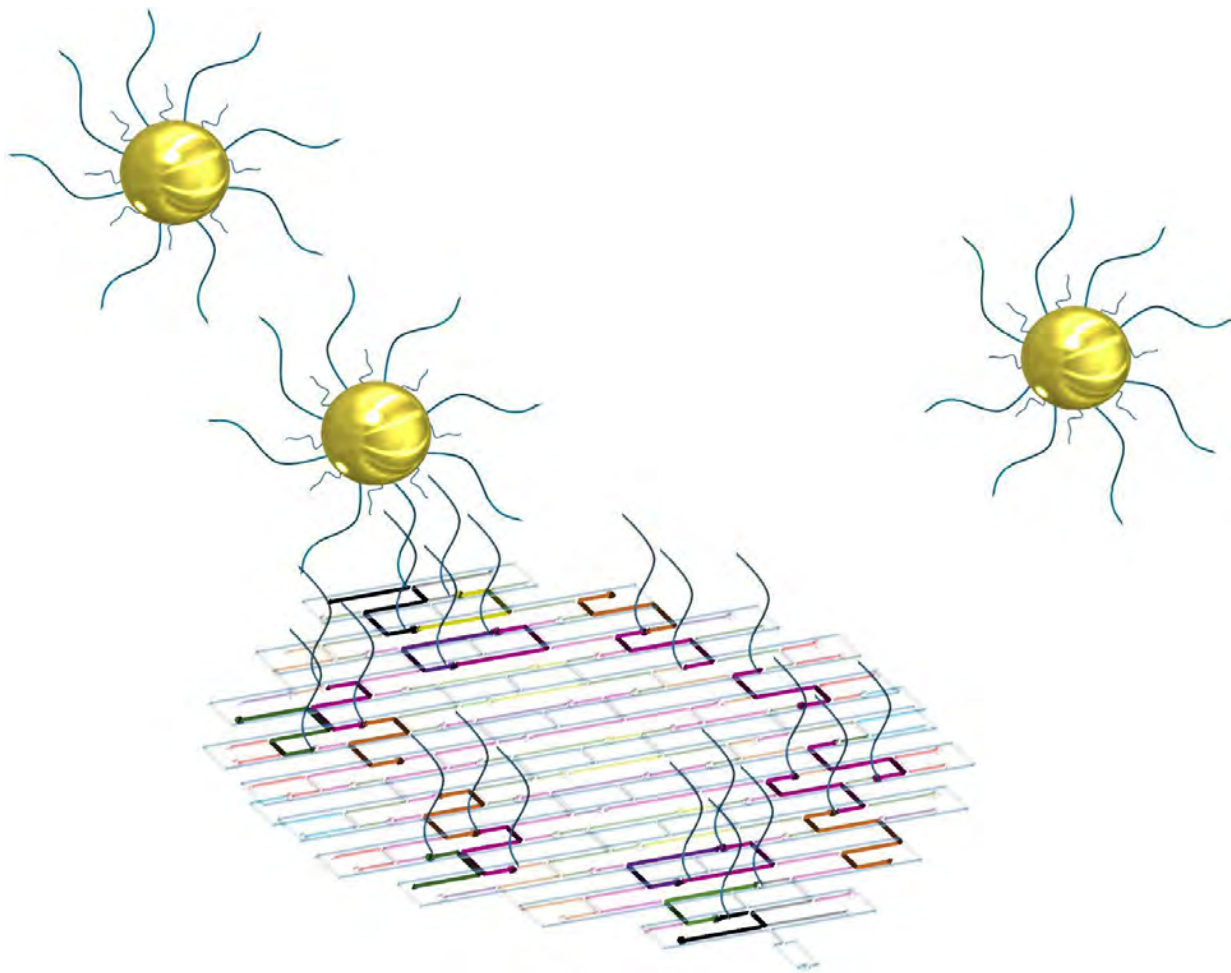


Figura 29. Esquematización de funcionalización de origami de ADN con AuNPs.

III.2.2. Resuspensión de grapas

Uno de los primeros procedimientos en la técnica de origami de ADN es la resuspensión de las grapas previamente ordenadas a la compañía IDT (Integrated DNA Technologies), éstas están sujetas a sufrir cambios de temperatura por evaporación o sublimación desde el envío hasta el almacenamiento a - 20 °C. Por ello, fue de vital importancia verificar la concentración de cada una de las grapas, donde el procedimiento constó de lo siguiente:

- Se tomaron las grapas del congelador (- 20 °C) usando guantes de nitrilo y se dejaron a temperatura ambiente en un agitador TekTrator[®] V tipo shaker a 120 rpm hasta descongelar cada uno de los tubos.
- Posteriormente, se verificó que cada uno de los tubos no tuviera gotas en las tapas, por lo que se centrifugaron a 500 g por 2 minutos en una centrifugadora Sorvall[™] Legend[™] XTR de Thermo Scientific, hasta asegurar que todo el líquido estuviera en el fondo de los microtubos.
- Se realizó una inspección minuciosa a cada tubo ya que existía la posibilidad de que hubieran perdido líquido.
- Después se midió la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm de cada uno de los microtubos con el uso de un NanoDrop 2000c de Thermo Scientific, con la opción de Nucleic Acid. Se limpió el equipo cuidadosamente y se pipeteo 1.3 µL de DI H₂O, este se cargó como el blanco, ya que es el medio en el que se encuentran las grapas.



- Ya habiendo calibrado el equipo con el blanco, se limpió la zona de medición con Kimwipes y DI H₂O, se tomó un microtubo y se mezcló con la misma pipeta para tratar de obtener una muestra homogénea y se pipeteo 1.3 µL.
- Se procedió a medir su absorbancia, se realizó una hoja de Excel con los datos obtenidos y se repitió el procedimiento para cada una de las grapas.
- Posteriormente, en Excel se reportaron los datos obtenidos y se determinó la concentración de cada grapa de acuerdo a la ecuación 4.
- Ya habiendo obtenido las concentraciones se realizó los cálculos para llegar a una concentración final de 100 µM utilizando la relación $C_1V_1 = C_2V_2$, por lo que algunas muestras requirieron de agregar DI H₂O.
- Por último, se centrifugaron los microtubos para evitar que se quedara muestra en las paredes del tubo.

III.2.3. Elaboración de “pools” de grapas (ssDNA)

Los “pools” de grapas representan parte esencial de la estrategia de la síntesis de origami de ADN, ya que con ello nos permitió agilizar la preparación del “annealing” donde se seleccionó previamente las grapas del origami (“pool” 1 con 52 grapas) y las grapas extendidas (“pool” 2 con 20 grapas extendidas) para la funcionalización con nanopartículas de oro. El procedimiento constó de lo siguiente:

- Se tomaron los microtubos de las grapas para someterlas a agitación en Vortex (mezclador analógico de Fisher Scientific TM) y, posteriormente, se centrifugaron.
- Se etiquetó cada pool y se agregaron 2 µL de las grapas deseadas a cada “pool” mezclándose con la ayuda de una micropipeta para tener una muestra homogénea.



- De igual forma se mezcló cada “pool”, por unos segundos, con la ayuda de un Vortex.
- Se realizó el cálculo de la concentración final del “pool”.

III.2.4. “Annealing” de origami de ADN

El método de origami de ADN, técnica de un solo paso, adjetivo que se le atribuye debido a la “simplicidad” con la que se obtiene la nanoestructura deseada. Esto se debe a la alta programabilidad de autoensamble de las ssDNA y el “scaffold”, lo cual proporciona a origami de ADN de una manipulación precisa a escala nanométrica. Con la ayuda de sistemas como un termociclador, se elevan a temperaturas de 80 a 90 °C para asegurarnos de separar las cadenas sencillas y con una rampa de temperatura donde se reduce 1 °C por minuto hasta temperatura ambiente para hibridizar las cadenas obteniendo así la estructura deseada. Para ello se realizaron por conveniencia dos diferentes soluciones, en el microtubo para PCR 1 con la siguiente composición:

Círculo			
Muestra	Stock	Annealing	Volumen
Scaffold (MiniM13)	500 nM	5 nM	1 µL
Pool 1 (52 grapas)	1.23 µM	50 nM	4.05 µL
10 × TAE Mg 2+		1 × TAE Mg 2+	10 µL
Di H2O			84.95 µL
Total			100 µL

Tabla 1. Cálculos necesarios para la síntesis de la nanoestructura circular con un volumen total de 100 µL.



Para el microtubo para PCR 2 el procedimiento fue exactamente el mismo con la excepción de que el volumen total se aumentó a 200 μL para facilitar la preparación.

Círculo con grapas extendidas			
Muestra	Stock	Annealing	Volumen
Scaffold (MiniM13)	500 nM	5 nM	2 μL
Pool 1 (52 grapas)	6.06 μM	50 nM	1.7 μL
Pool 2 (20 grapas)	1.71 μM	50 nM	5.8 μL
10 \times TAE Mg 2+		1 \times TAE Mg 2+	20 μL
Di H ₂ O			170 μL
Total			200 μL

Tabla 2. Cálculos necesarios para la síntesis de la nanoestructura circular con grapas extendidas para funcionalización con AuNPs con un volumen total de 200 μL .

Habiendo calculado los volúmenes correspondientes, se mezclaron bien las soluciones y se colocó el microtubo en el termociclador Techne TC-3000 y se ejecutó el programa que tiene una rampa de temperatura que calentara la muestra de 80 $^{\circ}\text{C}$ a 20 $^{\circ}\text{C}$ en dos horas, al término del ciclo del termociclador se mantuvo la muestra a -4 $^{\circ}\text{C}$. Finalizando este procedimiento se mantuvo la muestra en el congelador a -20 $^{\circ}\text{C}$ para preservarla.



III.2.5. Preparación de grapas tioladas

Para este protocolo fue necesario hidratar los tubos de tioles 5' y 3' considerando una concentración final de 200 μM , los cálculos se realizaron basados en los siguiente: 5 μL TCEP, 1.66 μL 10 \times TE y 15 μL \sim 100 μM DNA. Considerando que la concentración molar del ADN es 200 $\mu\text{mol/L}$ y que la concentración de las nanopartículas de oro (AuNPs) es de 5×10^{13} partículas/mL donde se tomaran 10 mL de dichas nanopartículas.

Cálculos:

- Concentración de AuNPs:

$$[\text{AuNPs}] = \left(\frac{5 \times 10^{13} \text{ AuNPs}}{1 \times 10^{-3} \text{ L}} \right) \left(\frac{1 \text{ mol}}{6.022 \times 10^{23} \text{ AuNPs}} \right) = 9.1331 \times 10^{-8} \text{ moles} = 91.33 \text{ nM/L}$$

- Concentración de grapas tioladas:

$$1.- [5' \text{ Thiol}] = 477.30 \mu\text{M}$$

$$2.- [3' \text{ Thiol}] = 490.23 \mu\text{M}$$

- En una relación 1:5

5' Tiol

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$V_1 \text{ 5' Tiol} = \frac{[91.33 \times 10^{-9} \text{ M}][10 \times 10^{-3} \text{ L}]}{[477.30 \times 10^{-6} \text{ M}]} = 1.9134 \times 10^{-6} \text{ L} = (1.91 \mu\text{L}) \times 5$$

$$= 9.5 \mu\text{L}$$



$$\text{Vol de referencia} = \frac{[1.5 \times 10^{-9} \text{ moles}]}{[477.30 \times 10^{-6} \frac{\text{moles}}{\text{L}}]} = 3.1426 \times 10^{-6} \text{ L} = 3.14 \mu\text{L}$$

Relación de TCEP:

$$5 \mu\text{L} \rightarrow [3.14 \mu\text{L}] \left[477.30 \times 10^{-6} \frac{\text{mol}}{\text{L}} \right]$$

$$x \rightarrow [9.5 \mu\text{L}]$$

$$x = 15.2 \mu\text{L TCEP}$$

Relación de $10 \times \text{TE}$:

$$1.66 \mu\text{L} \rightarrow [3.14 \mu\text{L}] \left[477.30 \times 10^{-6} \frac{\text{mol}}{\text{L}} \right]$$

$$x \rightarrow [9.5 \mu\text{L}]$$

$$x = 5.02 \mu\text{L } 10 \times \text{TE}$$

3' Tiol

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$V_1 \text{ 3' Tiol} = \frac{[91.33 \times 10^{-9} \text{ M}][10 \times 10^{-3} \text{ L}]}{[490.23 \times 10^{-6} \text{ M}]} = 1.8630 \times 10^{-6} \text{ L} = (1.86 \mu\text{L}) \times 5$$

$$= 9.3 \mu\text{L}$$

$$\text{Vol de referencia} = \frac{[1.5 \times 10^{-9} \text{ moles}]}{[490.23 \times 10^{-6} \frac{\text{moles}}{\text{L}}]} = 3.0597 \times 10^{-6} \text{ L} = 3.06 \mu\text{L}$$

Relación de TCEP:

$$5 \mu\text{L} \rightarrow [3.06 \mu\text{L}] \left[490.23 \times 10^{-6} \frac{\text{mol}}{\text{L}} \right]$$

$$x \rightarrow [9.3 \mu\text{L}]$$



$$x = 15.20 \mu\text{L TCEP}$$

Relación de $10 \times \text{TE}$:

$$1.66 \mu\text{L} \rightarrow [3.14 \mu\text{L}] \left[490.23 \times 10^{-6} \frac{\text{mol}}{\text{L}} \right]$$

$$x \rightarrow [9.3 \mu\text{L}]$$

$$x = 5.04 \mu\text{L } 10 \times \text{TE}$$

- En una relación 1:60

T₅

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$V_1 T_5 = \frac{[91.33 \times 10^{-9} \text{ M}][10 \times 10^{-3} \text{ L}]}{[918.64 \times 10^{-6} \text{ M}]} = 9.9418 \times 10^{-7} \text{ L} = (0.99 \mu\text{L}) \times 60$$

$$= 59.4 \mu\text{L}$$

$$\text{Vol de referencia} = \frac{[1.5 \times 10^{-9} \text{ moles}]}{[918.64 \times 10^{-6} \frac{\text{moles}}{\text{L}}]} = 1.6328 \times 10^{-6} \text{ L} = 1.63 \mu\text{L}$$

Relación de TCEP:

$$5 \mu\text{L} \rightarrow [1.63 \mu\text{L}] \left[918.64 \times 10^{-6} \frac{\text{mol}}{\text{L}} \right]$$

$$x \rightarrow [59.4 \mu\text{L}]$$

$$x = 184.04 \mu\text{L TCEP}$$

Relación de $10 \times \text{TE}$:

$$1.66 \mu\text{L} \rightarrow [1.63 \mu\text{L}] \left[918.64 \times 10^{-6} \frac{\text{mol}}{\text{L}} \right]$$

$$x \rightarrow [59.4 \mu\text{L}]$$

$$x = 60.49 \mu\text{L } 10 \times \text{TE}$$



Ya obtenidos los cálculos se agregaron los volúmenes necesarios de TCEP, ssDNA y $10 \times$ TE en un tubo de PCR. Se agregaron en el orden mencionado anteriormente debido a que el TCEP es una solución muy viscosa. Finalizando este procedimiento, se tomó cada uno de los tubos preparados y se colocaron en un plato rotatorio (360°) durante 24 horas.

III.2.6. Tratamiento de nanopartículas de oro

Este procedimiento se realizó básicamente para remover la solución de agua con pequeñas cantidades de ácido tánico y carbonato de potasio, que contienen las AuNPs suministradas por la compañía Ted Pella, Inc., dicha solución estabiliza a las nanopartículas de oro de 5 nm de tamaño con una carga neta superficial negativa [83]. La preparación consistió en el siguiente procedimiento:

- Se pesaron 3 mg de Bis (p-sulfonatophenyl) phenylphosphine dihydrate dipotassium salt (BSPP) al 97% de la compañía Sigma-Aldrich en un tubo.
- Se agregaron los 3 mg de BSPP en un tubo con 10 mL de AuNPs y se puso en agitación por 12 horas.
- Posteriormente, se retiró el tubo de la agitación y se tomó una foto del tubo en un fondo blanco.
- Ya que se obtuvo la foto como punto de inicio del protocolo se pesaron 130 mg de NaCl y se agregó al tubo para su posterior mezclado en un Vortex hasta disolverlo por completo.
- Se valoró la coloración con la primer fotografía ya que se buscaba obtener una coloración marrón.



- Debido a que el proceso requiere que la solución adquiriera coloración más rojiza que morada, se agregaron 30 mg de NaCl y se mezcló en Vortex para homogeneizar la solución.
- Se agregaron 260 mg de NaCl en porciones de 30 mg en 30 mg hasta obtener la coloración marrón y se centrifugó por 30 min a 1260 g y 24 °C.
- Después de centrifugar la solución debe ser incolora con un depósito de “pellet” por lo que se le agregaron otros 30 mg de NaCl, se mezcló en un Vortex y se centrifugó con las mismas condiciones.
- Se repitió el paso anterior hasta obtener la tonalidad adecuada marrón adecuada.
- Ya obtenida la coloración marrón se desechó el sobrenadante con una pipeta cuidando de no tocar el “pellet”.
- Se preparó una solución de BSPP en un tubo con 3 mg de BSPP y 10 mL de metanol.
- En el tubo donde se encontraba el “pellet” ya sin el sobrenadante se le agregaron 200 μ L de la solución BSPP y 200 μ L de metanol.
- Ya resuspendido el pellet se verificó que la coloración fuese rojo oscuro, debido a que no se obtenía dicho color se le agregaron otros 200 μ L de la solución BSPP.
- Para tener mejor manejo del tubo se optó por cambiarlo el pellet resuspendido a un tubo de 2 mL y se centrifugó a 1200 g durante 30 min a temperatura ambiente.
- Se retiró el sobrenadante y el “pellet” se resuspendió en 50 μ L de la solución BSPP.
- Posteriormente, se agregaron al microtubo las tres soluciones de ssDNA preparadas previamente en el protocolo anterior y se mezcló en un Vortex por 10 segundos.
- Se colocó en un agitador TekTrator[®] V tipo shaker a 120 rpm durante dos días.



III.2.7. “Freeze and Squeeze”

El presente protocolo tiene la finalidad de eliminar el exceso de grasas de las AuNPs con las grasas extendidas (T_5 , 3' y 5'). Para ello fue necesario esperar al término de la incubación ya que es un factor crítico en la relación AuNPs- grasas. El procedimiento consistió en lo siguiente:

- Se prepararon 300 mL de buffer $1 \times$ TAE Mg^{2+} en una probeta.
- Se pesaron 1.5 g de agarosa y se depositó en un matraz Erlenmeyer de 75 mL para preparar el gel de agarosa al 3%.
- Se agregaron 50 mL de buffer $1 \times$ TAE Mg^{2+} y se llevó al microondas para calentarlo hasta punto de ebullición. Durante el proceso de calentamiento la solución fue retirada en repetidas ocasiones para evitar se derramara debido al proceso de ebullición.
- El procedimiento anterior se repitió hasta que la agarosa se disolviera por completo.
- Ya obtenida la agarosa con dichas características se vertió en un molde especial de electroforesis con peine, evitando la formación de burbujas.
- Se dejó gelificar por 40 minutos a temperatura ambiente, se retiró el peine con precaución y se colocó en la cámara de electroforesis Mini-Sub[®] Cell GT Systems de BIO-RAD, la cámara se encontraba en una charola con hielos para evitar sobrecalentamiento en la muestra.
- Se llenó hasta el límite indicado en la cámara de electroforesis con el buffer preparado anteriormente.
- Cuidadosamente se colocó la muestra obtenida en el protocolo de tratamiento de nanopartículas de oro se determinó una relación AuNPs-ssDNA 1:5 para agregar glicerol al 50% y se agregó en cada pozo aproximadamente 40 μ L.



- Se corrió el gel durante 15 minutos a 100 V.
- Una vez finalizada la electroforesis se retiró el gel para colocarlo un visualizador.
- Se cortó con una navaja esterilizada el área que se observó con mayor concentración de nanopartículas.
- Se colocó en una caja Petri la sección extraída del gel y se trituró por completo con la tapa de un microtubo.
- Posteriormente, se extrajo la sección triturada y se colocó en el filtro del kit de purificación Freeze 'N Squeeze™ de BIO-RAD.
- Se colocó en el congelador el tubo de purificación a una temperatura de -20°C durante 5 minutos.
- Subsiguientemente, se colocó en una centrifuga dentro de un refrigerador a 4°C y se centrifugo a 6200 g durante 2 minutos.
- Finalizado el ciclo, se revolvió el gel y se centrifugó bajo las mismas condiciones.
- Se agregaron 20 µL de 1 × TAE al tubo de purificación para obtener la mayor concentración de AuNPs, se mezcló y se centrifugó por otros 2 minutos a 6200 g.
- Por último, se calculó la concentración de las nanopartículas con las grapas tioladas, con la ayuda del equipo NanoDrop, y se guardaron en refrigeración a -4°C.



CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se presentan y se discuten los tres resultados más obtenidos en este trabajo de tesis: formación de nanoestructuras de origami de ADN, caracterización morfológica y funcionalización de ADN con nanopartículas de oro en superficie. Estas representan la síntesis y caracterización de la nanoestructura circular con y sin nanopartículas de oro, utilizando la técnica de origami de ADN como un potencial método de fabricación de nanobobinas. La sección IV.1 se presenta los resultados obtenidos en electroforesis en gel de agarosa al 1%. En la sección IV.2 se discute sobre la relación “scaffold-staples” y la importancia de las concentraciones para formar nanoestructuras de origami de ADN. En la sección IV.3 se describe el procedimiento de funcionalización de origami-AuNPs en superficie. Ambas secciones serán presentadas con imágenes morfológicas obtenidas por microscopía de fuerza atómica utilizando el equipo de alta resolución Cypher™ AFM con una celda de fluido en modo “tapping”.

IV.1. Electroforesis en gel de agarosa

Para identificar si las estructuras de origami estaban correctamente formadas, se hizo uso de la técnica de electroforesis horizontal. Para ello se elaboró un gel de agarosa al 1%; preparando 0.5 g de agarosa ultrapura (No. 16500500 de Thermo Fisher Scientific), en 50 mL de solución amortiguadora $1 \times$ TAE disolviendo en un microondas durante 2 min hasta obtener una sustancia homogénea. Posteriormente, se agregó 2.5 μ L de bromuro de etidio (EtBr), para poder observar las bandas por luz ultravioleta (UV). El gel de agarosa se vertió en la base de una charola con el peine para gelificar y formar los pozos. Se continuó con el proceso tal como se ejemplifica en la figura 18, utilizando como “buffer” la solución $1 \times$ TAE sin magnesio.



Las muestras se cargaron de la siguiente manera: en el pozo 1 se colocó “Ladder” de 100 pb, el pozo 2 contiene “staples” a 50 nM, en el pozo 3 se colocó “scaffold” a 5 nM, el pozo 4 contiene estructuras de origami de ADN a 5 nM, en el pozo 5 origami con grapas extendidas a 5 nM y, por último, en el pozo 6 se colocó origami funcionalizado con AuNPs en solución a una concentración de 5 nM. En cada uno de los pozos se colocaron 12 μ L de muestra y se mezcló con 3 μ m del colorante 6 \times Dye (G190A de Promega) para verificar la migración de las muestras durante la electroforesis. Las condiciones en las que se realizó el corrimiento del gel fueron un potencial eléctrico de 100 V por 1 hora. Después de haber realizado el corrimiento y previamente teñido el gel con EtBr el cual tiene propiedades fluorescentes permitió observarlo con luz UV y blanca en un fotodocumentador SmartView Pro 1100 de la compañía Major Science.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 30, se observa que la movilidad electroforética de las muestras en el gel de agarosa es de acuerdo a lo esperado. La columna 1 muestra el corrimiento de la escalera con 11 bandas que van desde 100 a 1,500 pares de bases. Las grapas colocadas en la columna 2 se identifican con una flecha amarilla en la parte inferior de la figura y en la cual la banda está por debajo de los 100 pb. Esto concuerda con el hecho de que tienen una longitud promedio de 30-40 bases requeridas para formar la nanoestructura de origami de ADN.

El andamio con una longitud de 2,404 bases ubicado en la columna 3 (flecha azul), exhibe una banda de aproximadamente 1200 pares de bases de “scaffold” respecto a la escalera. En la columna 4 las estructuras de origami de ADN se señalan con la flecha verde la cual corresponde a 2,404 pares de bases. En las estructuras de origami con grapas extendidas en la columna 5, señaladas con



una flecha roja, es posible apreciar que la posición de la banda se encuentra por debajo de las estructuras de origami. Esto se debe principalmente a que la migración electroforética es mayor en cadenas de ssDNA, ya que las grapas extendidas están ligadas al origami circular lo que permite un mayor corrimiento en el tamiz del gel de electroforesis.

Por último, la columna 6 presenta las estructuras de origami funcionalizadas y se observa que estos conjugados migran más que las bandas 4 y 5. Esto se debe principalmente a que el potencial zeta para las estructuras de origami con nanopartículas de oro es mayor y permite un mayor corrimiento por un metal noble. En la figura 30b se exhibe una banda color marrón en la columna del origami funcionalizado, este color es característico de las nanopartículas de oro en solución, por lo tanto se asume que el conjugado AuNPs-origami de ADN se ha formado [84]. Cabe recalcar que la visualización de esta banda únicamente se logró visualizar en luz blanca. Una posible explicación a este fenómeno es que las nanopartículas de oro depletan al bromuro de etidio, evitando así intercalarse con el ADN y por ende no permita la visualización en UV. El método idóneo para corroborar la formación de las nanoestructuras es por microscopia de fuerza atómica, independientemente de los resultados de electroforesis.



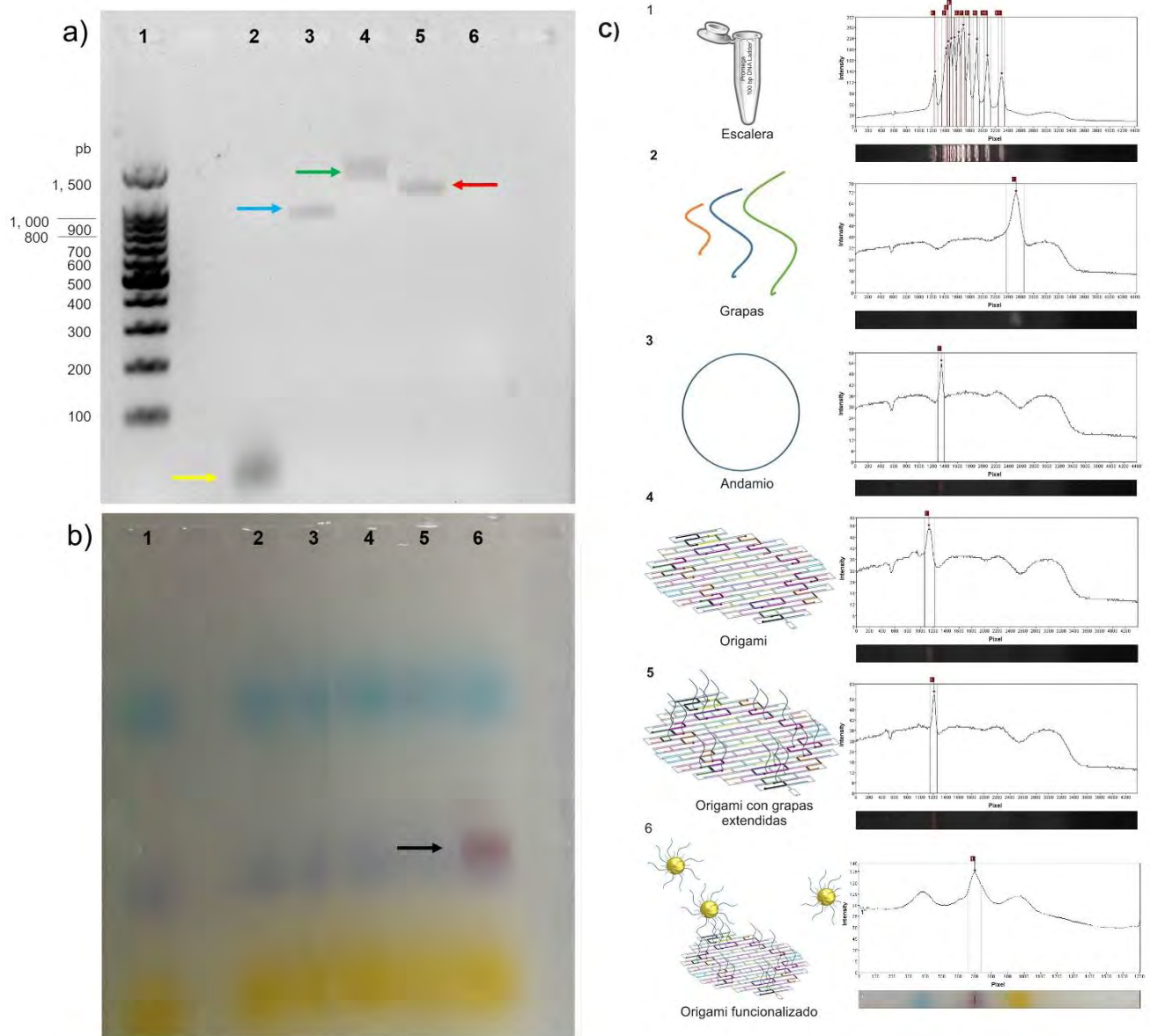


Figura 30. Gel de electroforesis de la nanoestructura circular de origami de ADN. a) Línea 1: Escalera; línea 2: grapas 50 nM (flecha amarilla); línea 3: andamio 5 nM (flecha azul); línea 4: estructuras de origami de ADN 5 nM (flecha verde); línea 5: estructura circular de origami con grapas extendidas 5 nM (flecha roja). b) Línea 6: origami de ADN funcionalizado con AuNPs 5 Nm (flecha negra) y c) esquematización con perfil de bandas del corrimiento.

I.V.2. Visualización de origami de ADN

Para estudiar la morfología y la formación de las nanoestructuras diseñadas en la sección III.2.1 se llevó a cabo microscopía de fuerza atómica (AFM) y para ello el equipo Cypher S de Asylum Research. Para poder visualizar las nanoestructuras por AFM, se requirió utilizar una celda de



fluido y en modo “tapping” usando puntas de nitruro de silicio DNP-S10 con un radio de curvatura entre 10-40 nm de la compañía Bruker. Lo anterior se debe a que las muestras con ADN, material blando, están inmersas en una solución amortiguadora. La solución conteniendo las nanoestructuras se colocó sobre un sustrato de mica ya que es sencillo clivarla para tener una superficie limpia. La preparación de la muestra consistió en disminuir la concentración a 1 nM de la muestra original (tabla 1), utilizando el “buffer” $1 \times \text{TAE Mg}^{2+}$ con el propósito de generar una capa positiva con los átomos de magnesio y atraer la carga negativa del ADN a la superficie, “anclando” las estructuras a la mica (Mica-V1 de Ted Pella).

Se realizaron dos pruebas para evaluar la relación óptima andamio-grapas, y reducir la presencia de grapas sueltas. La literatura sugiere una relación 1:10, para asegurar la formación de las nanoestructuras proponemos una relación 1:60, siendo la primera mezcla típica de andamio y grapas [49,85]. Los resultados de este experimento en la relación 1:60 se presentan en la figura 31, la cual muestra un exceso de grapas en su forma natural, ovillo, lo que podría ser problema que afecte en la etapa de funcionalización, ya que las cadenas sueltas se pueden unir a las ssDNA diseñadas para anclar la nanopartícula al origami. Esto demuestra que la proporción 1:60 logra formar completamente la estructura circular de origami de ADN. Sin embargo, el exceso de grapas interfiere en el rendimiento de estructuras completamente formadas. En la figura 32 se logra observar que los efectos de la relación 1:10 exhiben una disminución considerable de grapas en el medio y un aumento axiomático en el rendimiento del número de estructuras formadas. Los resultados proporcionan soporte concluyente para continuar con la relación 1:10 para la formación de origami de ADN.



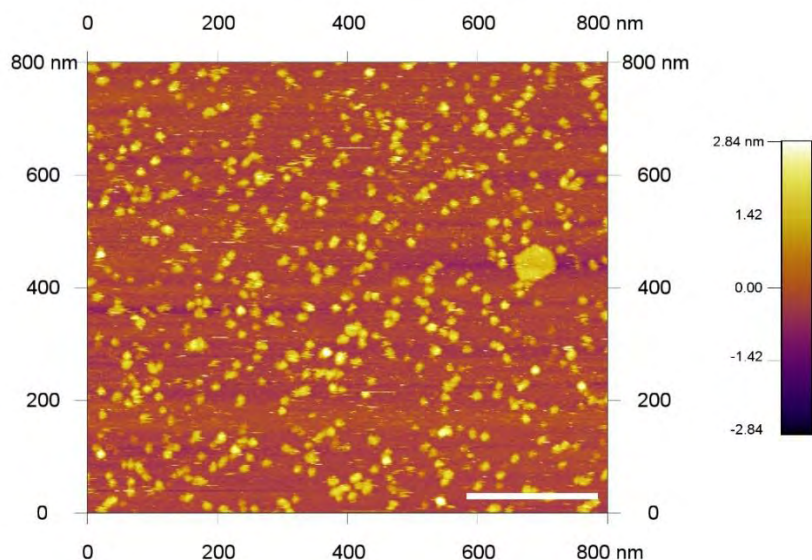


Figura 31. Imagen de estructuras circulares de origami de ADN con una relación molar de 1:60; barra de escala de 200 nm.

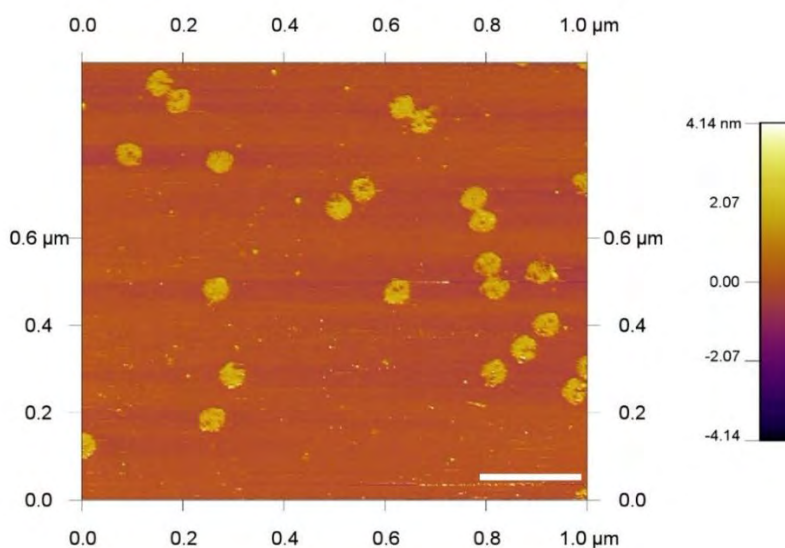


Figura 32. Imagen de estructuras circulares de origami de ADN con una relación molar de 1:10; barra de escala de 200 nm.

La figura 31 en contraste con la figura 32, muestra evidencia de que la relación andamio-grapas 1:10 es la óptima, de aquí que los experimentos posteriores se realizaron en esta relación molar.

Las imágenes de AFM en las figuras 33,34 y 35 corresponden a un barrido de 5 x 5 μm, 1 x 1 μm

y 400 x 400 nm, respectivamente, y exhiben imágenes de AFM correspondientes a una serie de estructuras de origami de ADN circulares, a una concentración de 1 nM en diferentes escalas.

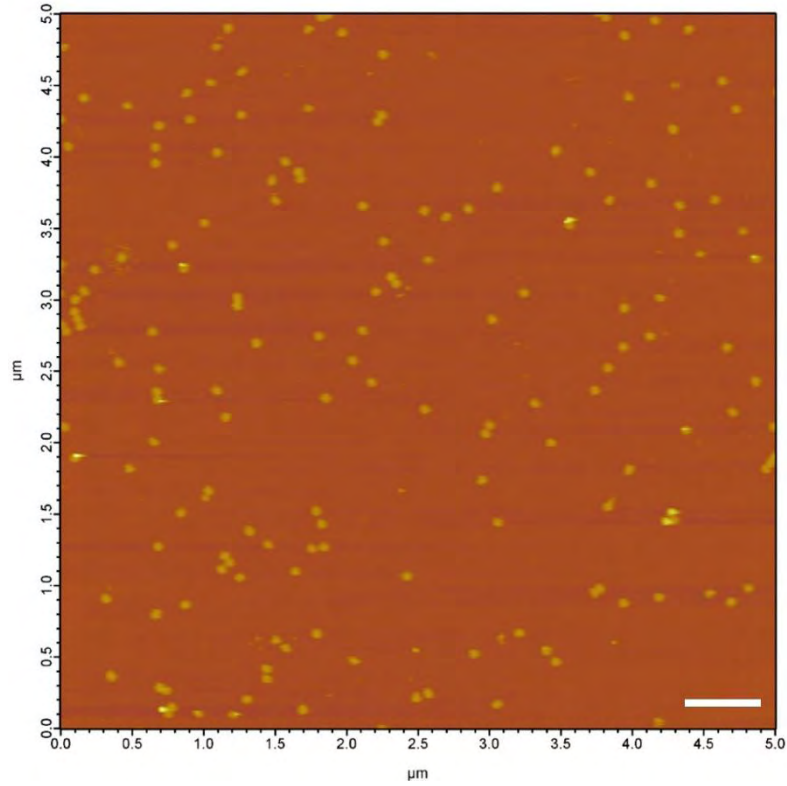


Figura 33. Imagen de nanoestructuras circulares en un barrido de 5 x 5 μm; barra de escala de 500 nm.

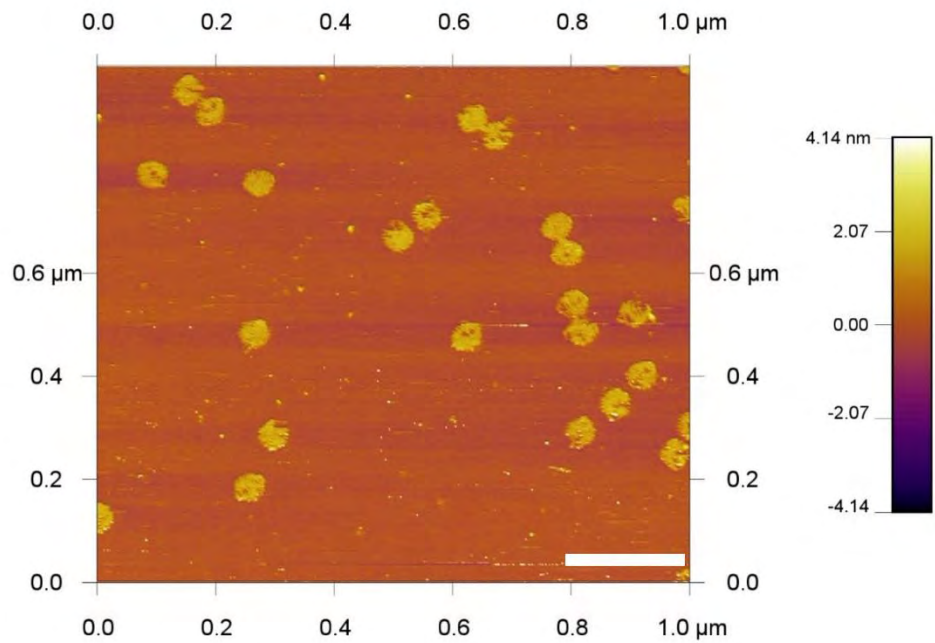


Figura 34. Imagen de nanoestructuras circulares en un barrido de 1 x 1 μm ; barra de escala de 200 nm.

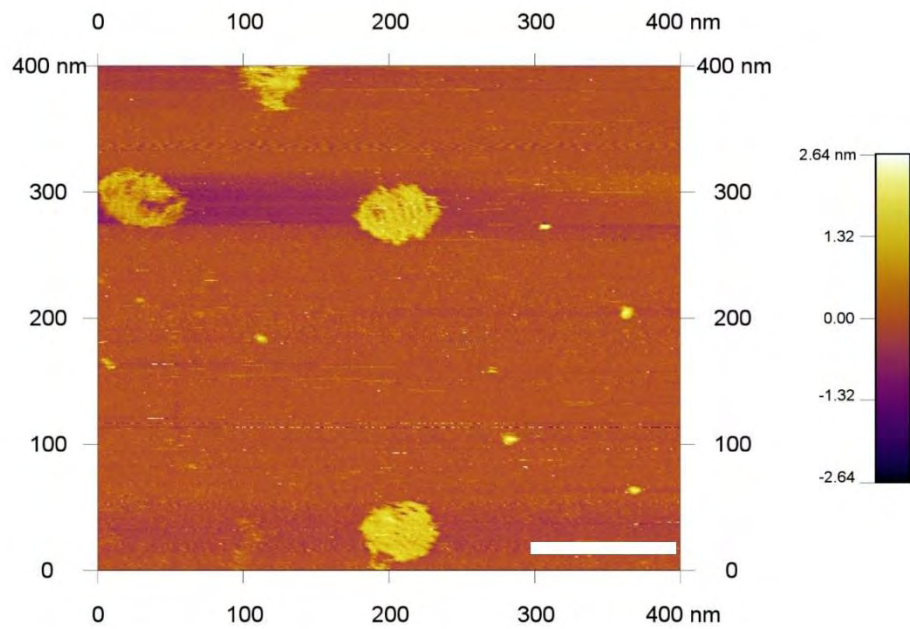


Figura 35. Acercamiento a las nanoestructuras circulares en la esquina superior izquierda de la figura 34 en un barrido de 400 x 400 nm; barra de escala de 100 nm.

Las figuras 36 y 37 muestran cortes seccionales de una sola nanoestructura circular con el propósito de determinar sus dimensiones. Se observa que los resultados son consistentes con el diámetro aproximado de 50 nm que se planteó en la sección III.2.1.

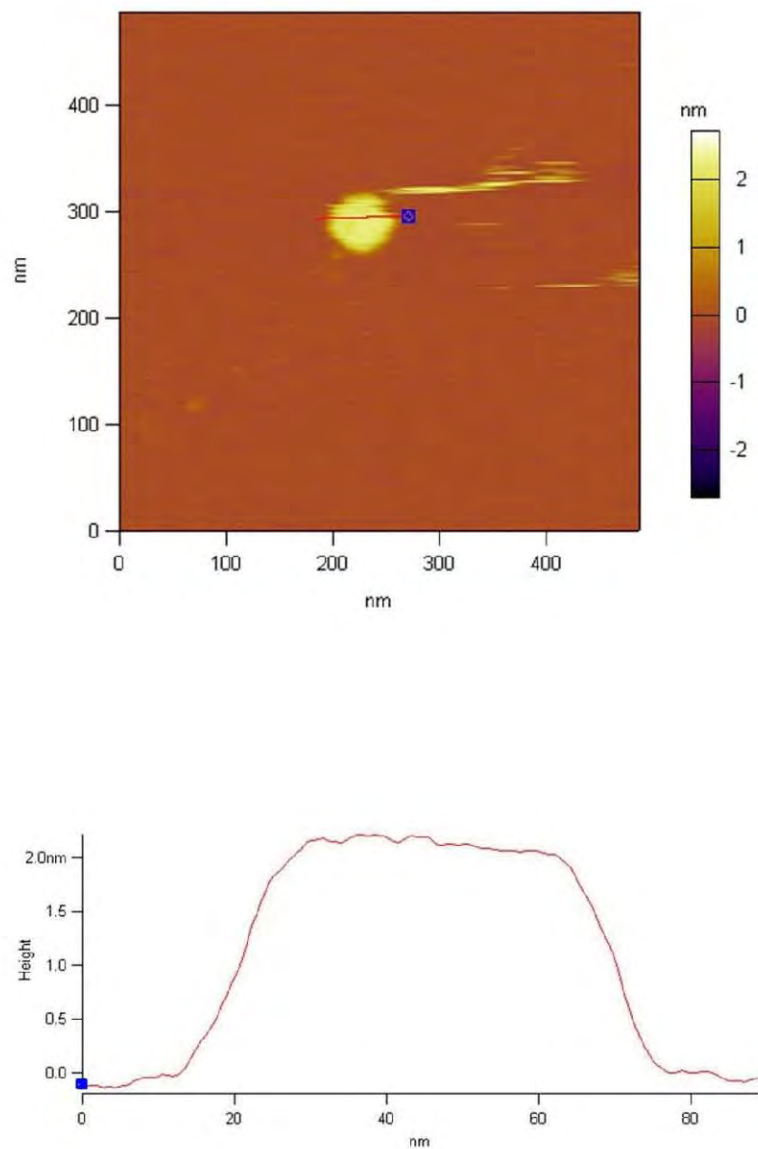


Figura 36. Análisis de corte seccional horizontal de una nanoestructura circular en un barrido de 500 x 500 nm.



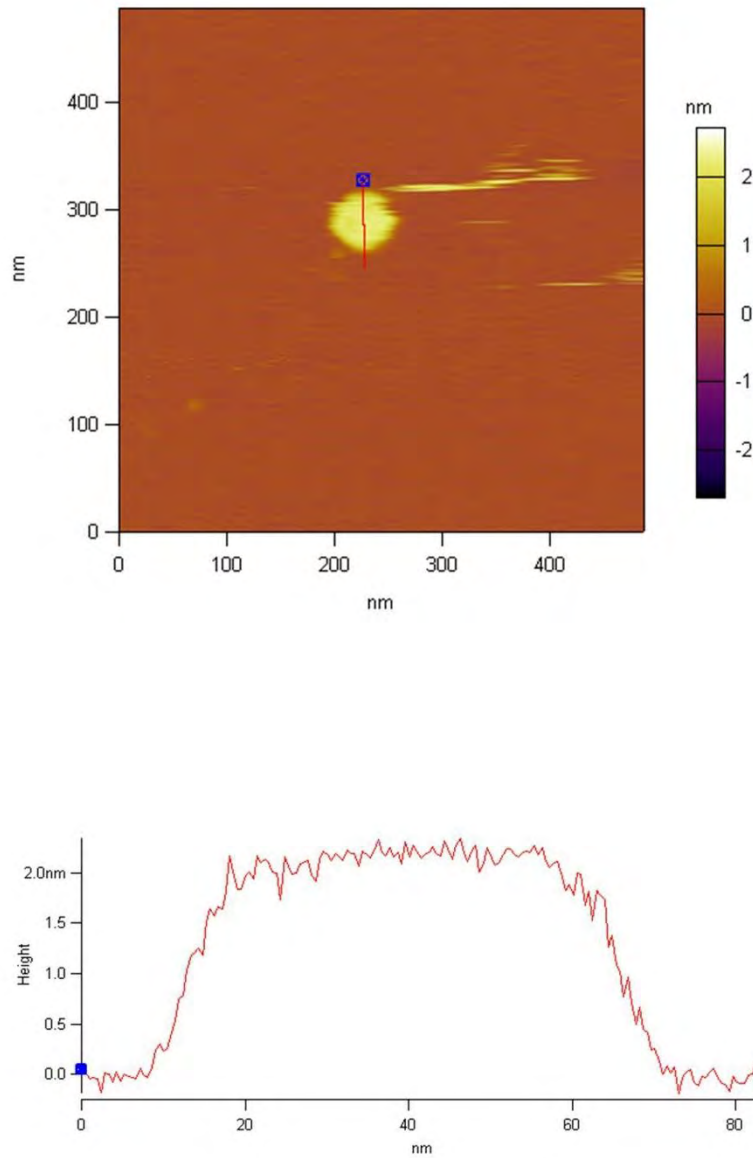


Figura 37. Análisis de corte seccional vertical de una nanoestructura circular en un barrido de 500 x 500 nm.

IV.3. Funcionalización de origami de ADN con nanopartículas de oro en superficie

La funcionalización en superficie se emplea para observar directamente por AFM en fluido la interacción nanopartícula-origami de ADN debido a que esta técnica no requiere de incubación previa. Para este procedimiento se requirió que la solución de origami de ADN haya sido



purificada, es decir, que se haya removido el exceso de grapas para evitar que las nanopartículas se unan a estas ssDNA disueltas y así evitar su unión a las grapas extendidas en el andamio [14].

Los resultados mostrados en la sección anterior anteriores indicaron que la relación 1:10 es la adecuada para la formación de la nanoestructura circular de ADN. Basados en la secuencia de Kuzyk, *et al* y el estudio de posicionamiento de nanopartículas de Pilo-Pais, *et al*, se utilizó una relación molar entre AuNPs-ADN de 1:5 [14,59]. La técnica consistió en los siguientes pasos: se mezcló la muestra de origami de ADN en ultrasonido por 15 s. Después se removió la superficie de la mica con cinta adhesiva hasta obtener una superficie homogénea; a este procedimiento se le conoce como clivar la mica. Se depositaron 30 μL de $10 \times \text{TAE Mg}^{2+}$ sobre la superficie clivada de mica para anclar al origami a su superficie y se esperaron 5 min. Después se pipetearon 10 μL de NiCl_2 y se esperó 1 min. Las soluciones anteriores se utilizaron esencialmente para adherir al origami a la superficie de la mica. Se agregó 5 μL de la muestra y se esperó 5 min. Para el cálculo del volumen de AuNPs se utilizó la siguiente fórmula:

$$\mu\text{L de origami} \times \frac{\text{moles de origami}}{L} \times \frac{\text{No. de AuNPs por origami} \times \text{moles de exceso de AuNPs}}{1 \text{ mol de origami}} \times \frac{L \text{ de AuNPs}}{\text{moles de AuNPs}} = L \text{ de AuNPstock}$$

Tal como se menciona en la sección III.2.1, la figura 28, muestra los sitios de enlace y el uso de dos diferentes grapas extendidas de la nanoestructura circular en dirección $3' \rightarrow 5'$, grapa TTTT TAA TAA TAA TAA TAA y en dirección $5' \rightarrow 3'$, grapa TTTT AAA AAA AAA AAA AAA. Y las complementarias, $5' \rightarrow 3'$ ATT ATT ATT ATT ATT TTTT- SH y $3' \rightarrow 5'$, TTT TTT TTT



TTT TTT TTTT- SH, véase apéndice D. La figura 38 exhibe una imagen de 5 x 5 μm en AFM los conjugados origami de nanoestructura circular-AuNP donde se utilizó una concentración del conjugado de 1 nM.

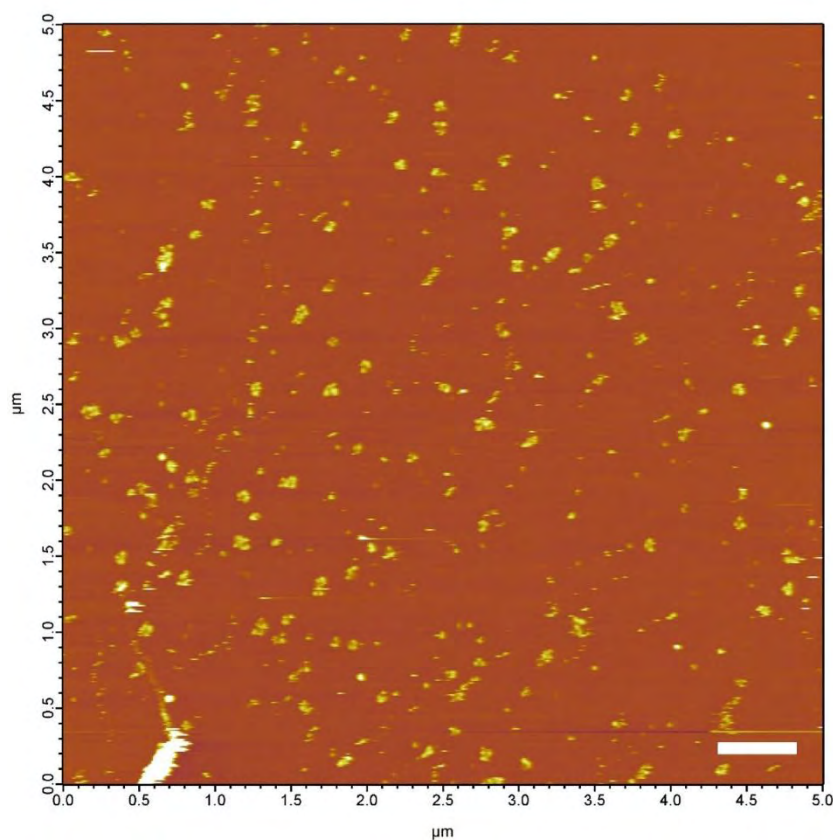


Figura 38. Imagen de AFM a una escala de barrido de 5 x 5 μm de origami de ADN con forma circular funcionalizado con nanopartículas de oro; escala de barra de 500 nm.

Para corroborar la formación de los conjugados AuNPs-Origami se procedió a realizar un acercamiento a la figura 38 dónde se observan sistemas autoensamblados conocidos como “ π - π stacking”, que por definición es una interacción atractiva entre dos anillos aromáticos apilados [86]. Esta superposición es causada por interacciones electrostáticas básicas como se describe en el modelo de Hunter y Sanders en 1990 [87]. Otra razón posible de estos aglomerados es que,



debido a tener una secuencia idéntica, la nanopartícula abarca dos sitios de enlace de estructuras diferentes cómo se logra observar en la figura 39.

Para reducir la presencia de esta interacción se optó por reducir la concentración a 1 nM del conjugado. En contraste con la figura 39, la figura 40 no presenta aglomerados, lo cual permite visualizar mejor el posicionamiento de las nanopartículas. Recapitulando, en la figura 28 se muestra que la colocación corresponde a una de las secuencias extendidas, lo cual sugiere una verificación de la secuencia de las grapas extendidas en 3' o 5' y posterior modificación.

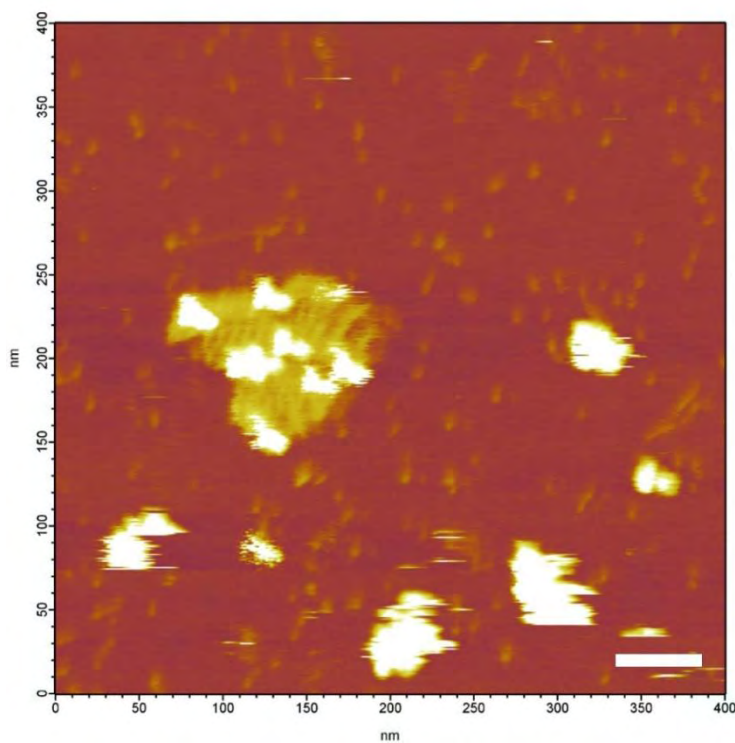


Figura 39. Imagen del conjugado AuNPs-Origami observado por AFM a una escala de 400 nm; barra de escala de 50 nm.



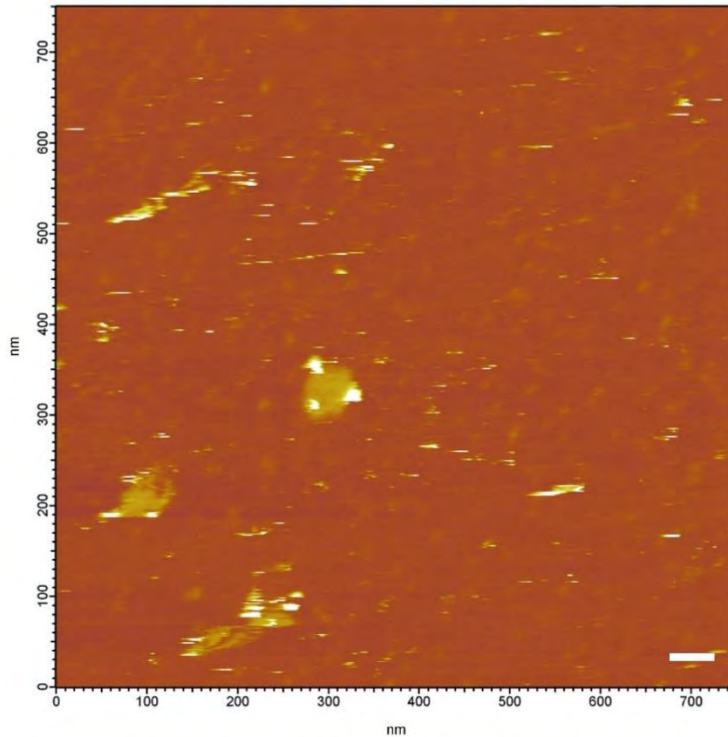


Figura 40. Imagen de una estructura circular funcionalizada con 3 AuNPs ($800 \times 800 \mu\text{m}$); barra de escala de 50 nm.

Las figuras 41 y 42 muestran el análisis de sección de la nanoestructura de la figura 40 a lo largo de dos direcciones distintas. En la figura 41 se distingue claramente la altura de aproximadamente 6.5 nm de la AuNP sobre la estructura de ADN. En la figura 42 se logra apreciar que la longitud entre nanopartículas es muy cercano al valor calculado de 25.5 a 26.7 nm en la sección II.2.1, es comparable con el valor obtenido por el corte seccional del AFM de 25-30 nm.

Cabe mencionar que la velocidad de barrido es de 2.44 Hz, lo cual implica mayor presión de la punta sobre la muestra, al igual que la influencia del radio de curvatura de la punta producen distorsión o menor resolución en las imágenes. Dicho esto, es importante considerar el uso de puntas con un radio de curvatura menor para lograr mejores imágenes. Estos resultados, sugieren,

en síntesis, que es necesario reforzar la etapa de funcionalización para obtener un rendimiento cercano al 100% en la relación AuNP-Origami.

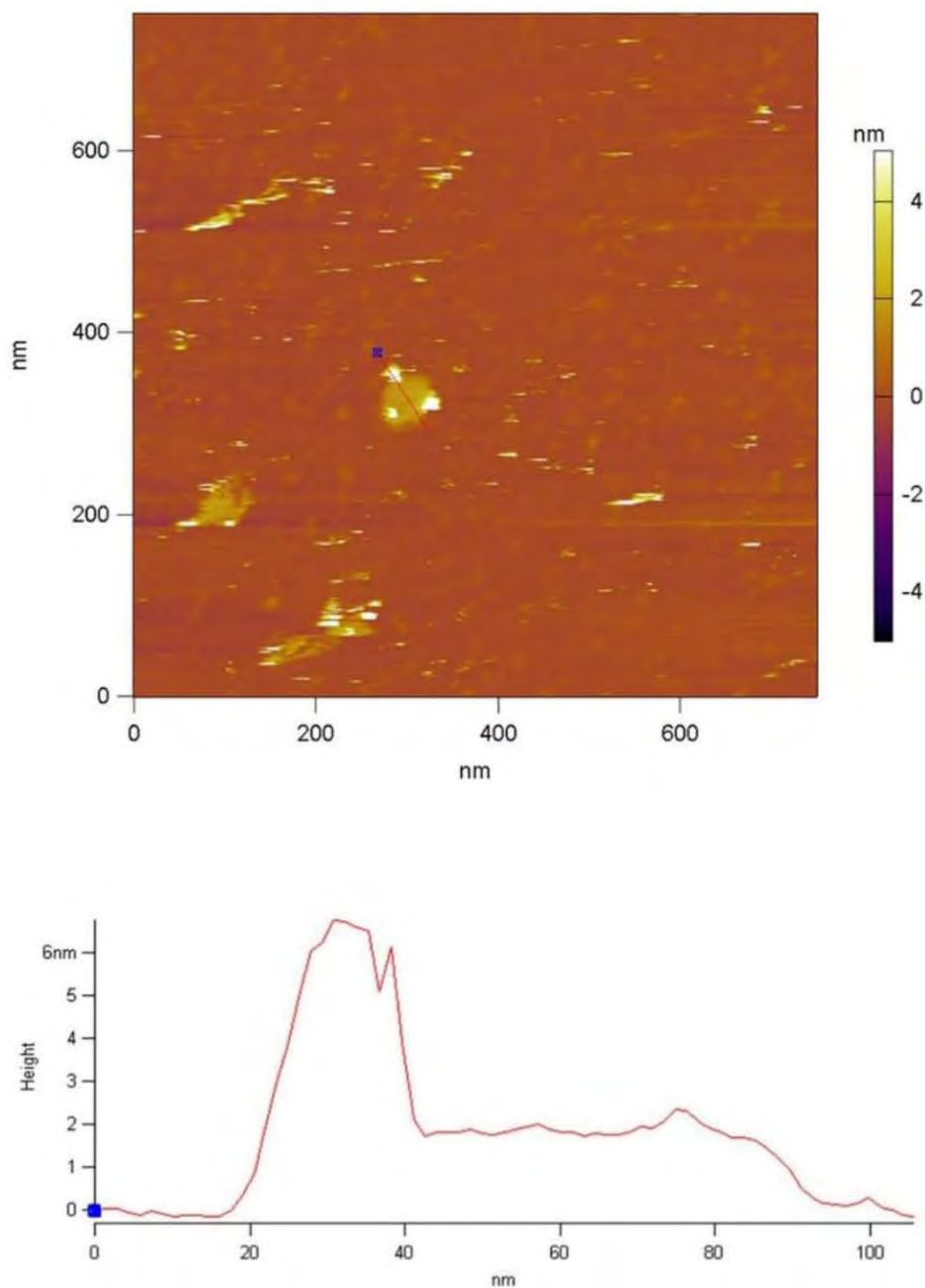


Figura 41. Análisis de sección transversal del conjugado AuNPs-Origami mostrado en la figura 40 posicionado en una sola nanopartícula.



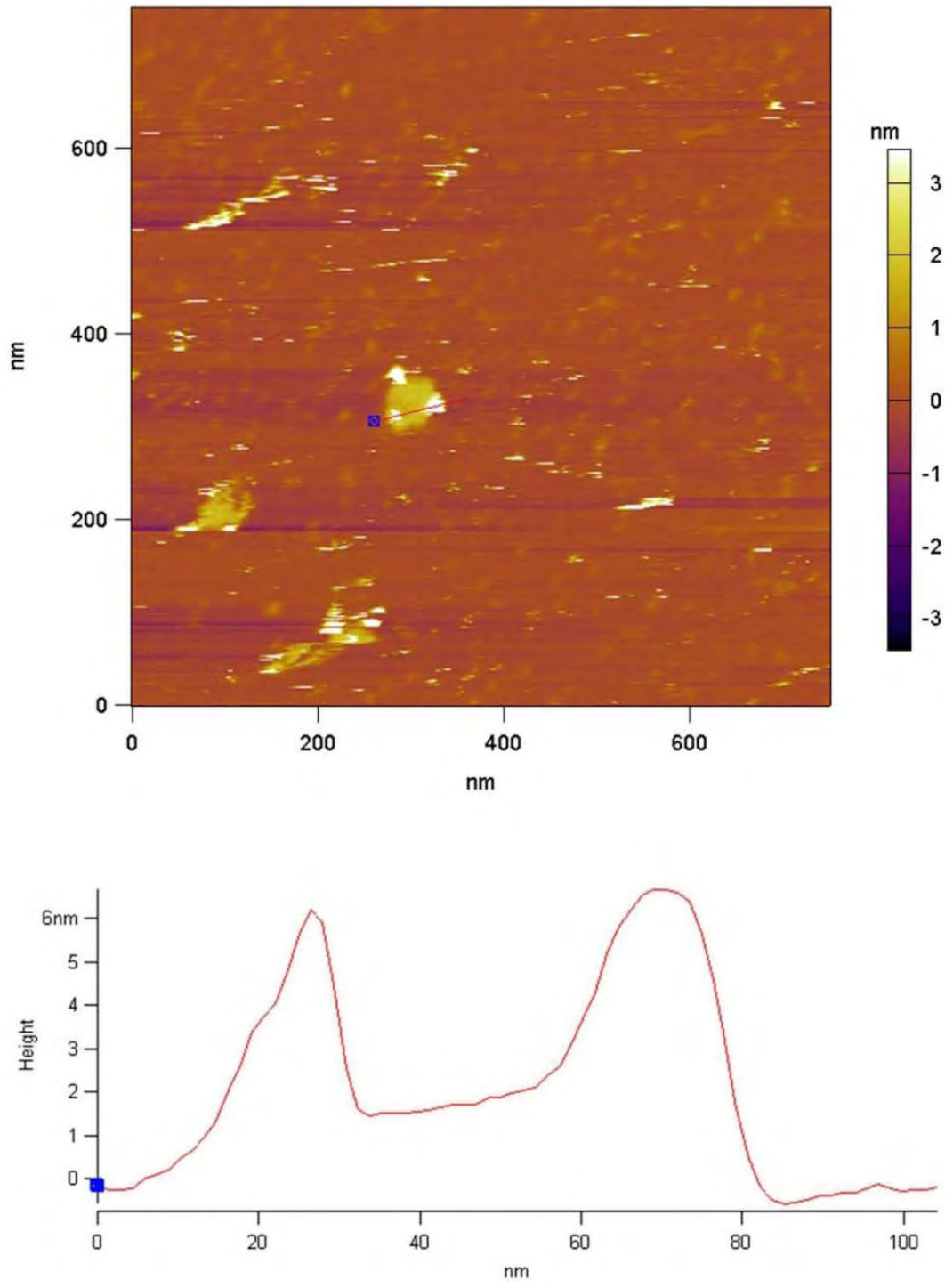


Figura 42. Análisis de sección transversal del conjugado AuNPs-Origami mostrado en la figura 40 posicionado a lo largo de dos nanopartículas.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO

- El diseño de las estructuras circulares asistido por caDNAo utilizando la interfaz “square lattice” proporciono en términos estructurales una figura plana, bien definida, la cual no presenta signos de torsión o curvatura, de acuerdo a los resultados mostrados en las figuras 33-37. Sin embargo, algunas estructuras parecen estar “fragmentadas”. Una posible explicación a los resultados de este estudio es que debido a la blanda estructura del ADN la punta pueda tener un efecto de distorsión en las nanoestructuras en la imagen. Una alternativa para cambiar las condiciones en el estudio morfológico de las nanoestructuras, es secar las muestras en la superficie de la mica con nitrógeno y analizarlas en modo “tapping” en aire con puntas especiales con un radio de curvatura entre 5-12 nm para obtener mejor resolución en las imágenes.
- La síntesis de estructuras circulares se llevaron a cabo por medio de la técnica de origami de ADN, donde la relación molar típica de andamio y grapas 1:10 proporcionó mejores resultados en comparación con la relación 1:60 [49].
- El estudio de la morfología por AFM en fluido, exhibe nanoestructuras planas de 2 nm de espesor y de forma circular uniforme con un diámetro aproximado de 45 nm. Por lo tanto, podemos decir que se cumple con el objetivo de sintetizar nanoestructuras de forma circular.
- El análisis de colocación y posicionamiento de nanopartículas de oro se realizó con el apoyo imágenes por AFM de la síntesis de los conjugados AuNPs-Origamis. Estos resultados exhiben estabilidad estructural, sin embargo, únicamente se logró colocar de 3 a 4 AuNPs de las 6 nanopartículas planeadas en cada nanoestructura (figura 38-40). Una



posible explicación a estos resultados, es que debido a las fuerzas de repulsión estéricas causadas por la proximidad entre AuNPs.

- Por otro lado, la figura 39 sugiere la presencia de interacciones π - π “stacking” [86,87], debido a la unión o apilamiento por atracción de los anillos aromáticos en la periferia de 3 estructuras circulares. Otro factor que podría jugar un papel predominante en esta interacción, es la unión de una nanopartícula con dos estructuras de origami generando un conjunto de ellas.
- Para determinar la formación de estructuras de origami de ADN en primera instancia se analizó por la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. La figura 30 muestra el corrimiento de las distintas bandas que prueba la formación de las nanoestructuras circulares, con grapas extendidas y con AuNPs. Como prueba de este concepto se verificó la formación de estructuras de origami de ADN por AFM.
- En este punto de nuestra discusión, y considerando todos los resultados experimentales, podemos decir que se requiere investigación adicional para establecer una relación clara entre AuNPs-Origami para lograr mejores rendimientos. Estudios recientes por Hernandez *et al* proponen el uso de dos proteínas (C_4 -B^{K12} y C_8 -B^{Sso7d}) con afinidad por el ADN. Las cuales generan estabilidad en las estructuras de origami de ADN y en el conjugado AuNPs-Origami [88,89]. La proteína compuesta por dos bloques (una parte hidrofílica y una parte de unión al ADN) favorece a la estabilidad de las nanoestructuras y evita el apilamiento π de las mismas. Por lo tanto, es importante considerarla para futuras modificaciones al proyecto.



- Otra estrategia para evitar la interacción π - π es extender una ssDNA con cinco timinas (T) en la periferia (T-Bumpers) donde se pretende evitar la unión entre estructuras por reconocimiento molecular [90].
- Una de las etapas cruciales que permitirán la formación de nanobobinas utilizando ADN como medio de construcción, es la metalización vía reducción química de plata. Siguiendo el protocolo de Pilo-Pais *et al*, en donde determinaron el tiempo de metalización óptimo para nanoestructuras de origami de ADN [14]. Este procedimiento no se realizó ya que se tiene que controlar en su totalidad la etapa de funcionalización con nanopartículas de oro y esto implica mayor investigación. Por lo que etapas posteriores corresponderían a una tesis de doctorado.



CAPÍTULO VI: REFERENCIAS

1. Shirtcliffe, N. K., Currie, H. A., Patwardhan, S. V., Perry, C. C., & Roach, P. (2006). Natural and Artificial Hybrid Biomaterials. In G. Kickelbich, *Hybrid Materials: Synthesis, Characterization, and Applications* (pp. 225-298). Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA. doi:10.1002/9783527610495.ch7
2. Moore, G. (1965). Cramming more components onto integrated circuits. *Electronics*, 38(8), 1-6.
3. The editors. (2010). "The next 20 Years of Microchips". *Scientific American*, 302(1), 82-89.
4. Samano, E. C. (2012). Papirolas y Nanoelectrónica. *Ciencia y Desarrollo*, 38, 24-28.
5. Lindsay, S. M. (2010). *Introduction to Nanoscience*. New York, USA: Oxford University Press Inc.
6. Eigler, D. M., & Schweizer, E. K. (1990). Positioning single atoms with a scanning tunnelling microscope. *Nature*, 344, 524-526.
7. Editorial. (2009). Anniversary of a myth. *Nature Materials*, 8, 771.
8. Whitesides, G. M. (2005). Nanoscience, Nanotechnology, and Chemistry. *Small*, 1(2), 172-179.
9. NNI. (2014). *National Nanotechnology Initiative*. (R. f. States, Editor) Retrieved 03 17, 10, from <https://www.nano.gov/>
10. Editorial. (2011). The story so far. *Nature Nanotechnology*, 6, 603.
11. Jones, M. R., Seeman, N. C., & Mirkin, C. A. (2015). Programmable materials and the nature of the DNA bond. *Science*, 347(6224), 841-852.



12. Seeman, N. C. (2004). Nanotechnology and the Double Helix. *Scientific American*, 290(6), 64-75.
13. Rothemund, P. W. (2006). Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature*, 440, 297-302.
14. Pilo-Pais, M., Goldberg, S., Samano, E., LaBean, T., & Finkelstein, G. (2011). Connecting the Nanodots: Programmable Nanofabrication of Fused Metal Shapes on DNA Templates. (A. C. Society, Ed.) *NanoLetters*, 11, 3489-3492.
15. Chargaff, E. (1951). Structure and function of nucleic acid as cell constituent. *Federation Proceedings*, 10, 654-659.
16. Chargaff, E., Vischer, E., Doniger, R., Green, C., & Misani, F. (1949). The composition of the desoxyribose nucleic acid of thymus and spleen. *The journal of Biological Chemistry*, 177, 405-416.
17. Watson, J. D., & Crick, F. H. (1953). A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171, 737-738.
18. Seeman, N. C. (1982). Nucleic Acid Junctions and Lattices. *Journal of Theoretical Biological*, 99, 237-247.
19. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2008). *Molecular Biology of the Cell* (5 ed.). New York: Garland Science.
20. Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M., & Losick, R. (2004). The Structure of DNA and RNA. In J. D. Watson, T. A. Baker, S. P. Bell, A. Gann, M. Levine, & R. Losick, *Molecular Biology of the Gene* (5 ed., pp. 97-127). San Francisco, CA, USA: Pearson Education, Inc.



21. Calladine, C. R., Drew, H. R., Luisi, B. F., & Travers, A. A. (2004). An Introduction to Molecular Biology for Non-Scientists. In C. R. Calladine, H. R. Drew, B. F. Luisi, & A. A. Travers, *Understanding DNA: The Molecule & How it works* (pp. 1-17). San Diego, CA, USA: El Servier Academic Press.
22. Pedersen, R., Marchi, A. N., Majikes, J., Nash, J. A., Estrich, N. A., Courson, D. S., & LaBean, T. H. (2014). Properties of DNA. In B. Bhushan, D. Luo, S. R. Schrickler, W. Sigmund, & S. Zauscher, *Handbook of Nanomaterials Porperties* (pp. 1125-1158). New York: Springer Heidelberg.
23. Seeman, N. C. (2007). An Overview of Structural DNA Nanotechnology. *Molecular Biotechnology*, 37(3), 246-257.
24. Holliday, R. (1964). A mechanism for gene conversion in fungi. *Genetical Research*, 5, 282-304. doi:10.1017/S0016672308009476
25. Kallenbach, N. R., Ma, R., & Seeman, N. C. (1983). An Immobile Nucleic Acid Junction Costructed from Oligonucleotides. *Nature*, 305, 829-831.
26. Weiss, P. S. (2008). A Conversation with Prof. Ned Seeman: Founder of DNA Nanotechnology. *American Chemical Society Nanotechnology*, 2(6), 1089-1096.
27. Sha, R., Liu, F., & Seeman, N. C. (2000). Direct Evidence for Spontaneous Branch Migration in Antiparallel DNA Holliday Junctions. *Biochemistry*, 39(37), 11514-11522.
28. Cohen, S. N., Chang, A. C., Boyer, H. W., & Helling, R. B. (1973). Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro. *Proceedings of the National Academy of Science*, 70(11), 3240-3244.
29. Wang, X., & Seeman, N. C. (2007). Assembly and Characterization of 8-Arm and 12-Arm DNA Branched Junctions. *Journal of the American Chemical Society*, 129(26), 8169-8176.



30. Wang, Y., Mueller, J. E., Kemper, B., & Seeman, N. C. (1991). Assembly and Characterization of Five-Arm and Six-Arm DNA Branched. *Journal of the American Chemical Society*, 30(23), 5667-5674.
31. Petrillo, M. L., Newton, C. J., Cunningham, R. P., Ma, R. I., Kallenbach, N. R., & Seeman, N. C. (1988). The ligation and Flexibility of Four-Arms DNA Junctions. *Biopolymers*, 27(9), 1337-1352.
32. Fu, T. J., & Seeman, N. C. (1993). DNA Double-Crossover Molecules. *Biochemistry*, 32, 3211-3220.
33. Seeman, N. C., & Lukeman, P. S. (2005). Nucleic Acid Nanostructures: bottom-up control of geometry on the nanoscale. *Reports on Progress in Physics*, 68, 237-270.
34. Li, X., Yang, X., Qi, J., & Seeman, N. C. (1996). Antiparallel DNA Double Crossover Molecules as Components for Nanoconstructions. *Journal of the American Chemical Society*, 118(26), 6131-6140.
35. Seeman, N. C. (1998). DNA Nanotechnology: Novel DNA Constructuins. *Annual Review Biophysics and Biomolecular Structures*, 27, 225-248.
36. Sa-Ardyen, P., Vologosdkii, A. V., & Seeman, N. C. (2003). The Flexibility of DNA Doble Crossover Molecules. *Biophysical Journal*, 84(6), 225-248.
37. Park, S. H., Pistol, C., Ahn, S. J., Reif, J. H., Lebeck, A. R., Dwyer, C., & LaBean, T. H. (2006). Finite-Size, Fully Addressable DNA Tile Lattices Formed by Hierarchical Assembly Procedures. *Angewandte Chemie*, 45(5), 735-739.
38. LaBean, T. H., Yan, H., Kopatsch, J., Furong, L., Winfree, E., Reif, J. H., & Seeman, N. C. (2000). Construction, Analysis, Ligation, and Self-Assembly of DNA Triple Crossover Complexes. *Journal of the American Chemical Society*, 122(9), 1848-1860.



39. Yan, H., Zhang, X., Shen, Z., & Seeman, N. C. (2002). A robust DNA Mechanical Device Controlled by Hybridization topology. *Nature*, *415*, 62-64.
40. Seeman, N. C. (1996). The design and engineering of nucleic acid nanoscale assemblies. *Current Opinion in Structural Biology*, *6*, 519-526.
41. He, Y., Ye, T., Su, M., Zhang, C., Ribbe, A. E., Jiang, W., & Mao, C. (2008). Hierarchical self-assembly of DNA into symmetric supramolecular polyhedral. *Nature*, *452*, 198-202.
42. Shi, X., Samano, E. C., Wu, X., Song, T., & Pan, L. (n.d.). Unpublished Results.
43. Editorial. (2016). Returning to the fold. *Nature Materials*, *15*, 245.
44. Saccà, B., & Niemeyer, M. C. (2012). DNA origami: The Art of Folding DNA. *Angewandte Chemie*, *51*, 58-66.
45. Sanderson, K. (2010). Bioengineering: What to make with DNA origami. *Nature*, *464*, 158-159.
46. Rothmund, P. W. (2005). Design of DNA origami. *International Conference on Computer Aided Design (ICCAD)* (pp. 470-477). San Jose, CA: IEEE/ACM. doi:<http://dx.doi.org/10.1109/ICCAD.2005.1560114>
47. Douglas, M. D., Dietz, H., Liedl, T., Högber, B., Graf, F., & Shih, M. W. (2009). Self-assembly of DNA into nanoscale three-dimensional shapes. *Nature*, *459*, 414-418.
48. Andersen, E. S., & Selnihhin, D. (2015). Computer-Aided Design of DNA Origami Structures. In M. A. Marchisio, *Computational Methods in Synthetic Biology, Methods in Molecular Biology* (pp. 23-44). New York: Springer Science.
49. Castro, C. E., Kilchherr, F., Kim, D.-N., Shiao, L. E., Wauer, T., Wortmann, P., . . . Dietz, H. (2011). A primer to scaffolded DNA origami. *Nature*, *8*(3), 221-229.



50. Douglas, S. M., Marblestone, A. H., Teerapittayanon, S., Vazquez, A., Church, G. M., & Shih, W. M. (2009). Rapid prototyping of 3D DNA-origami shapes with caDNAno. *Nucleic Acids Research*, 37(15), 5001-5006.
51. Peters, J. P., & Maher, L. J. (2010). DNA curvature and flexibility in vitro and in vivo. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 43(1), 23-63.
52. Bathe, M., Kim, D. N., Kilchher, F., & Dietz, H. (2012). Quantitative prediction of 3D solution shape and flexibility of nucleic acid nanostructures. *Nucleic Acids Research*, 40(7), 2862-2868.
53. Brown, S., Majikes, J., Martínez, A., Girón, T. M., Fennell, H., Samano, E. C., & LaBean, T. H. (2015). An easy-to-prepare mini-scaffold for DNA origami. *Nanoscale*, 7, 16621-16624. doi:10.1039/c5nr04921k
54. Bald, I., & Keller, A. (2014). Molecular Processes Studied at a Single-Molecule Level Using DNA Origami Nanostructures and Atomic Force Microscopy. *Molecules*, 19, 13803-13823.
55. Alivisatos, P. A., Johnsson, K. P., Peng, X., Wilson, T. E., Loweth, C. J., Bruchez Jr, M. P., & Schultz, P. G. (1996). Organization of 'nanocrystallmolecules' using DNA. *Nature*, 382, 609-611.
56. Sharma, J., Chhabra, R., Andersen, C. S., Gothelf, K. V., Yan, H., & Liu, Y. (2008). Toward Reliable Gold Nanoparticle Patterning On Self-Assembled DNA. *Journal American Chemical Society*, 130(25), 7820-7821.
57. Ding, B., Deng, Z., Yan, H., Cabrini, S., Zuckermann, R. N., & Bokor, J. (2010). Gold Nanoparticle Self-Similar Chain Structure Organized by DNA origami. *Journal of the American Chemical Society*, 132, 3248-3249.



58. Shen, X., Song, C., Wang, J., Shi, D., Wang, Z., Liu, N., & Ding, B. (2012). Rolling Up Gold Nanoparticle-Dressed DNA Origami into Three-Dimensional Plasmonic Chiral Nanostructures. *Journal of the American Chemical Society*, *134*, 146-149.
59. Kuzyk, A., Schreiber, R., Fan, Z., Pardatscher, G., Roller, E.-M., Hogele, A., . . . Liedl, T. (2012, March 15). DNA-based self-assembly of chiral plasmonic nanostructures with tailored optical response. *Nature*, *483*, 311-314.
60. Braun, E., Eichen, Y., Sivan, U., & Ben-Yoseph, G. (1998). DNA-templated assembly and electrode attachment of conducting silver wire. *Nature*, *391*, 775-778.
61. Hrust, S. J., Lytton-Jean, A. K., & Mirkin, C. A. (2006). Maximizing DNA Loading on a Range of Gold Nanoparticle Sizes. *Journal of American Chemical Society*, *78*(24), 8313-8318.
62. Huixiang, & Rothberg, L. J. (2004). Label-Free Colorimetric Detection of Specific Sequences in Genomic DNA Amplified by the Polymerase Chain Reaction. *Journal of the American Chemical Society*, *126*, 10958-10961.
63. Storhoff, J. J., Elghanian, R., Mirkin, C. A., & Letsinger, R. L. (2002). Sequence-Dependent Stability of DNA-Modified Gold Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, *18*, 6666-6670.
64. Reitz, J. R., Milford, F. J., & Christy, R. W. (1969). El campo magnetico de corrientes estacionarias. In J. R. Reitz, F. J. Milford, & R. W. Christy, *Fundamentos de la teoría electromagnética* (S. Alonso, Trans., 1 ed., pp. 159-182). UNION TIPOGRAFICA EDITORIAL HISPANO-AMERICANA.
65. Walker, J., Halliday, D., & Resnick, R. (2014). Magnetic Fields. In J. Walker, D. Halliday, & R. Resnick, *Fundamentals of Physics* (Vol. 10th edition, pp. 803-835). John Wiley & Sons, Inc.



66. Kopperger, E., & Rafat, A. A. (2015). AFM Studies and Surface Assisted Self-Assembly of DNA Nanostructures. *TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN*, 1-27.
67. Salazar M., A. M., Sandoval R., A. S., & Armendariz B., J. S. (2013). *Biología molecular: Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. Mc Graw Hill.
68. Feinberg, J. G., & Smith, I. (1972). *Paper and thin layer chromatography and electrophoresis*. (T. U. Michigan, Ed.) Longman.
69. Whatley, H. (2001). Basic Principles and Modes of Capillary Electrophoresis. In J. R. Petersen, & A. A. Mohammad (Eds.), *Clinical and Forensic Applications of Capillary Electrophoresis* (pp. 21-58). Totowa, NJ: Humana Press Inc. doi:10.1007/978-1-59259-120-6_2
70. Bellot, G., McClintock, M. A., Chou, J. J., & Shih, W. M. (2013). DNA nanotubes for NMR structure determination of membrane proteins. *Nature*, 8(4), 755-770. doi:10.1038/nprot.2013.037
71. Brown, T. A. (2007). *Genomes* (Vol. 3). Garland Science Publishing.
72. Sambrook, J., & Russell, D. (2000). Plasmids and Their Usefulness in Molecular Cloning. In J. Sambrook, & D. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Vol. 1, pp. 1.150-1.151). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
73. Tissue, B. M. (2002). *Ultraviolet and Visible Absorption Spectroscopy*. Wiley Online Library.
74. User Manual. (2009). *NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer*. Thermo Fisher Scientific Inc.
75. Manual. (2003). *SPM Training Notebook*. Veeco Instruments Inc.



76. Martin, Y., Williams, C. C., & Wickramasinghe, H. K. (1987, May 15). Atomic force microscope-force mapping and profiling on a sub 100-Å. *Journal of Applied Physics*, 4723-4729. doi:10.1063/1.338807
77. Bhushan, B., & Marti, O. (2011). Scanning Probe Microscopy - Principle of Operation, Instrumentation, and Probes. In B. Buchash, *Nanotribology and Nanomechanics I: Measurement Techniques and Nanomechanics* (pp. 37-110). Springer.
78. Last, J. A., Russell, P., Nealey, P. F., & Murphy, C. J. (2010). The Applications of Atomic Force Microscopy to Vision Science. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51(12), 6083–6094. doi:http://doi.org/10.1167/iovs.10-5470
79. Oviedo, M. J. (2007). *Síntesis de nanoalambres utilizando ADN como mediador*. Tesis de Maestría del Posgrado en Ciencia e Ingeniería de Materiales-UNAM.
80. Hansma, P. K., Cleveland, J. P., Radmacher, M., Walters, D. A., Hillner, P. E., Bezanilla, M., . . . Hansma, H. G. (1994). Tapping mode atomic force microscopy in liquids. *Applied Physics Letters*, 64(13), 1738-1740.
81. Putman, C. A., Van der Werf, K. O., De Grooth, B. G., Van Hulst, N. F., & Grave, J. (1994). Tapping mode atomic force microscopy in liquid. *Applied Physics Letters*, 64(18), 2454-2456.
82. Ruiz, D. D., Cardos, K. L., Martínez, A., Girón, T. M., & Samano, E. C. (2017). Nanostructures Based on DNA Origami and Applications. In C. W. Brooks, *Biomineralization: Fundamentals, Processes and Potential Applications* (Vol. 1, pp. 77-101). Hauppauge, New York: Nova Science Publishers, Inc.



83. Brewer, S. H., Glomm, W. R., Johnson, M. C., Knag, M. K., & Franzen, S. (2005, March 4). Probing BSA Binding to Citrate-Coated Gold Nanoparticles and Surfaces. (A. C. Society, Ed.) *Langmuir*, 21(20), 9303-9307.
84. Dharanivasan, G., Immanuel Jesse, D., Chandirasekar, S., Rajendiran, N., & Kathiravan, K. (2014). Label Free Fluorometric Characterization of DNA Interaction with Cholate Capped Gold Nanoparticles Using Ethidium Bromide as a Fluorescent Probe. *Journal of Fluorescence*, 24, 1397–1406. doi:10.1007/s10895-005-2627-y
85. Niekamp, S., Blumer, K., Nafisi, P. M., Tsui, K., Garbutt, J., & Douglas, S. M. (2016). Folding complex DNA nanostructures from limited sets of reusable sequences. *Nucleic Acids Research*, 44(11). doi:10.1093/nar/gkw208
86. Dhotel, A., Chen, Z., Delberilh, L., Yoyssef, B., Saiter, J.-M., & Tan, L. (2013). Molecular Motions in Functional Self-Assembled Nanostructures. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(2), 2303-2333. doi:10.3390/ijms14022303
87. Hunter, C. A., & Sanders, J. K. (1990). The Nature of π - π Interactions. *Journal of the American Chemical Society*, 112(14), 5525-5534. doi:10.1021/ja00170a016
88. Hernandez-Garcia, A., Estrich, N. A., Werten, M. W., Van Der Maarel, J. R., LaBean, T. H., de Wolf, F. A., . . . de Vries, R. (2016, December 1). Precise Coating of a Wide Range of DNA Templates by a Protein Polymer with a DNA Binding Domain. *ACS Nano*, 11(1), 144–152. doi:10.1021/acsnano.6b05938
89. Estrich, N. A., Hernandez-Garcia, A., de Vries, R., & LaBean, T. H. (2017, January 3). Engineered Diblock Polypeptides Improve DNA and Gold Solubility during Molecular Assembly. *ACS Nano*, 11(1), 831-842. doi:10.1021/acsnano.6b07291

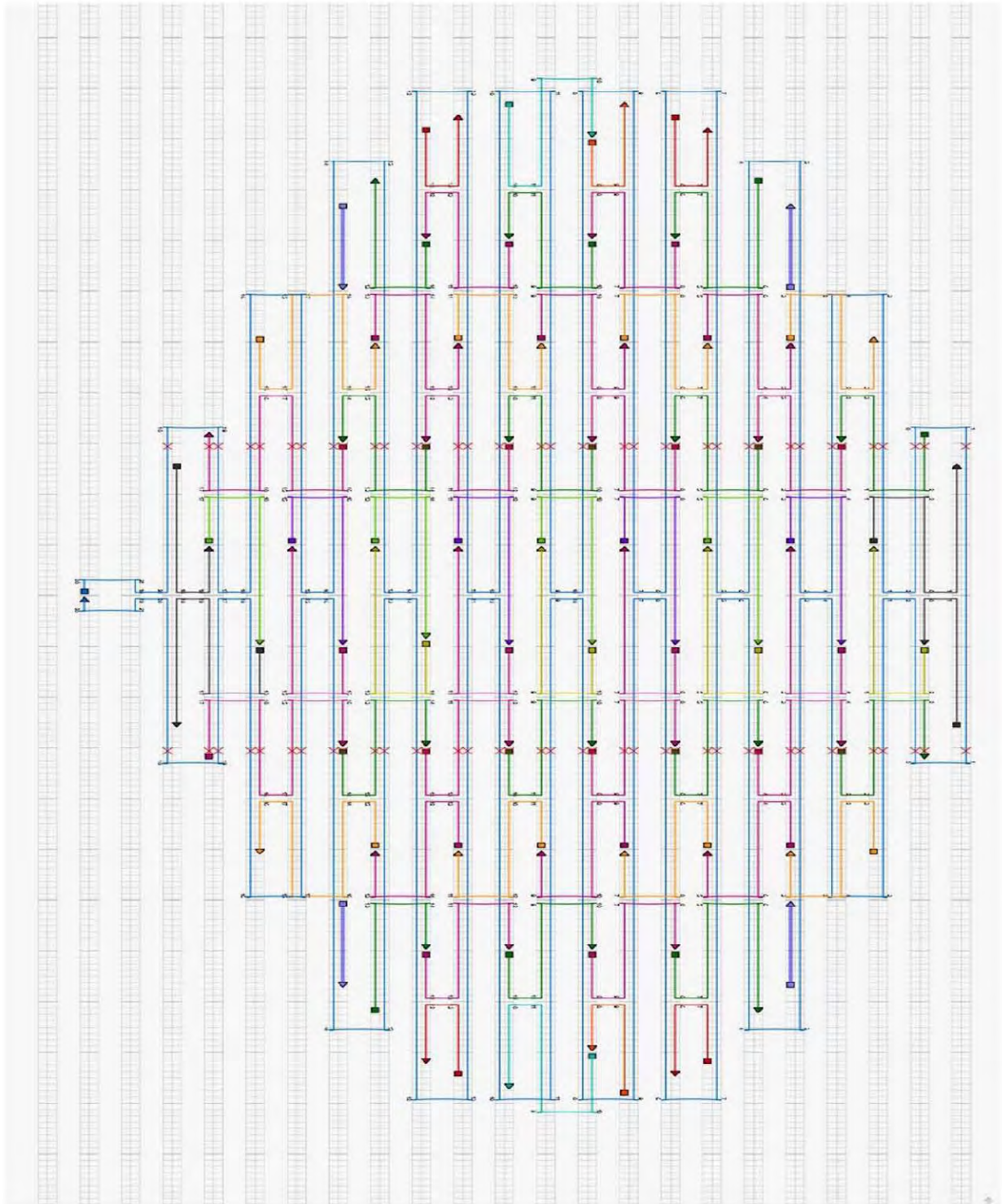


90. Kim, K. N., Sarveswaran, K., Mark, L., & Lieberman, M. (2011). Comparison of methods for orienting and aligning DNA origami. *Soft Matter*, 7, 4636-4643.
91. Teschome, B., Facsko, S., Schönherr, T., Kerbusch, J., Keller, A., & Erbe, A. (2016). Temperature-Dependent Charge Transport through Individually Contacted DNA Origami-Based Au Nanowires. *Langmuir*, 32(40), 10159-10165. doi:10.1021/acs.langmuir.6b01961



APÉNDICES

Apéndice A: Diseño del Mini-Circulo en el software caDNAno



Apéndice B: Secuencia del Mini-M13

ACGCGCCCTGTAGCGGCGCTTTAAGCGCGGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTG
ACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTC
TCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGT
TCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTT
CACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCA
CGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGT
CTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAG
CTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGCTTACAATTTCC
ATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGC
TATTACTCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATC
AGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTA
AAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACA
AAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAG
GCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCG
GATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGT
AGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCC
CCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCG
GTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGC
GAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACAC
TAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAG
AGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGT
TTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCT



TTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCA
TGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTA AAAATGAAGTTTAA
AATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCA
GTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCC
CGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAAT
GATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAG
CCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTA
TTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACG
TTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATT
CAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAA
AGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTT
ATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAG
ATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCG
GCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCA
GAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGA
TCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTC
AGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAACAGGAAGGCAAAATG
CCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTT
TTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTG
AATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTG
CCACCTG.



Apéndice C: Secuencia de los oligonucleótidos del Mini-Círculo

Nombre	Secuencia	Longitud
MiniM13-Circle-0[148]	GCGCGTAATCTGCTGCTTGCATCAAAGGA	29
MiniM13-Circle-1[102]	GGTTTGTTTAGGTAAGTGGCTTCAGGTAGCC	32
MiniM13-Circle-1[136]	TCTTCTTGGACCCCGTAGAAAAGACCAACTCT	32
MiniM13-Circle-2[119]	TTTTCCGAGCCGGATCAAGAGCTAAACAAAAAACCCACCGCTACC	45
MiniM13-Circle-2[168]	GAGTTTTTCGTCATGACCAAAATCCCACCTCATAT	33
MiniM13-Circle-3[104]	GTAGTTATACATACCTCGCTCTTACCGGAT	30
MiniM13-Circle-3[136]	GGTGAAGATCATTTTTAATTTAAACTCTGTA	32
MiniM13-Circle-3[152]	GATAATCTTCCACTGAGCGTCAAGATCCTTT	31
MiniM13-Circle-4[119]	GCACCGCCGGCCACCACTTCAAGAAGGATCTA	32
MiniM13-Circle-4[167]	ATACTTTACAGATCGCTGAGATAGGGGCCAGA	32
MiniM13-Circle-4[189]	GTCAGACCAAGTTT	14
MiniM13-Circle-4[79]	GTGGCTGCTGCCAG	14
MiniM13-Circle-4[87]	TGTTACCAAATACTGTTCTTCTAGCAGAGCGC	33
MiniM13-Circle-5[104]	AAGGCGCCAGCCAGCTTGGAGGCAGGGTC	30
MiniM13-Circle-5[136]	CAACTATGTTATCTACACGACGGGGGGGGTT	32
MiniM13-Circle-5[152]	AAATAGAGATTGATTTAAACTTCCTTTTT	30
MiniM13-Circle-5[62]	TCGTGTCTTACCGGGTTGAACTGAGATACCTACAAGGGAGAA	42
MiniM13-Circle-6[119]	CGTGCACAAGCGGTCCGGCTGAACGAGTCAGG	32
MiniM13-Circle-6[167]	TGGTAAGCCGGCCCTCCGGCTGGAACTACTT	32
MiniM13-Circle-6[201]	GGTCTCGCGGAAATCTGGAGCC	22
MiniM13-Circle-6[87]	CTACACCGGACTCAAGACGATAGTGCTAATCC	32
MiniM13-Circle-7[104]	GGAACAGGCCTGGTATCTTTATTTTTTACG	30
MiniM13-Circle-7[136]	AGTTGCAGAATAGACTGGATGGAGGCTCCAG	32
MiniM13-Circle-7[136]	AGTTGCAGAATAGACTGGATGGAGGCTCCAG	32
MiniM13-Circle-7[152]	CTGCGCTCCTCCCGTATCGTAGGATGAACG	30



MiniM13-Circle-7[184]	TTGCTGATTATCATTGCAGCACTGGTGCCTCACTGATTAAGC	42
MiniM13-Circle-7[52]	CACGCTTCCCGAGCGTGAGCTA	22
MiniM13-Circle-7[72]	AGGCGGACGCCACCTCTGACTTGAGGAGCCTA	32
MiniM13-Circle-8[119]	GGGGAAACGAGAGCGCACGAGGGAGCGGATAA	32
MiniM13-Circle-8[167]	ACTCTAGCTGAAGCCATACCAAACACCGAAGG	32
MiniM13-Circle-8[205]	CAACAACGTTGCGCCGATGCCT	22
MiniM13-Circle-8[87]	CGGGTTTCAGGTATCCGGTAAGCGCGAACGAC	32
MiniM13-Circle-9[104]	GTTCTGTCTGCGTTATCCCCGCAGCCT	30
MiniM13-Circle-9[136]	GATCGTTGATGGGGGATCATGTAATTGCTCAC	32
MiniM13-Circle-9[152]	AGCTGAATTCCCGGCAACAATTGACCACTT	30
MiniM13-Circle-9[184]	TGACACCAAACTATTAAGTGGCGCTGGTTTA	32
MiniM13-Circle-9[200]	GTAGCAATTTTTGCGGCCAACTTACTTCCATGAGTGATAACA	42
MiniM13-Circle-9[56]	AGGGGGGCGCGTCGATTTTTGT	22
MiniM13-Circle-9[72]	TGGAAAAACGTATTACCGCCTTTGAGGCCCGC	32
MiniM13-Circle-10[119]	ATGTTCTTGCCTTTTGCTGGCCTTCTCGCCTT	32
MiniM13-Circle-10[167]	AGCTAACCACAGTAAGAGAATTATGGTCGCCG	32
MiniM13-Circle-10[87]	TGGATAACCGCCAGCAACGCGGCCAGTCCTGT	32
MiniM13-Circle-11[104]	GAATGGCAAATTCGCGTTAAATCCAGTTTG	30
MiniM13-Circle-11[136]	AAAAGCATTGGTTGAGTACTCACCCGTTAATA	32
MiniM13-Circle-11[152]	TGGCATGGCTTTTTTGACAACGGAACCGG	30
MiniM13-Circle-11[184]	GCCATAACTGACAACGATCGGAGGGACGAGCG	32
MiniM13-Circle-11[50]	GAGTAATAGCGAAGAGTGAGCTGATACCGCTTTTTGCTCGTC	42
MiniM13-Circle-11[72]	ACCGATCGCATTTTTTAACCAATAAAGAATAG	32
MiniM13-Circle-12[119]	TTTTGTTAGAATGGAAATTGTAAGAGTCACAG	32



MiniM13-Circle-12[167]	CATACACTGTTTTCCAATGATGAGAGTTGGGT	32
MiniM13-Circle-12[203]	CCGTATTGACGCCTATGTGGCG	22
MiniM13-Circle-12[87]	AATCAGCTCCCTTCCCAACAGTTGTGATTCTG	32
MiniM13-Circle-13[104]	GAACAAGCAAAGGGCGAAAAACCACTAAAT	30
MiniM13-Circle-13[135]	TTGAGAGTTGGATCTCAACAGCGGTACGTGGAC	33
MiniM13-Circle-13[152]	GAAGAACATTCTCAGAATGACTCTTACGGA	30
MiniM13-Circle-13[184]	AAGTTCTGCGGGCAAGAGCAACTCGCAGTGCT	32
MiniM13-Circle-13[54]	TATAAATCAAGGCCGAAATCGG	22
MiniM13-Circle-13[72]	ACCGAGATGGCCCACTACGTGAACCA	26
MiniM13-Circle-14[119]	TCCAACGTAGTCCACTATTAAGAAAGATCC	31
MiniM13-Circle-14[167]	GCACGAGTGCCTTCCTGTTTTTTGTTCAATAATATTGAAATAACCCTGA	49
MiniM13-Circle-14[193]	TAAAAGATGCTGAAGATCCACTTTTA	26
MiniM13-Circle-14[87]	AGGGCGATAGGGTTGAGTGTTGTTTTTTGTTA	32
MiniM13-Circle-15[104]	CGGAACCGGAAAGCCGGCGAACAGCGGGCGCTAGGGCCCACCACAC	46
MiniM13-Circle-15[136]	TATTCCTTATTCAACATTTCCGTATTTAGAG	32
MiniM13-Circle-15[152]	GCATTTTGGGTTACATCGAACTTTCGCCCC	30
MiniM13-Circle-15[176]	CTCACCCAGAAACG	14
MiniM13-Circle-15[66]	CAAGTTTTTTGGGG	14
MiniM13-Circle-16[119]	CTTGACGGCTAAAGGGAGCCCCCGGTGCGCCCT	32
MiniM13-Circle-17[136]	ATATGTATGTTTATTTTTCTAAATGCACTTTTCGGGGAAATGTGC	45



MiniM13-Circle-17[87]	AGCGAAAGGGTGGCGAGAAAGGAAGTCGAGGTGCCGTAAAGCGTCTATC	49
MiniM13-Circle-18[119]	GCGCGTAAGCTGGCAAGTGTAGCGACATTCAA	32
MiniM13-Circle-18[153]	CCCCTATTTCCGCTCATGAGACAAAAGGAAGAGTATGAGTTTTTGCG	47
MiniM13-Circle-19[107]	CGCTTAAAGCGCCGCTACAGGGTCACGCT	29



Apéndice D: Secuencia de oligonucleótidos extendidos y “backfill” del Mini-Círculo

Nombre	Secuencia	Longitud
Backfill thiol3'	TTTTT/3ThioMC3-D/	5
BS 3'Thiol	ATTATTATTATTATTTTT/3ThioMC2-D/	19
5'Thiol BS	/5ThioMC6-D/TTT TTT TTT TTT TTT TTT	19
MiniC-16[119]-15[135]	CTTGACGGCTAAAGGGAGCCCCGGTCGCCCTTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAA	51
MiniC-18[119]-17[135]	GCGCGTAAGCTGGCAAGTGTAGCGACATTCAATTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAA	51
MiniC-19[107]-18[120]	CGCTTAAAGCGCCGCTACAGGGTCACGCTTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAA	48
MiniC-15[136]-16[120]	TATCCCTTATTCAACATTTCCGTATTTAGAGTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAA	51
MiniC-12[167]-14[168]	AATAATAATAATAATTTTTCATACACTGTTTTCCAATGATGAGAGTTGGGT	51
MiniC-14[167]-17[168]	AATAATAATAATAATTTTTGCACGAGTGCCTTCCTGTTTTTTGTTCAATAAT ATTGAAATAACCCTGA	68
MiniC-13[184]-11[183]	AATAATAATAATAATTTTTAAGTTCTGCGGGCAAGAGCAACTCGCAGTGCT	51
MiniC-4[167]-6[168]	ATACTTTACAGATCGCTGAGATAGGGGCCAGATTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAA	51
MiniC-9[184]-7[183]	TGACACCAAACTATTAAGTGGCGCTGGTTTATTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAA	51
MiniC-2[168]-4[168]	GAGTTTTCGTCATGACCAAAATCCCACTCATATTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAA	52
MiniC-2[119]-0[107]	AATAATAATAATAATTTTTTTTTCCGAGCCGGATCAAGAGCTAAACAAAAA AACCACCGCTACC	64
MiniC-3[136]-4[120]	AATAATAATAATAATTTTTGGTGAAGATCATTTTTAATTTAAACTCTGTA	51
MiniC-1[136]-2[120]	AATAATAATAATAATTTTTCTTCTTGACCCCGTAGAAAAGACCAACTCT	51
MiniC-4[119]-3[135]	AATAATAATAATAATTTTTGCACCGCCGGCCACCACTTCAAGAAGGATCTA	51
MiniC-6[87]-4[88]	CTACACCGGACTCAAGACGATAGTGCTAATCCTTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAA	51
MiniC-8[87]-6[88]	CGGGTTTCAGGTATCCGGTAAGCGCGAACGACTTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAA	51
MiniC-5[62]-7[71]	TCGTGTCTTACCGGGTTGAACTGAGATACCTACAAGGGAGAATTTAAAAA AAAAAAAAA	61
MiniC-14[87]-12[88]	AATAATAATAATAATTTTTAGGGCGATAGGGTTGAGTGTGTTTTTTGTTA	51
MiniC-12[87]-10[88]	AATAATAATAATAATTTTTAATCAGCTCCCTTCCAACAGTTGTGATTCTG	51
MiniC-13[72]-14[62]	AATAATAATAATAATTTTTACCGAGATGGCCCACTACGTGAACCA	45



