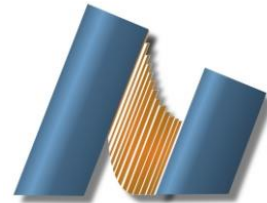




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
CENTRO DE NANOCIENCIA Y NANOTECNOLOGÍA



LICENCIATURA EN NANOTECNOLOGÍA
MICROELECTRÓNICA Y NANOFABRICACIÓN

AUTOENSAMBLE DE NANOESTRUCTURAS DE ADN CON NANOPARTÍCULAS DE ORO

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
LICENCIADO EN NANOTECNOLOGÍA

QUE PRESENTA:
AMANDA MARTÍNEZ REYES

DIRECTOR DE TESIS
DR. ENRIQUE CUAUHTÉMOC SÁMANO TIRADO

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA JUNIO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Hago constar que el trabajo que presento es de mi autoría y que todas las ideas, citas textuales, datos, ilustraciones, gráficas, etc. sacados de cualquier obra o debidas al trabajo de terceros, han sido debidamente identificados y citados en el cuerpo del texto y en la bibliografía y acepto que en caso de no respetar lo anterior puedo ser sujeto de sanciones universitarias.

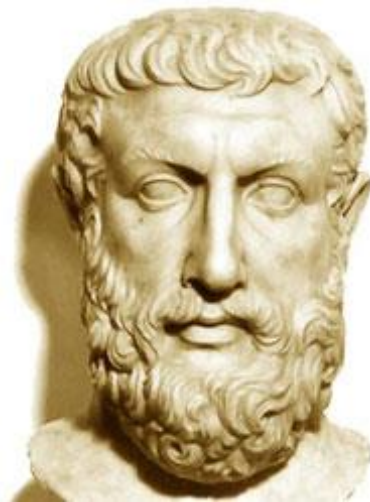
Afirmo que el material presentado no se encuentra protegido por derechos de autor y me hago responsable de cualquier reclamo relacionado con la violación de derechos de autor.

*AMANDA MARTÍNEZ
REYES*

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	vi
RESUMEN.....	vii
CAPÍTULO 1	
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 2	
ANTECEDENTES.....	7
2.1 Preámbulo.....	7
Del ADN a su funcionalización con AuNPs	
2.2 Propiedades del ADN.....	8
Biológicas, químicas, mecánicas, ópticas y eléctricas	
2.3 Propiedades específicas de las nanoestructuras de ADN.....	13
Uniones Holliday, entrecruzamientos, horquillas, desplazamiento de cadena e interacción π - π	
2.4 Ensamblajes de nanoestructuras de ADN.....	16
Ensamblajes de ADN como: mosaicos, redes y nanoestructuras mediante el uso de andamios	
2.5 Diseño de nanoestructuras por origami de ADN.....	18
Software caDNAno y CanDo	
2.6 Síntesis de nanoestructuras de ADN con nanopartículas de oro.....	21
Hibridación de nanoestructuras de ADN y su funcionalización con nanopartículas de oro	
2.7 Planteamiento del problema.....	24
2.8 Hipótesis.....	24
2.9 Objetivos.....	24
Generales y particulares	
3 CAPÍTULO 3	
METODOLOGÍA.....	25
3.1 Diagrama de flujo de la metodología general.....	26
3.2 Diseño por caDNAno y simulación por CanDo.....	27
3.3 Preparación de grapas y andamio.....	28
3.4 Recocido de la nanoestructura, caracterización por electroforesis y su purificación.....	30
3.5 Autoensamble de AuNPs y su purificación por la técnica <i>freeze and Squeeze</i>	31
3.6 Visualización por AFM de los origamis funcionalizados.....	33
4 CAPÍTULO 4	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
4.1 Diseño en CaDNAno y estudio de su estabilidad por CanDo.....	34

4.2 Estudio por electroforesis de la formación del rectángulo.....	35
4.3 Micrografías por AFM del rectángulo sin nanopartículas de oro.....	37
4.4 Micrografías por AFM del rectángulo con nanopartículas de oro.....	38
4.5 Autoensamble del conjugado AuNP-ADN en solución.....	39
4.6 Autoensamble del conjugado AuNP-ADN en superficie.....	40
4.7 Autoensamble del conjugado AuNP-ADN usando una proteína que neutraliza cargas eléctricas.....	41
5 CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y TRABAJO A FUTURO.....	42
6 CAPÍTULO VI REFERENCIAS.....	44



*“Son uniones: lo entero y lo no entero, lo concorde y lo discorde, lo consonante y lo disonante,
y del todo el uno y del uno el todo”*

Heráclito, 500 A. C.

AGRADECIMIENTOS

Este espacio no es suficiente ni mis palabras vastas para expresar la gratitud que siento hacia la vida. Ella me ha dado un cuerpo y una conciencia que me conducen hacia la justicia. Me ha enseñado a identificarme como parte de la naturaleza. Me ha mostrado el modelo del hombre a través de Juan Manuel Martínez Gama, mi padre. Me ha instruido con la inocencia de Hilda Irazú Reyes González, mi

madre. Me ha demostrado el valor de la compasión a través de los gestos de Felipa Gama Martínez y Laura Elena Reyes González, mis abuelas; del optimismo en cada chascarrillo de Jesús Óscar Martínez Sánchez, mi abuelo; y del amor de Irazú Marisol Martínez Reyes, Gerardo Manuel Martínez Reyes y Amadeo Martínez Reyes, mis hermanos y compañeros de vida. Me disculpo con todos ellos por haber adoptado una vida que me mantiene ausente. En mi conciencia repercutirá si en algún momento guardo algo para mí; si no le regreso a la vida cada respiro que me ha concedido.

La vida también me ha dotado de una nueva familia, a quien le debo mi bienestar y crecimiento personal. He decidido volverme hacia la ciencia gracias a Berenice Vargas Coronel, quien me ha inspirado—y hasta la fecha a muchos—con su pasión por la química. No he dejado de aprender de la fascinante personalidad de Enrique C. Sámano Tirado, un científico con inquietudes, cual niño, y sobre todo gran ser humano. Su guía, ayuda y amistad han sido vitales para mi realización en estos 4 años. Otra alma de niño que me ha cautivado es la de Nicole Estrich. He aprendido de lo maravilloso de las simples cosas gracias a su percepción de la vida. A ella junto con Jacob Majikes y Thom LaBean, le debo mi entendimiento sobre este trabajo. A mis amigos ambientalistas, Karen Lizbeth Cardos Tisnado y David Daniel Ruiz Arce, por sus grandiosas anécdotas y por haber inyectado tanta alegría al grupo de investigación.

Alzo la voz por aquellas personas que antes de acatar órdenes, son humanas, sensibles y serviciales. Infinitas gracias a la mejor administradora de licenciaturas, Laura Adriana Rosales Vasquez, a quien le debo todas las oportunidades que aproveché en estos 4 años.

Agradezco también a aquellos viejos y recientes amigos, quienes me han apoyado, aconsejado, acogido, alimentado, escuchado y acompañado en todo momento. Soy afortunada por conocerlos.

Finalmente a la felicidad de mi día a día, Osita.

RESUMEN

AUNTOENSAMBLE DE NANOESTRUCTURAS DE ADN CON NANOPARTÍCULAS DE ORO

Dentro de las síntesis de nanoestructuras por el enfoque *bottom-up* o de abajo a arriba, se encuentran las pertenecientes al área de la nanotecnología de ADN. En 1982 Nadrian Seeman creó la primera nanoestructura tridimensional hecha de dobles cadenas de ADN. Veinticuatro años después, Paul Rothemund ideó una manera sencilla para autoensamblar nanoestructuras en un solo paso, utilizando una cadena sencilla de ADN circular de 7249 nt (nucleótidos), llamada andamio, y cerca de 200 oligonucleótidos complementarios, nombrados como grapas, a cierta región del andamio. De modo que al hibridizar las cadenas de ADN, una estructura con geometría reconocible era posible de sintetizar. Esta técnica recibió el nombre de origami de ADN. Una de las aplicaciones más prometedoras del origami de ADN son las orientadas a la fabricación de nanodispositivos ópticos y/o electrónicos. El estudio aquí presentado se propuso fabricar un circuito a la nanoescala conocido como *Split-ring resonator*. Se ha demostrado que este circuito es capaz de variar la permitividad y permeabilidad de un medio material. Para construir tal circuito se sintetizó una nanoestructura rectangular por la metodología de origami de ADN, haciendo uso de un software CAD y de un programa que calculó la estabilidad de dicha estructura. Enseguida, esta nanoestructura rectangular fue funcionalizada con nanopartículas de oro de 5 nm de diámetro. Éstas dieron una forma aproximada al circuito esperado. Estas estructuras fueron caracterizadas por electroforesis en gel de agarosa y por microscopía de fuerza atómica. De las 12 nanopartículas esperadas, 8 se lograron enlazar en los sitios de enlace programados. Se empleó la proteína C8-BS^{s07d} para mejorar la unión de las nanopartículas de oro al origami de ADN. En este escrito se describen los fundamentos para construir ensambles de nanoestructuras de ADN con materiales inorgánicos.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

En las ciencias exactas usualmente se piensa que el Universo—como Heráclito planteó en el 500 A. C.—está formado por *fuerzas* opuestas tales como las cargas positivas y negativas, el calor y frío, y la vida y muerte. En el caso particular de las nanociencias, esto no es la excepción. Esta disciplina, que manipula la materia a escala nanométrica, tiene dos vertientes antitéticas para la síntesis de nanomateriales: *top-down* y *bottom-up* [1].

Mientras la primera vertiente fracciona un objeto macroscópico en sus componentes más fundamentales hasta llegar a un nivel nanométrico, la segunda toma el camino contrario. Las técnicas *top-down*, como las de generación de patrones por litografía, han dominado en la ciencia de materiales, la ingeniería eléctrica, y física del estado sólido. Sin embargo, este enfoque de miniaturización presenta limitaciones para alcanzar dimensiones menores a un micrómetro, para fabricar materiales con composición química específica, y para ofrecer costos rentables de fabricación. Como respuesta a tales necesidades, los científicos del área decidieron incorporar un enfoque que por años los químicos habían implementado: la síntesis de abajo a arriba, o bien, *bottom-up* [2].

Las técnicas *bottom-up* construyen sistemas complejos a partir de los niveles más elementales de la materia, como los átomos y las moléculas. Este reduccionismo tecnológico pretende no solamente sintetizar nanoestructuras átomo por átomo, sino también explicar el Universo a partir del microcosmos [3]. Tal aseveración sugiere que bastaría con describir las interacciones fundamentales dentro de una célula para entender el funcionamiento de un organismo. Aunque fácilmente se podrían encontrar pruebas que desmientan tal aseveración, esta aproximación reduccionista tiene utilidad en sistemas menos complejos que un organismo, tales como en las nanoestructuras.

Una de las técnicas *bottom-up* es el autoensamble. El autoensamble se refiere a la organización propia de las partes de un sistema. Este fenómeno se presenta en la naturaleza; dentro de las células. Fueron los químicos quienes biomimetizaron este proceso para sintetizar nanoestructuras. El principio de autoensamble consta del reconocimiento molecular de los bloques que conforman una nanoestructura [4].

El padre de la nanotecnología de ADN, el bioquímico Nadrian Seeman, utilizó por primera vez en 1983 el biopolímero ácido desoxirribonucleico (ADN) sintético como material para construir estructuras con dimensiones de las unidades de nanómetros [5]. En la actualidad existen más de 20 grupos multidisciplinarios de científicos alrededor del mundo que contribuyen a la consolidación de

este campo de investigación [6].

El avance de la nanotecnología de ADN se debe al desarrollo de algoritmos matemáticos [6] estudios termodinámicos del ADN [7], reacciones químicas para la síntesis del ADN, y de la mimetización de sistemas biológicos [8, 9]. El avance en el conocimiento y, en consecuencia, impulso tecnológico son tales, que hoy en día la nanotecnología de ADN es una de las técnicas más versátiles, precisas y prometedoras para la síntesis de nanoestructuras. En cuestión de dos horas se pueden sintetizar 10^{14} nanoestructuras en un volumen de 100 μl con un costo de producción de \$1.43 US [10].

Una de las áreas que más ha impulsado a la nanotecnología de ADN es la computación molecular. En 1994 el matemático Leonard Adleman utilizó por primera vez el ADN para resolver un problema matemático. El problema consistió en encontrar el camino Hamiltoniano (*The Hamiltonian path problem*): un arreglo de 7 nodos donde se tenía que llegar del nodo inicial al nodo final pasando por todos los demás una sola vez, tal y como se muestra en la Figura 1.1. Adleman le asignó una secuencia de ADN a cada nodo, enseguida mezcló todas las secuencias en una solución, como resultado éstas se unieron y formaron los posibles caminos Hamiltonianos del problema. Este experimento abrió el campo de la computación molecular, y con él, la capacidad de programar cadenas de ADN [11].

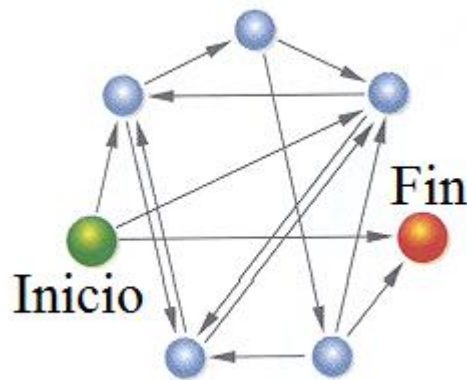


Figura 1.1. Problema del camino Hamiltoniano. Siete nodos de los cuales uno es el punto de inicio y otro el final. Existen 14 rutas alternativas para llegar del inicio al fin pasando una vez por cada nodo [adaptado de 11].

Otro gran motor de la nanotecnología de ADN se encuentra en los estudios termodinámicos que describen el mecanismo de reacción de las nanoestructuras basadas en ADN. Estudios de las funciones de estado termodinámicas han permitido explicar los caminos de síntesis que son más probables de ocurrir [10]. De este modo hoy en día se puede predecir, mediante softwares de diseño, la formación de estas nanoestructuras.

Las aplicaciones de la nanotecnología de ADN son muy variadas [12]. Este campo ha abierto nuevos panoramas como la computación molecular a base de ADN, además de haber revolucionado otros ya existentes como la fabricación de sensores electroquímicos, ilustrado en la Figura 1.2, para detectar cáncer de pulmón [13]; nano-robots que contienen y liberan blancos de anticuerpos (Figura 1.3) [14]; y dispositivos nanoelectrónicos como un transistor de un sólo electrón (Figura 1.4) [15].

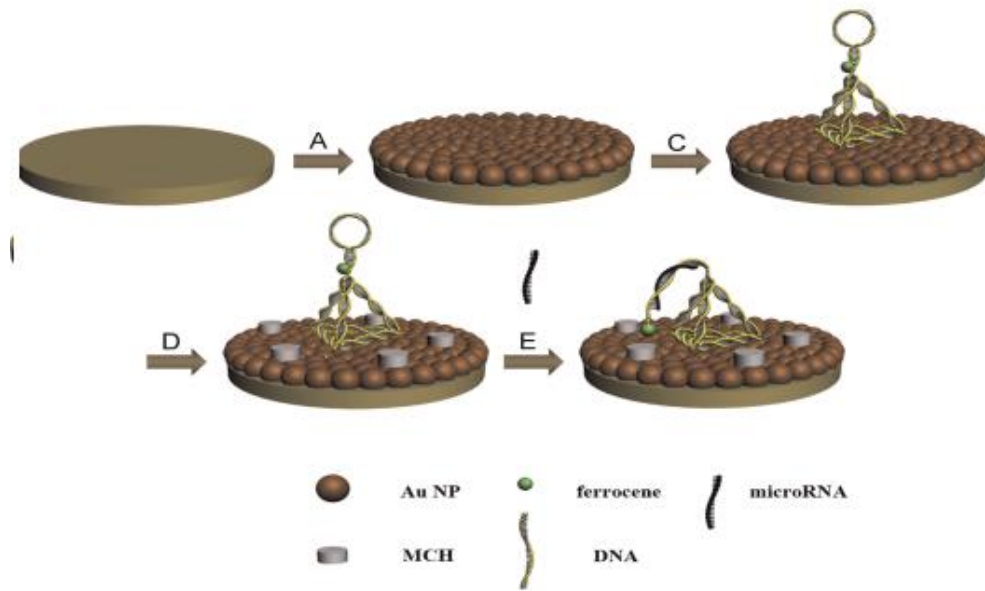


Figura 1.2. Sensor electroquímico de microRNA presente en células cancerosas de pulmón. Se muestra un tetraedro sintetizado por origami de ADN y funcionalizado con una nanopartícula de oro. Este encuentra enlazado a una superficie de ferroceno [adaptado de 13].

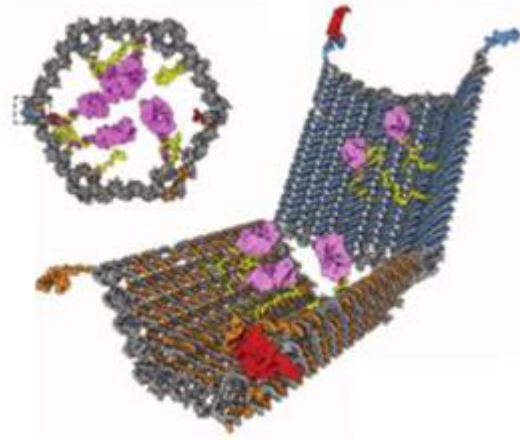


Figura 1.3. Nano-robot que transporta y libera blancos de anticuerpos. La estructura está hecha de ADN que almacena blancos de anticuerpos, que reconocen ciertas células [adaptado de 14].

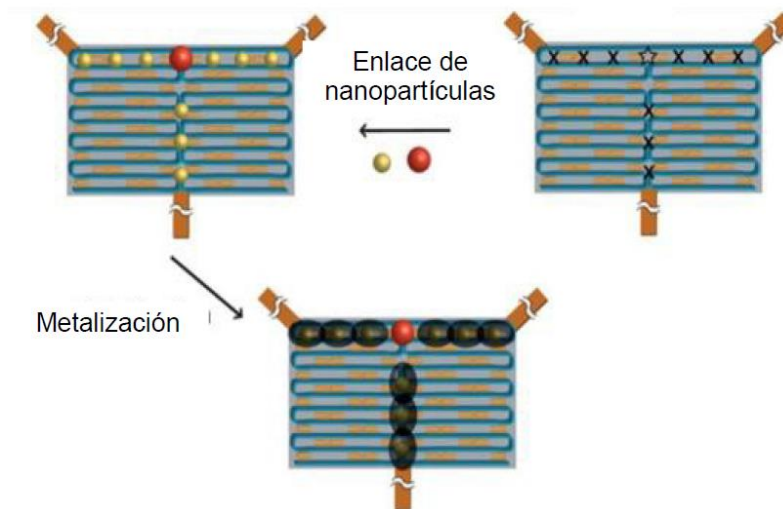


Figura 1.4. Transistor NPN de un electrón. Dispositivo conformado por una nanoestructura rectangular funcionalizada con nanopartículas metálicas (color amarillo) y semiconductoras (color rojo) [adaptado de 15].

Se pueden fabricar nanodispositivos bi o tri-dimensionales con cierta facilidad si se doblan las cadenas de ADN, cual celulosa en el arte de la papiroflexia (u origami en japonés). Esta metodología fue bautizada como Origami de ADN por su creador, el computólogo Paul Rothemund en el 2006 [16]. Bastan cadenas de ADN sintético, una solución amortiguadora (referida como “buffer” en este trabajo) apropiada, un termociclador e imaginación para formar, como se aprecia en la Figura 1.5, desde geometrías relativamente sencillas como un triángulo de 127 nm por lado hasta las más excéntricas como La Noche Estrellada de Van Gogh [17].

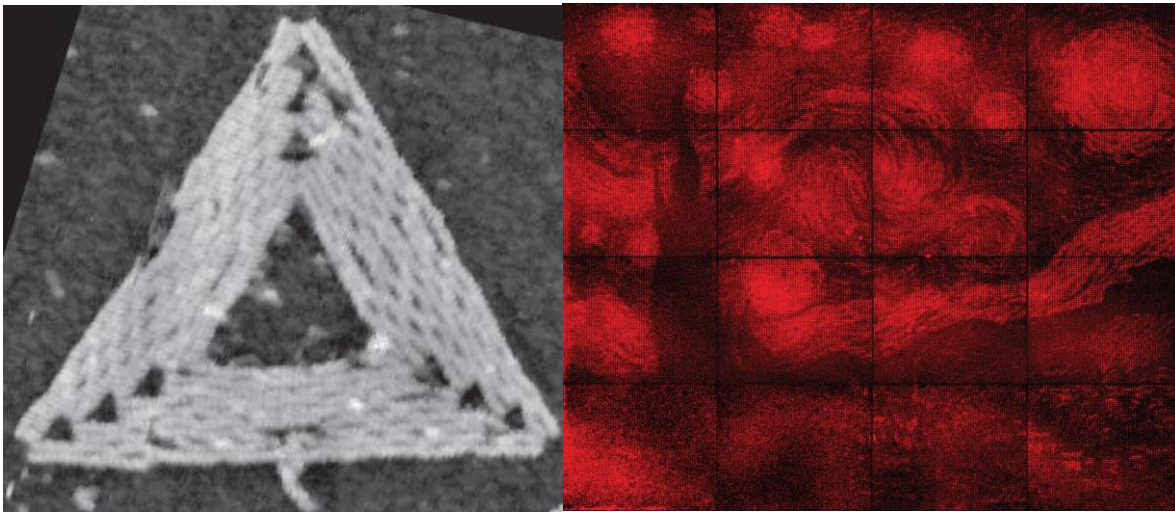


Figura 1.5. Micrografías de AFM de a) un triángulo de origami de ADN de 127 nm de lado y b) el cuadro de La Noche Estrellada formado por la unión de estos triángulos funcionalizados con cristales fotónicos.

La nanoestructura elegida puede fungir como matriz para colocar de manera controlada y con precisión nanométrica tanto materiales orgánicos como inorgánicos. Algunos de los materiales que se han logrado enlazar al origami de ADN son el par estraptividina-biotina, los derivados del péptido His6, la benzilguanina-clorohexano, haloalcano-halogenasa, los puntos cuánticos, las nanovarillas y nanopartículas metálicas [18].

La investigación de vanguardia sobre origami de ADN radica en la gran precisión nanométrica de la técnica y en la eficiencia de su síntesis, así como en la posibilidad de desarrollo de aplicaciones escalables a nivel industrial. En este estudio se establecieron los protocolos para decorar dichas nanoestructuras con patrones de AuNPs. Se propusieron aplicaciones para la estructura obtenida.

En este estudio se aprovechó la propiedad de autoensamble del ADN para sintetizar nanoestructuras, y enseguida, para formar conjugados de ADN-AuNPs. La decoración o

funcionalización con nanopartículas de oro (AuNPs) es el proyecto aquí planteado, debido a su potencial uso en la nanoelectrónica. La nanoestructura aquí desarrollada se propone para fabricar un dispositivo capaz de variar las constantes de permitividad y permeabilidad de un medio material. Estos se conocen como *Split ring resonators* [19].

CAPÍTULO II ANTECEDENTES

Preámbulo

Aproximadamente 300 años transcurrieron desde que se empezaron a describir las partículas de oro, y poco más de 50 años desde el descubrimiento de la estructura de doble-hélice del ADN, hasta la síntesis de las primeras nanoestructuras funcionalizadas con nanopartículas de oro. En esquema cronológico de la Figura 2.1 se muestran los principales hitos que han dado pie al presente trabajo. Estos se describen con mayor detalle a lo largo de este capítulo.

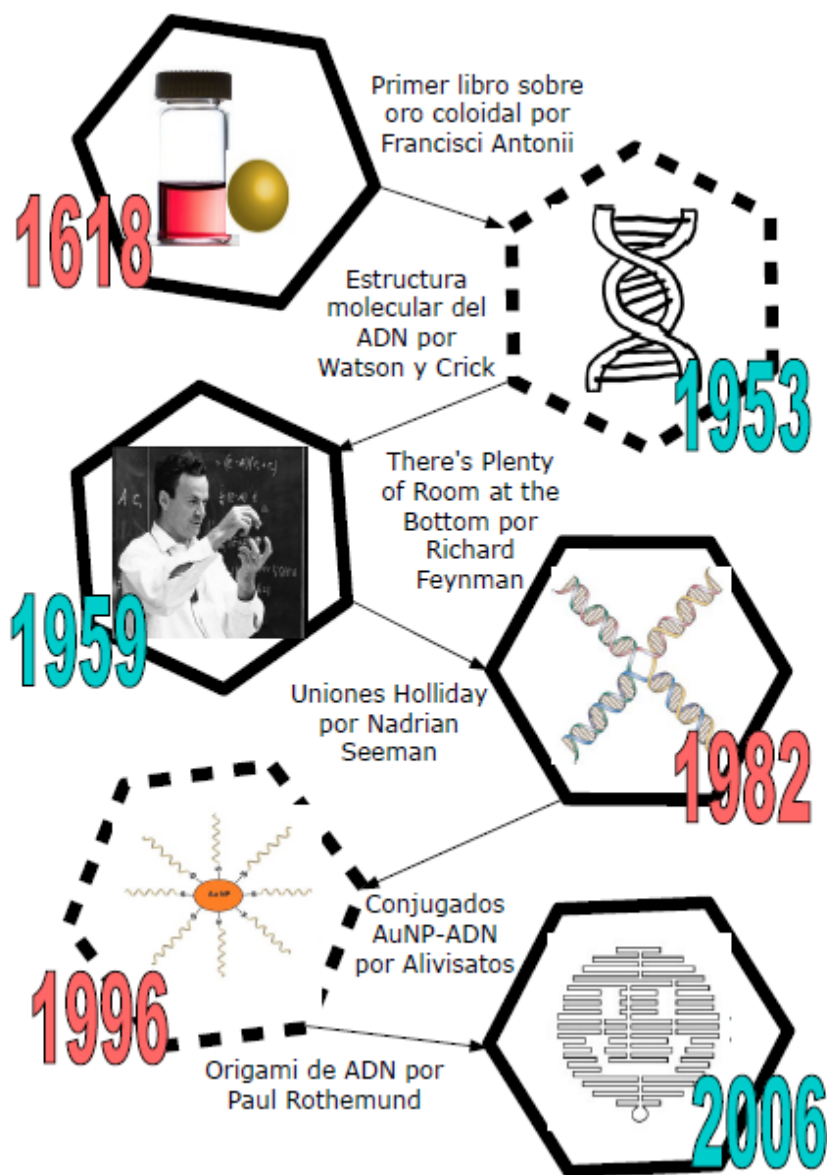


Figura 2.1. Cronología de los primeros estudios de las partículas de oro y del ADN hasta la síntesis de nanoestructuras de ADN funcionalizadas con AuNPs [5, 16, 20, 21 y 22].

Propiedades del ADN

El ADN posee propiedades químicas, biológicas, mecánicas, ópticas y eléctricas que deben ser comprendidas para fabricar nanoestructuras con él [23]. El entendimiento de sus propiedades químicas y biológicas ha dado origen a la metodología de síntesis aquí implementada. Por otro lado, las propiedades mecánicas y estructurales del ADN indican las limitaciones en el diseño de tales nano-objetos. Finalmente, éstos se caracterizan gracias al conocimiento de las propiedades ópticas y eléctricas del ADN. Cada una de estas propiedades se describe a continuación.

Químicas

A inicios del siglo XVIII los bioquímicos Albrecht Kossel y Phoebus Levene describieron la composición química de los ácidos nucleicos (ADN y ARN). En sus estudios se sugiere que estos biopolímeros están conformados por cinco nucleobases: adenina (A), timina (T), guanina (G), citosina (C) y uracilo (U). Cada una de estos nucleótidos está constituido por una base nitrogenada, un grupo fosfato y una pentosa. En el caso del ADN, como se muestra en la Figura 2.2, la pentosa es una 2-desoxirribosa, y las bases correspondientes son A, T, G y C. Estos son compuestos heterocíclicos de carbono, nitrógeno, oxígeno e hidrógeno [ADN].

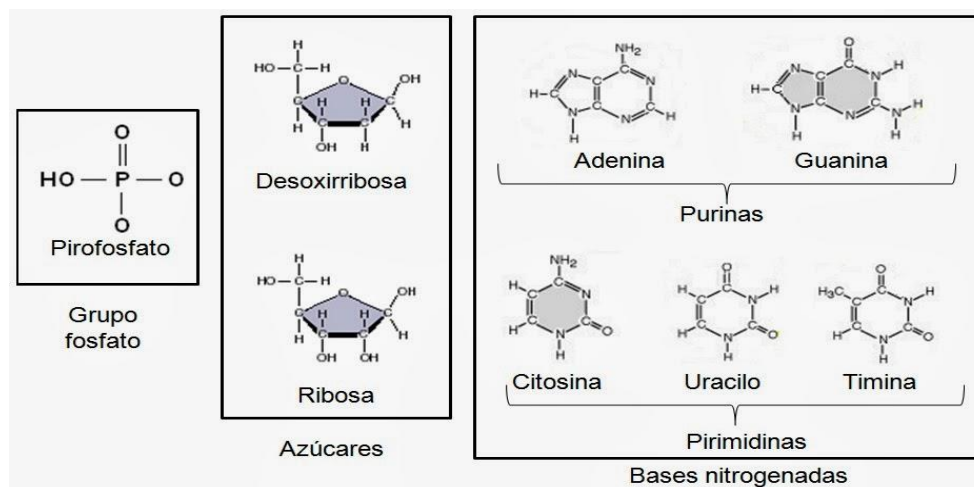


Figura 2.2. Composición química de los ácidos nucleicos. Un grupo fosfato, un azúcar, y 4 bases nitrogenadas de 5 posibles: adenina, guanina, citosina, timina y uracilo.

Fue hasta 1953 cuando James Watson y Friedrich Crick publicaron el modelo ADN-B (de las tres estructuras existentes ADN-A, ADN-B y ADN-Z) a partir de estudios de difracción de rayos-X para representar la estructura molecular del ácido desoxiribonucleico [21]. El ADN-B es una doble-hélice formada por el enlace covalente entre el grupo fosfato (PO_4) y los carbonos 3' y 5' de la pentosa. Estos enlaces le dan dirección a la molécula: 3' a 5', o bien, de 5' a 3'. El ADN se encuentra como cadena sencilla o cadena doble (por sus siglas en inglés ssDNA y dsDNA, respectivamente). Esta última, mostrada en la Figura 2.3, se forma cuando dos cadenas sencillas antiparalelas (con orientaciones opuestas) se unen por medio de 2 enlaces de hidrógeno entre A y T, y 3 entre C y G bajo condiciones termodinámicas específicas. Este apareamiento de las bases se conoce como hibridación del ADN [23].

Además de las interacciones electrostáticas entre las bases, el ADN de doble cadena presenta interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas, y son éstas las que le aportan la estabilidad estructural. Las interacciones hidrofílicas se deben a los momentos dipolares no nulos del enlace fosfodiéster y de la molécula desoxirribosa. Por otro lado, la hidrofobicidad surge del apilamiento de los anillos aromáticos adyacentes, debido a la atracción entre sus enlaces dobles. Esta propiedad recibe el nombre de interacción π - π , y es la principal fuerza que proporciona estabilidad al ADN [23].

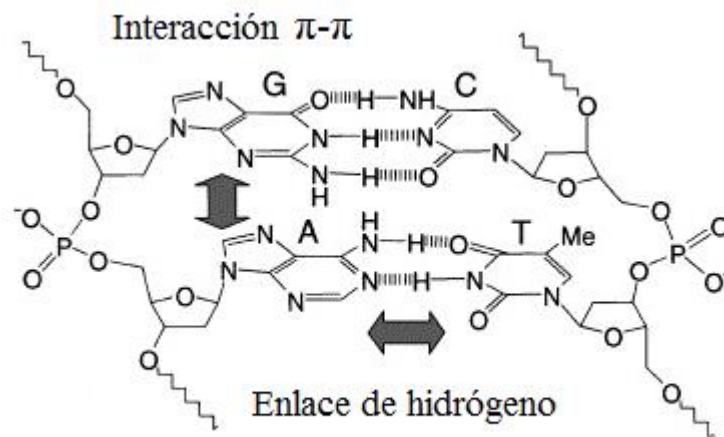


Figura 2.3. Fuerzas estabilizadoras de la doble cadena de ADN. Se muestra la interacción π - π (hidrofóbica) entre anillos consecutivos, los enlaces fosfodiéster y ribosas (hidrofílicos), y los enlaces de hidrógeno entre las bases A-T y G-C.

Otros factores que afectan la estabilidad de la dsDNA son el pH, la salinidad y temperatura de la solución amortiguadora en la que se encuentra [23]. A pH ácidos o básicos los elementos que participan en los enlaces de hidrógeno se pueden protonar o desprotonar, lo que cambiaría el número de estos enlaces por par de bases. Adicionalmente, las soluciones catiónicas otorgan estabilidad al ADN debido a que neutralizan la carga negativa del grupo fosfato. Las soluciones con Mg^{2+} son las que proveen mayor estabilidad. Por último, la temperatura de la solución amortiguadora es determinante para formar y mantener el ADN bicatenario. La temperatura de desnaturalización (T_m por sus siglas del inglés *melting temperature*) del ADN, cuando pasa de *dsDNA* a *ssDNA*, está dada por los parámetros mencionados, por la secuencia de bases y por la longitud de la doble cadena.

Las interacciones π - π , los enlaces de hidrógeno, la direccionalidad de las cadenas, la secuencia y longitud de las cadenas, y el pH y salinidad de la solución forman las bases para la construcción de nanoestructuras con ADN [23].

Biológicas

La importancia biológica del ADN radica en su capacidad de almacenamiento de información. Este biopolímero puede albergar 1 TB de información en un volumen de 60 pm^3 ; 6 órdenes de magnitud menor que el volumen de un disco duro actual. El ADN de toda célula, de acuerdo al dogma central de la biología, codifica para formar más ADN o ácido ribonucleico (ARN), y este último a su vez codifica para formar proteínas. Sin embargo, la estructura molecular del ADN varía de acuerdo al tipo de organismo estudiado [23].

La biología establece tres dominios para clasificar a los organismos de acuerdo a sus células: arquea, bacteria y eucaria. Las células de este último poseen un núcleo que alberga las moléculas de ADN en forma de cromosomas. En el caso de arquea y bacteria los organismos son unicelulares sin núcleo y con ADN circular.

Las bacterias además de la doble cadena de ADN, tienen cadenas sencillas circulares de ADN llamadas plásmidos. Estas secuencias pueden ser replicadas y transmitidas entre bacterias o entre bacterias y virus (descrito en la sección de Ensamble de nanoestructuras de ADN). La replicación del ADN se lleva a cabo por una gran variedad de enzimas.

Dentro de las células se encuentran las enzimas necesarias para replicar su ADN. Dentro de estas se encuentran: las nucleasas, que separan el ADN en secuencias específicas; las ligasas, que enlazan secuencias de cadena sencilla; las helicasas que deshebran la doble cadena; las polimerasas que leen una cadena sencilla y sintetizan su complementaria; y las topoisomerasas, que rompen enlaces en una de las cadenas de la doble hélice. Además de la creación de ADN a partir de una cadena bicatenaria antecesora, la célula también puede formar una cadena a partir de dos cadenas bicatenarias antecesoras, mediante la recombinación genética [23].

Durante la recombinación genética se pueden formar estructuras autoensambladas de ADN, como las uniones Holliday. Estas constan de la unión de 4 cadenas parcialmente complementarias entre sí, que forman una estructura de cuatro brazos movibles, como la que se muestra en la Figura 2.4. La búsqueda de secuencias de ADN que dieran lugar a uniones tipo-Holliday fijas, dio origen al campo de la nanotecnología de ADN [5].

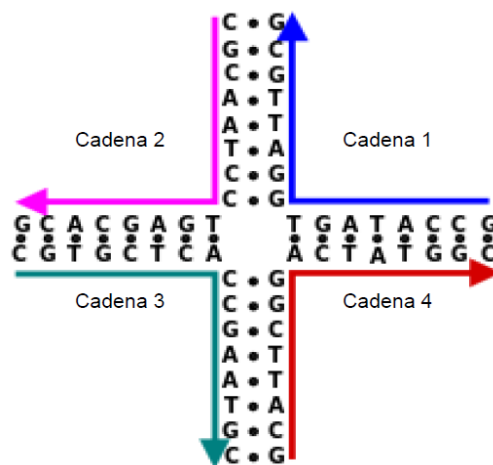


Figura 2.4. Unión Holliday durante la recombinación genética. Está formada de cuatro cadenas sencillas de ADN representadas por los colores. Estas poseen secuencias complementarias entre sí, de modo que entre ellas forman una estructura de cuatro brazos.

Mecánicas, eléctricas y ópticas

El área de nanotecnología de ADN utiliza este biopolímero como material de construcción de nanoestructuras, por lo que es crucial conocer sus dimensiones y propiedades mecánicas. El ADN como cadena doble puede visualizarse como una vara rígida con dimensiones mostradas en la Tabla I. La flexibilidad del ADN es tal que puede doblarse 500,000 veces dentro del núcleo de una célula. La

rigidez del ADN se mide en términos de su longitud de persistencia, la cual indica hasta qué longitud promedio el ADN comienza a flexionarse [23].

En la Figura 2.5 se muestran algunas características del ADN, las cuales lo hacen ideal como material de construcción en la nanoescala. El ADN como doble hélice presenta surcos, uno mayor y otro menor. Cada 10.5 pares de bases forman una vuelta de la hélice de 3.36 nm de longitud. Estos parámetros han sido considerados en los softwares de diseño de nanoestructuras de ADN.

Conocer las propiedades eléctricas del ADN ha permitido llegar a su caracterización y a su funcionalización con diversas moléculas (temas de las secciones respectivas). El ADN tiene una carga total negativa proveniente de sus grupos fosfatos. Su densidad eléctrica lineal varía si se trata de una cadena sencilla o doble [23].

La densidad electrónica de los enlaces moleculares de los nucleótidos repercute en las propiedades ópticas del ADN. Estos enlaces absorben luz de longitud de onda de 260 nm. Tal absorbancia es utilizada para medir la concentración de ADN en una solución mediante técnicas espectroscópicas.

Tabla I. Propiedades mecánicas y eléctricas del ADN

	dsDNA	ssDNA
Distancia longitudinal por vuelta (nm)	3.36	
Bases por vuelta	10.5	
Diámetro de la hélice (nm)	~ 2	
Longitud del surco mayor (nm)	1.17	
Longitud del surco menor (nm)	0.57	
Espacio entre bases (nm)	0.33	0.6
Longitud de persistencia (nm)	50	1.5-3
Densidad eléctrica lineal (e⁻/nm)	6	1.66

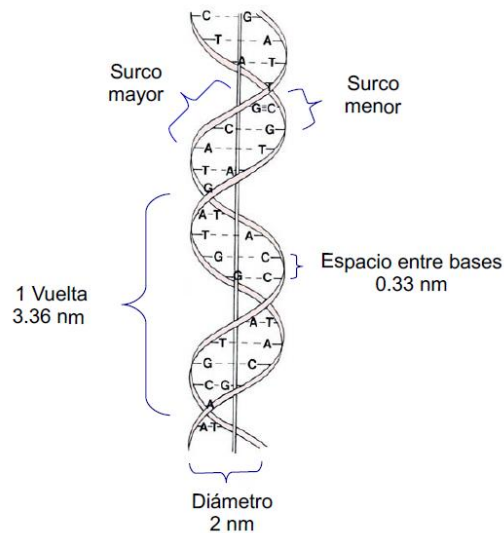


Figura 2.5. Diagrama de la estructura del ADN. Se muestra una vuelta completa, el surco mayor y menor, el diámetro de la hélice, y la distancia entre cada par de bases.

Propiedades específicas de las nanoestructuras de ADN

Una vez revisadas las propiedades del ADN, se prosigue con las propiedades específicas de las nanoestructuras de ADN. Se podrá notar que todas ellas han sido copiadas de procesos naturales de la célula, y enseguida adaptadas a la escala de las nanoestructuras.

Extremos pegajosos

La primera propiedad se refiere a la unión de dos dobles hélices colineales debido a que éstas en sus extremos tienen secuencias cortas de bases desapareadas, que además son complementarias entre sí. Cuando estas hélices se aproximan, sus extremos se reconocen y fusionan en una sola hélice. Los extremos pegajosos son ampliamente utilizados para la construcción de redes de ADN [23].

Desplazamiento de cadena

La segunda propiedad a revisar es el desplazamiento de cadena debido a la interacción débil de los enlaces de hidrógeno. Si en la proximidad de una cadena sencilla se encuentran dos o más cadenas que poseen alguna sección complementaria, entonces estas competirán para enlazarse, de modo que

una podrá desplazar a la otra [24], como se muestra en la Figura 2.6.

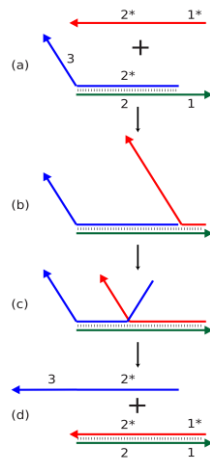


Figura 2.6. Desplazamiento de cadena. Se muestra una cadena sencilla de color negro y dos complementarias de color azul y rojo. En a) la cadena azul enlaza a la negra en la sección 2. b) La cadena roja enlaza la sección 3. Ambas cadenas están enlazadas. c) La roja empieza a desplazar a la azul. d) Solamente la roja enlaza a la negra.

El desplazamiento de cadena se presenta en las uniones Holliday intrínsecas del ADN. En general para la construcción de nanoestructuras se prefieren secuencias que no presenten esta propiedad, con la finalidad de no deformar las estructuras y que sean fijas.

Uniones Holliday

Las uniones Holliday naturales del ADN presentan desplazamiento de cadena que genera inestabilidad a la estructura de 4 ramales, pero si se evita tal desplazamiento, entonces, la unión Holliday es estática. En 1982 Nadrian Seeman en un intento por crecer cristales, generó secuencias con simetrías distintas que forman uniones Holliday inmóviles [5]. Esto originó el campo de fabricación de nanoestructuras basadas en ADN.

Sin embargo, las uniones Holliday no son lo suficientemente rígidas para soportar una nanoestructura. Por ello, se ha recurrido a la siguiente propiedad.

Entrecruzamientos

La manera en la que se construyen nanoestructuras de ADN rígidas es mediante la formación de

entrecruzamientos de cadenas. Un entrecruzamiento es la unión de dos hélices vecinas gracias al intercambio de sus cadenas. Existen 5 isómeros de entrecruzamiento, con cadenas paralelas (las dos con la misma dirección) o antiparalelas (una de 3'-->5' y la otra de 5'-->3'), y con número par o impar de medias vueltas de la hélice entre cada entrecruzamiento. De estos isómeros, el que ha demostrado mayor estabilidad es el de cadenas antiparalelas y con número par de medias vueltas entre cada entrecruzamiento. Además de rigidez, los entrecruzamientos proveen de estabilidad a la estructura puesto que su entalpía de formación es negativa y su entropía positiva [20].

Horquillas

Otro arreglo intermolecular termodinámicamente favorable son las horquillas. Estas son secuencias desapareadas presentes en una cadena doble. Estas también aumentan la entropía de la nanoestructura, y se suelen utilizar para reducir la tensión ocasionada por los entrecruzamientos [23].

Interacciones $\pi-\pi$

Finalmente, una de las fuerzas predominantes en la formación de nanoestructuras es la interacción $\pi-\pi$ entre los anillos aromáticos de las bases. Esta propiedad anteriormente descrita, provoca que las nanoestructuras se atraigan, de modo que se debe evitar la exposición de estos anillos si se desea trabajar con nanoestructuras aisladas.

El siguiente paso después de haber revisado las principales interacciones moleculares del ADN y de sus nanoestructuras, es la construcción de los ensambles.

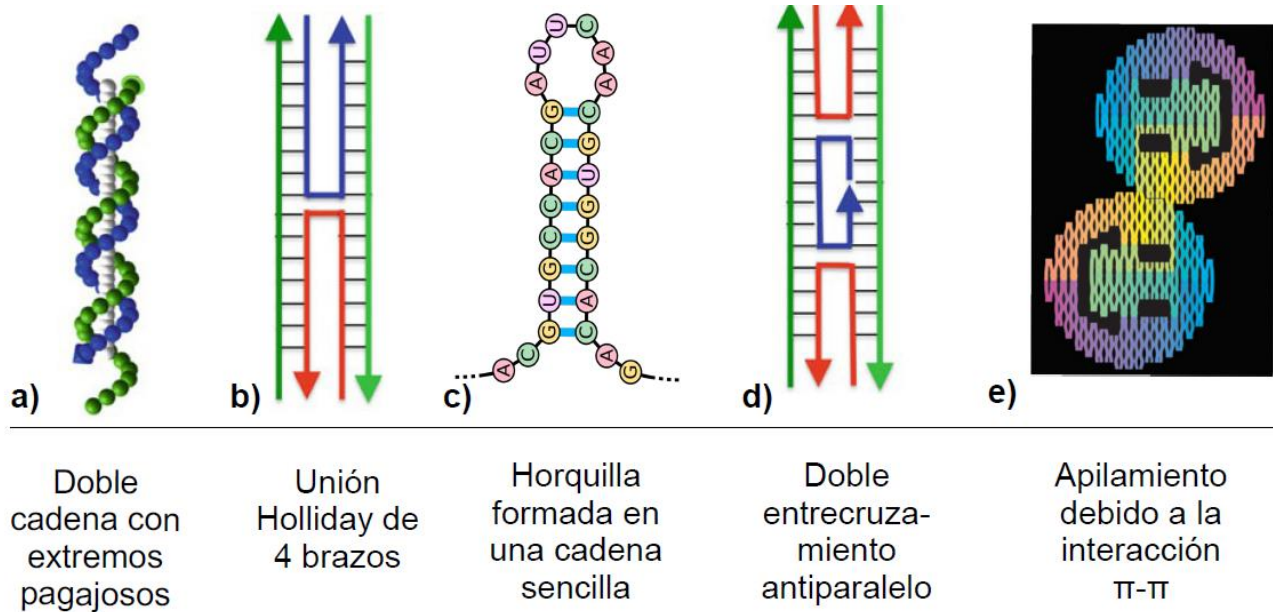


Figura 2.7. Características de las nanoestructuras de ADN. a) Secuencias de bases desapareadas llamadas extremos pegajosos. b) Unión Holliday inmóvil hecha de 4 cadenas sencillas. c) Cadena sencilla que se ensambla a sí misma y forma una horquilla de bases desapareadas. d) Doble entrecruzamiento con cadenas antiparalelas. e) Apilamiento de nanoestructuras de ADN debido a la interacción π - π de los nucleótidos.

Ensamblaje de nanoestructuras de ADN

Los ensamblajes de mosaicos forman redes de ADN. Los mosaicos son las unidades básicas que se repiten a lo largo de una red. Estos mosaicos suelen estar formados de pocos entrecruzamientos y extremos pegajosos. Estos últimos se encargan de hacer la unión entre mosaicos para formar redes. Uno de los mosaicos más sencillos es el triangular de 3 brazos (Figura 2.8 a) cuya red es bidimensional. Diversos mosaicos se han diseñado, de modo que su unión forme objetos tridimensionales, como el octaedro mostrado en la Figura 2.8 b y c [25]. Existen diversos métodos para controlar su crecimiento.

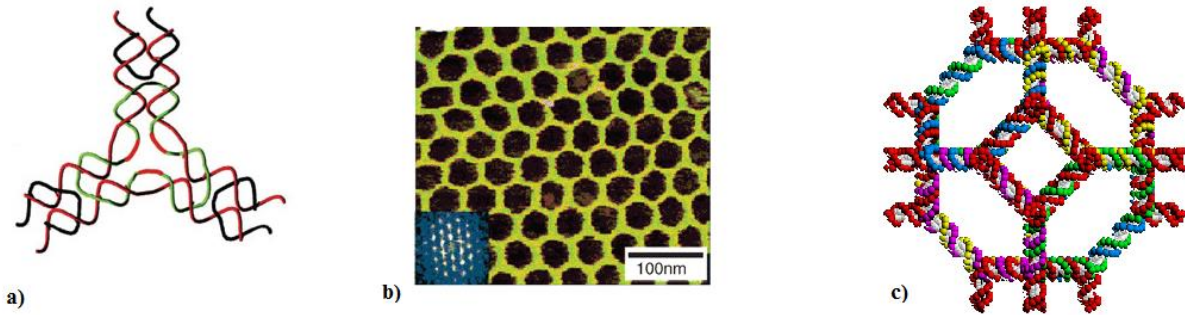


Figura 2.8. Ensamble de mosaicos para formar redes bidimensionales y objetos tridimensionales. a) Mosaico en forma de Y b) red formada a partir de los mosaicos Y c) Octaedro truncado tridimensional sintetizado por Seeman.

El ensamble de redes finitas se puede controlar mediante una metodología jerárquica. Como se revisó anteriormente, la hibridación del ADN implica rampas de temperatura. De modo que si se desea ensamblar primero los mosaicos y después las redes, la temperatura de desnaturalización del mosaico debe ser mayor que la de la red [24].

La formación de redes a partir de mosaicos es un proceso costoso y poco eficiente. Para formar mosaicos se debe recurrir a técnicas biotecnológicas, las cuales implican el uso de enzimas como las descritas en la sección de propiedades biológicas. Esta metodología ha reportado bajos porcentajes de rendimiento y elevados costos de producción. Actualmente, este camino de formación de nanoestructuras de ADN ha quedado casi obsoleto.

Ahora es posible ensamblar nanoestructuras de ADN en un solo paso y sin el uso de enzimas. En 2006, Paul Rothemund formó una “carita feliz” nanométrica doblando una cadena sencilla de ADN, llamada andamio, con 200 secuencias complementarias más pequeñas, conocidas como grapas [16]. Esta técnica fue bautizada como origami de ADN, por su similitud con el arte japonés de doblar papel.

El origami de ADN, como se muestra en la Figura 2.9, utiliza un andamio y oligonucleótidos como precursores para formar nanoestructuras en una solución iónica. Cuando Rothemund formó la carita feliz, utilizó como andamio el plásmido del virus M13mp18 (abreviado como M13), cuya longitud es de 7249 nt (nucleótidos). Los oligonucleótidos que utilizó tenían una longitud de 32 nt cada uno. Estas cadenas son complementarias a cierta sección del andamio, y se diseñaron de tal modo que

formaran a lo largo de la estructura entrecruzamientos antiparalelos con un número par de medias vueltas de hélice. La figura resultante tuvo un diámetro de 100 nm.

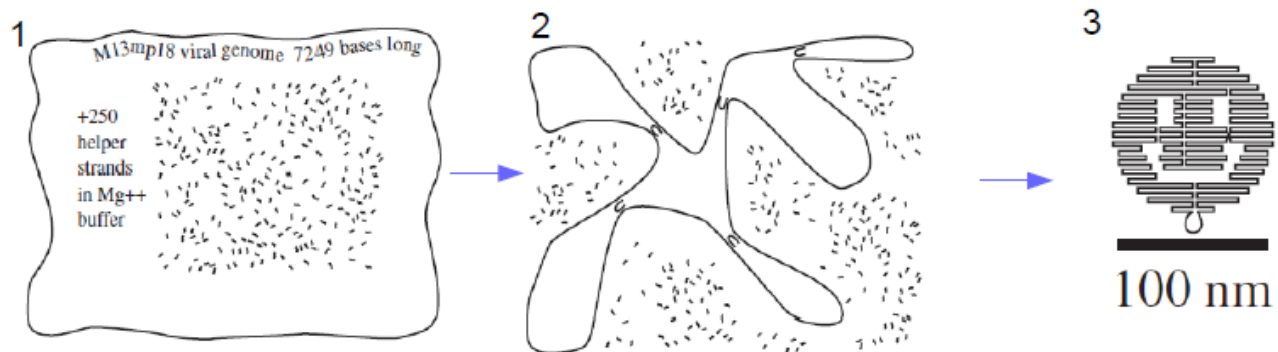


Figura 2.9. Técnica de origami de ADN. En el primer paso se tiene el andamio M13 de 7249 nt mas 200 grapas en una solución buffer con Mg^{2+} . Enseguida, esta solución se somete a una rampa de temperatura de 95 a 20 °C en 2 h, y finalmente se forma la nanoestructura, en este caso la carita feliz [13].

Las dimensiones de las nanoestructuras por origami de ADN dependen de la longitud del andamio. En teoría, cualquier cadena sencilla circular de ADN podría fungir como andamio. A lo largo de estos 10 años de desarrollo de esta técnica, se han probado andamios con diversas longitudes. En el 2014 el grupo de investigación de Thomas LaBean reportó la síntesis del origami más grande hasta la fecha, cuyas dimensiones multiplican 7 veces las de las estructuras hechas con el andamio M13 [26]. Este utilizó un andamio de un virus híbrido de M13/Lambda, cuya longitud es de 51 466 nt. Sin embargo, la tendencia contraria—la formación de nanoestructuras de ADN cada vez más pequeñas—también resulta de gran interés debido a la gran resolución que estas prometen.

El enfoque de este trabajo es adquirir control en la formación de nanoestructuras a escalas más pequeñas que las hechas por el andamio M13, es decir, menores a los 100 nm de lado. Por tal motivo, se ha desarrollado una metodología para obtener la tercera parte del andamio M13, referida aquí como miniM13 [27]. Los origamis formados a partir del andamio miniM13 serán nombrados como mini origamis.

Diseño de nanoestructuras por origami de ADN

La correcta formación de las estructuras de origami de ADN depende principalmente de su

diseño pre-programado. De acuerdo a lo planteado por Adleman y después demostrado por Seeman, las estructuras de ADN se pueden predecir si se programan cual algoritmo computacional.

En el 2009 Shawn Douglas y colaboradores crearon un software de diseño asistido por computadora (CAD) para diseñar tanto estructuras planares como tridimensionales de ADN [28]. Este software gratuito consta de un plano coordinado donde se acomodan el andamio y las grapas de tal modo que con entrecruzamientos antiparalelos y horquillas se forma la geometría deseada. Este programa tiene establecidos los dobleces permitidos en base a las reglas a continuación descritas.

CaDNAno tiene dos redes posibles de diseño, cada una destinada para estructuras con distintas propiedades. La red cuadrada establece que cada doble hélice tiene 10.67 bp/t (pares de bases por vuelta) de longitud y 4 hélices vecinas. Los entrecruzamientos para las grapas y andamio en esta red están espaciados por 32 bp y 16 bp, respectivamente. Por otro lado, en la red hexagonal las cadenas tienen una longitud de 10.50 bp/t y cada una tiene 3 vecinas. En ésta, los entrecruzamientos para las grapas están permitidos cada 21 bp, es decir, cada $2/3$ de una vuelta, puesto que a esta posición se sigue el giro natural de la hélice (Figura 2.10). Para el andamio, los entrecruzamientos pueden ocurrir cada 5 bp, o bien, cada media vuelta. Las estructuras resultantes pueden ser bidimensionales compactadas o tridimensionales, de acuerdo si se utiliza la red cuadrada o hexagonal, respectivamente.

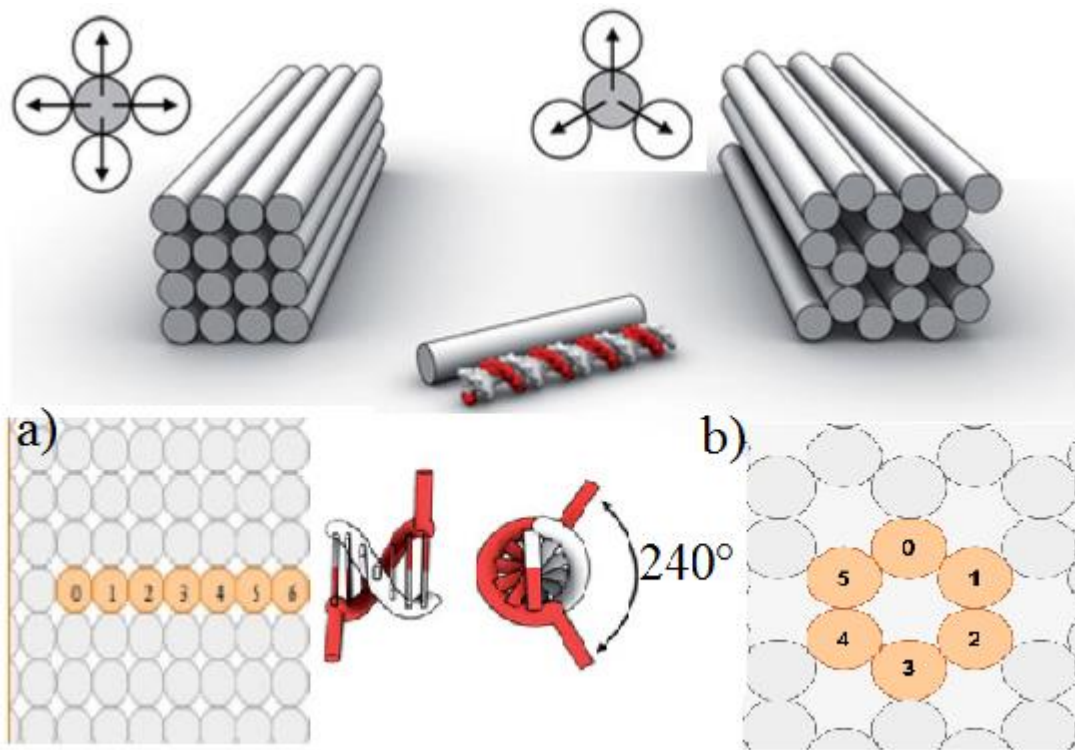


Figura 2.10. Posicionamiento de los entrecruzamientos en estructuras tridimensionales dentro del programa caDNAno. a) En la red cuadrada cada doble hélice tiene 4 vecinas; forma estructuras más condensadas. b) La red hexagonal establece tres hélices vecinas para cada una. Los entrecruzamientos se dan a los 240° de la vuelta de la hélice [adaptado de 28].

A pesar de tener reglas de diseño, a la práctica caDNAno permite modificar el espaciamiento de los entrecruzamientos, así como otras funciones. Éstas se revisarán a profundidad en el capítulo de metodología.

Como resultado de caDNAno se obtienen las secuencias de las grapas y el diseño de la estructura. En particular, las grapas se exportan en una tabla .xls y el diseño terminado se exporta como archivo .json. Enseguida se predice la formación de la estructura mediante un software simulador.

En el 2011 Carlos Castro y colaboradores desarrollaron una herramienta computacional que predice la estructura de los objetos de origami de ADN a partir de sus diseños de caDNAno; CanDo (por sus siglas en inglés *computer-aided engineering for DNA origami*) [29]. Este considera la *dsDNA* como una barra con cierta flexibilidad y obtiene una solución numérica de la forma final empleando el método del elemento finito. Algunos parámetros definidos en CanDo son: cada par de bases es una varilla elástica con longitud de 0.34 nm, 2.25 nm de diámetro, módulo de elasticidad, dobléz y torsión

de 1.100 pN, 230 pN² y 460 pN nm, respectivamente. Como resultado de la simulación, CanDo arroja la geometría tridimensional de la nanoestructura con sus valores de flexibilidad, una animación de sus fluctuaciones térmicas a 298 K y otra de su modelo atómico. En la Figura 2.11 se muestra el diseño en caDNAno y su respectiva simulación por CanDo de una persona.

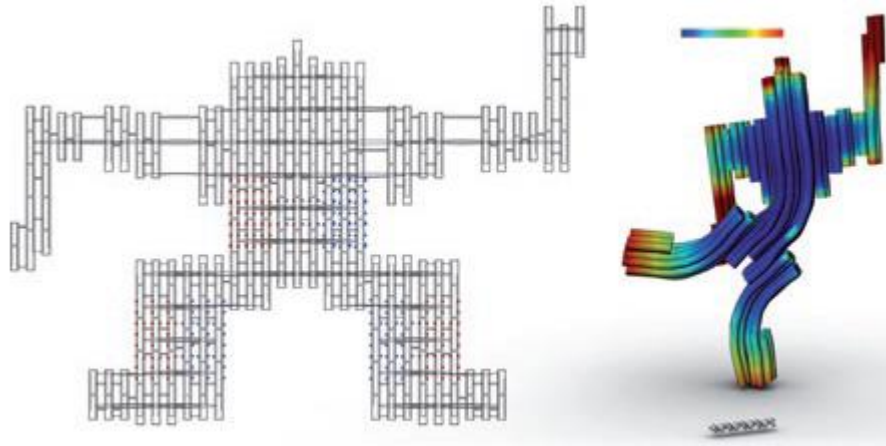


Figura 2.11. Origami de ADN de la silueta de una persona. A la izquierda se muestra el diseño por caDNAno y a la derecha su simulación por CanDo. El mapa de colores indica la flexibilidad de la estructura: los tonos rojos indican mayor flexibilidad mientras que los azules rigidez.

La etapa de diseño implica cambios del patrón dibujado en caDNAno hasta que la simulación por CanDo es la deseada. Una vez que el diseño es definitivo, el siguiente paso es la síntesis.

Síntesis: hibridación y funcionalización de estas nanoestructuras con nanopartículas de oro

Una vez que se tiene tanto el andamio como las grapas (conseguidas comercialmente), estos se mezclan en una solución *buffer* catiónica, y con un termociclador se realiza el autoensamble de la estructura. La reacción de síntesis se conoce como recocido y de acuerdo a lo reportado por Rothmund [16], consiste en elevar la temperatura de la solución hasta que no haya presencia de dsDNA y enseguida enfriar lentamente la solución, permitiendo la hibridación del andamio con las grapas (95°C a 20°C en 2 h). En este trabajo, las condiciones de reacción fueron ligeramente modificadas para conseguir porcentajes de rendimiento más altos.

Se abre aquí un paréntesis para justificar el uso del oro como material para funcionalizar. El oro coloidal ha sido ampliamente estudiado desde que en 1618 el alquimista Francisci Antonii escribió el primer libro sobre sus propiedades [20]. En el presente trabajo se escogió oro sobre los demás materiales debido a su alta conductividad térmica y su capacidad de absorción luz visible. Propiedades potenciales para ser aprovechadas para el desarrollo de superlentes, nanocircuitos, sensores, entre otras aplicaciones [26].

El siguiente paso es funcionalizar los origamis de acuerdo a la aplicación deseada. En 1996, 10 años antes de la creación del origami de ADN, Alivisatos y colaboradores publicaron una metodología para controlar la posición de nanopartículas de oro (AuNPs) mediante enlaces tioles con el ADN [22]. Usando este principio, investigadores del área han enlazado AuNPs a la superficie del origami para ser utilizado en aplicaciones de nanoelectrónica y plasmónica.

En el 2011 Pilo-Pais y colaboradores reportaron la funcionalización de un origami rectangular (con dimensiones de 90 nm x 70 nm) con nanopartículas de oro de 5 nm. En este trabajo (Figura 2.12) se enlazaron AuNPs en la periferia del rectángulo, en forma de “H”, en dos aristas y en los cuatro vértices del rectángulo. El espaciamiento entre cada nanopartícula fue aproximadamente de 30 nm de centro a centro [15]. De manera similar en el 2015 Tim Liedl y colaboradores lograron la funcionalización de un origami en forma de anillo con nanopartículas de 10 nm, 20 nm, 30 nm y 40 nm (Figura 2.13). Ellos dejaron un espacio de 15 nm de centro a centro [31]. Ambos trabajos estaban orientados hacia las aplicaciones en la nanoelectrónica y en la nanofotónica.

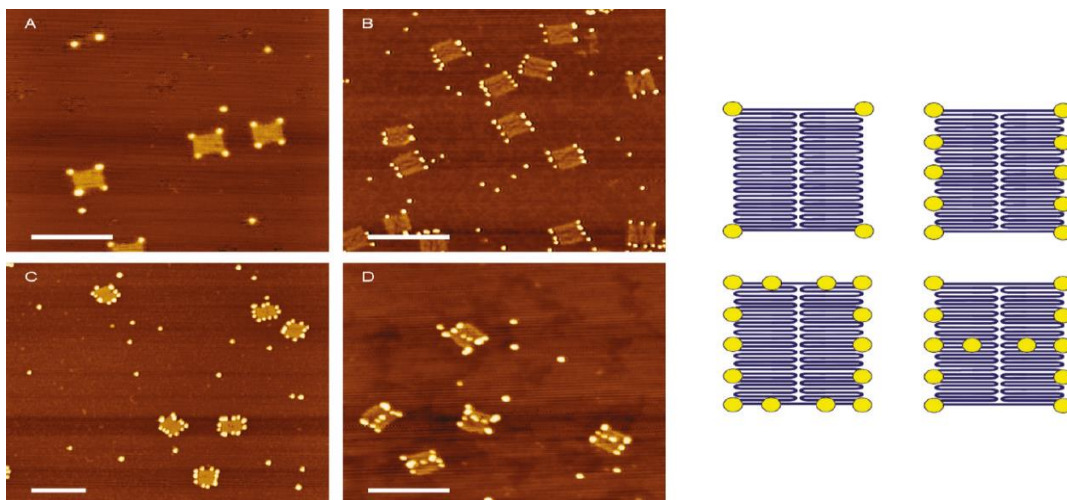


Figura 2.12. Origami de ADN rectangular funcionalizado con nanopartículas de oro de 5 nm. Se muestran los diferentes

patrones realizados: cuatro vértices, dos aristas, periferia y en forma de “H”.

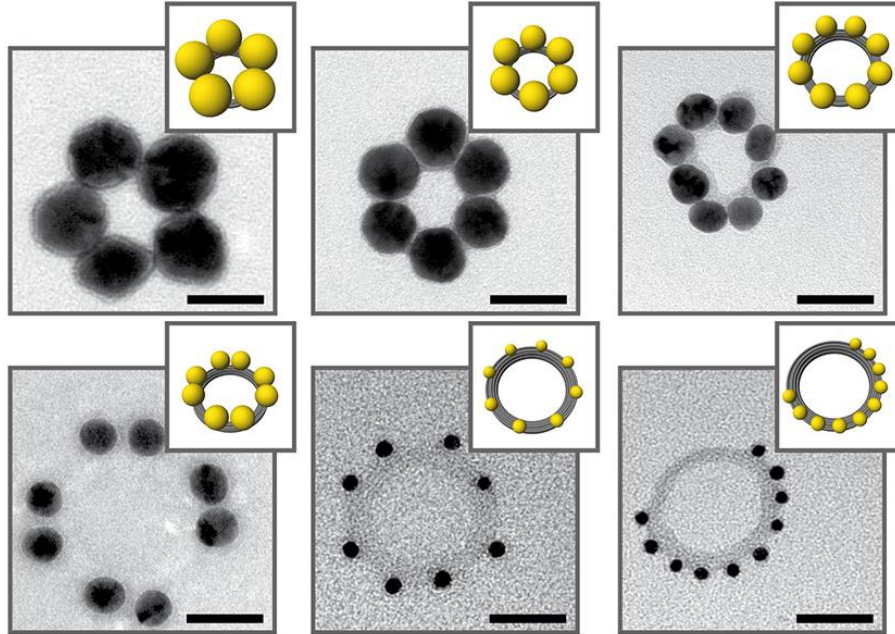


Figura 2.13. Micrografías de microscopía electrónica de transmisión de un origami de ADN en forma de anillo funcionalizado con nanopartículas de oro de 40 nm, 30 nm, 20 nm y 10 nm.

El espaciamiento entre las nanopartículas determina la resolución del patrón. Mientras más cerca esté una nanopartícula de otra, más nanopartículas se podrán enlazar. Por lo tanto, si se desea formar un circuito cerrado de nanopartículas, éstas se deberán enlazar de manera contigua, sin dejar espacio de extremo a extremo. Este trabajo propone la funcionalización de origamis con nanopartículas de oro de 5 nm de diámetro, dejando un espacio menor a los 15 nm de centro a centro.

Ese patrón está diseñado para formar un dispositivo con propiedades ópticas y eléctricas similares a las de un *Split ring resonator*. Un Split ring resonator es un material sintético que consta de dos varillas metálicas con un gap en sus extremos, y se comporta como un circuito de dos resistencias conectadas en serie con un inductor. Este circuito tiene la capacidad de almacenar energía a partir de la irradiación de luz [19].

Planteamiento del problema

El estado del arte del origami de ADN se encuentra en la fabricación de nanoestructuras cada vez más pequeñas con el objetivo de obtener mayor control de su crecimiento. Adicionalmente, la fabricación de dispositivos nanoelectrónicos y nano-ópticos se puede realizar mediante la funcionalización de origami con AuNPs. Estos dos aspectos se cubren en este estudio tras el autoensamble del origami de ADN con AuNPs espaciadas por aproximadamente 15 nm de centro a centro—máxima precisión reportada.

Hipótesis

Se puede construir una nanoestructura de ADN con nanopartículas de oro para formar un *split-ring resonator*

Objetivos

Objetivo general

Formar un arreglo de 12 nanopartículas de oro—con mayor precisión que la reportada—sobre una nanoestructura de ADN.

Objetivos particulares

1. Enlazar 12 nanopartículas de oro de 5 nm de diámetro con separación aproximada de 15 nm de centro a centro sobre una nanoestructura rectangular (70 nm × 90 nm) de ADN mediante grupos tioles y cadenas homonucleotídicas de adenina.
2. Programar la formación de una nanoestructura rectangular de ADN mediante su diseño con el software caDNAno y enseguida verificar su estabilidad térmica con el software CanDo.
3. Empleando la técnica de origami de ADN, sintetizar una nanoestructura de ADN con geometría rectangular de 90 nm × 70 nm.
4. Corroborar la formación de las nanoestructuras por microscopía de fuerza atómica y electroforesis.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

Para cumplir con la metodología se siguió el algoritmo de la Figura 3.1. Se utilizaron como materiales precursores para conseguir los objetivos ya descritos: grapas, un andamio y nanopartículas de oro. Inicialmente se definió la estructura de ADN y patrón de AuNPs deseado, señalado como la variable “x”. Enseguida se diseñó la nanoestructura en el programa caDNAno, y después se obtuvo la simulación de su estabilidad por CanDo. Una vez que se logró la forma deseada y se adquirieron las grapas, se realizó el recocido de éstas con el andamio, formando así la nanoestructura. La formación del origami se confirmó por electroforesis y por microscopía de fuerza atómica (AFM descrito en anexos). Finalmente se funcionalizó dicha nanoestructura con AuNPs y se visualizó por AFM. Si la estructura resultante AuNP-ADN (definida como “y”) no fue la deseada, entonces se realizaban cambios en la metodología. En este algoritmo los pasos a seguir puede ir en cualquier sentido, de este modo se obtiene retroalimentación donde se requiera un cambio, con el fin de optimizar la nanoestructura. A continuación se describen detalladamente los pasos de cada una de las operaciones.

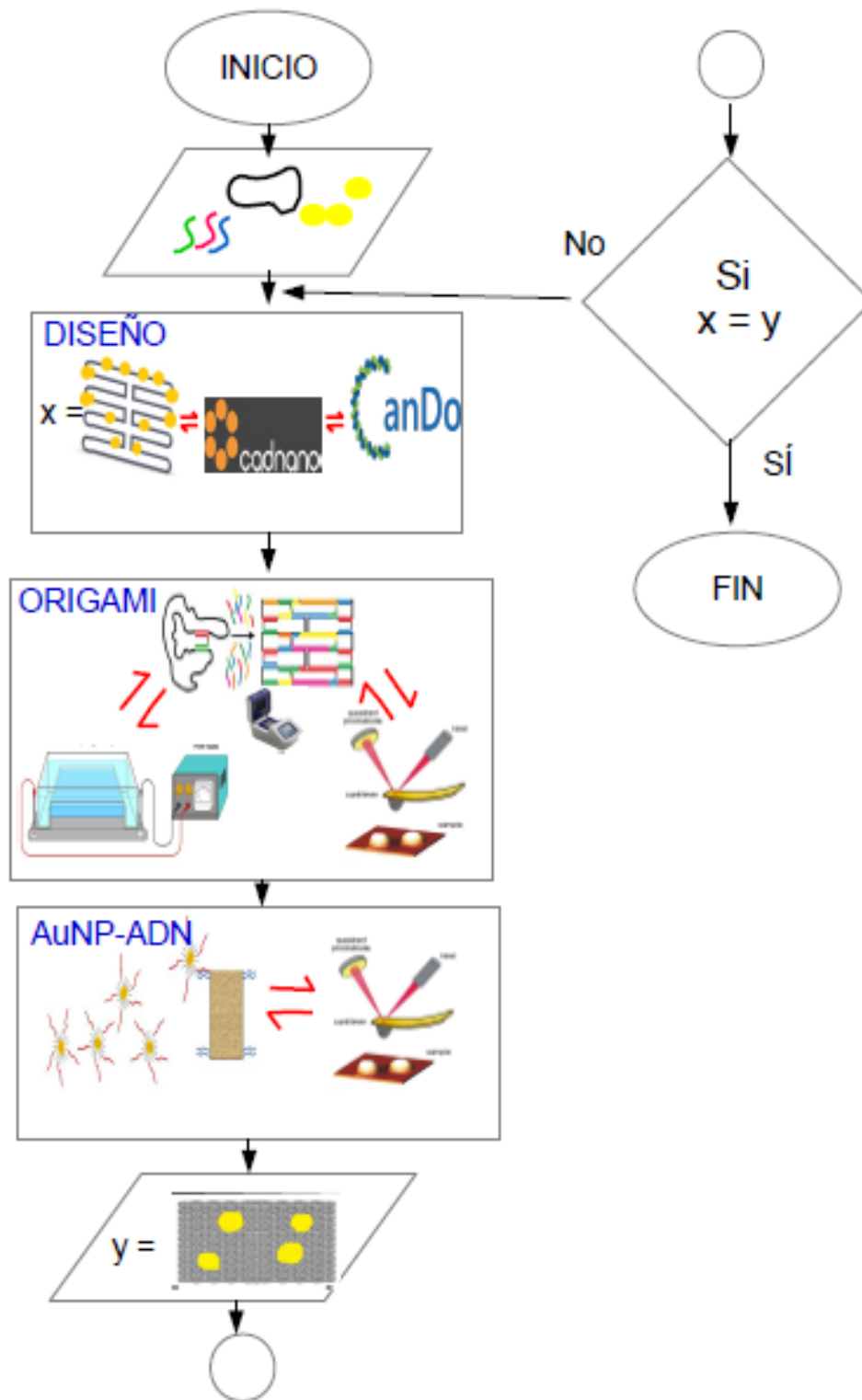


Figura 3.1. Diagrama de flujo de la nanoestructura de ADN funcionalizada con AuNPs. Las variables de entrada son las grapas, el andamio y AuNPs. La primera operación es la de diseño, seguida del recocido y por último la funcionalización, de la cual se obtienen de salida micrográficas de AFM del origami funcionalizado. Dentro de cada operación se tienen pasos anidados.

Diseño por caDNAno y simulación por CanDo

En este trabajo se detalla el diseño de un rectángulo de $70 \text{ nm} \times 90 \text{ nm}$ utilizando las 7249 bases del andamio M13mp18, reportado por Pilo-Pais y colaboradores en 2011 [16]. Antes de diseñar en un software como caDNAno, se realizó el boceto del rectángulo. (Figura 3.2). Para ello, se escogió la técnica conocida como “llenado paralelo y antiparalelo” (*raster fill pattern*) con la finalidad de crear una red cerrada con simetría tipo espejo. En ésta se muestran los entrecruzamientos esperados del andamio y se cuida que éste tenga la longitud exacta de 7249 nt lo que equivale a $2.4 \mu\text{m}$ de largo. Además, se propone el posicionamiento deseado de las nanopartículas de acuerdo a la aplicación deseada que den lugar a un par de semicírculos con diferentes diámetros.

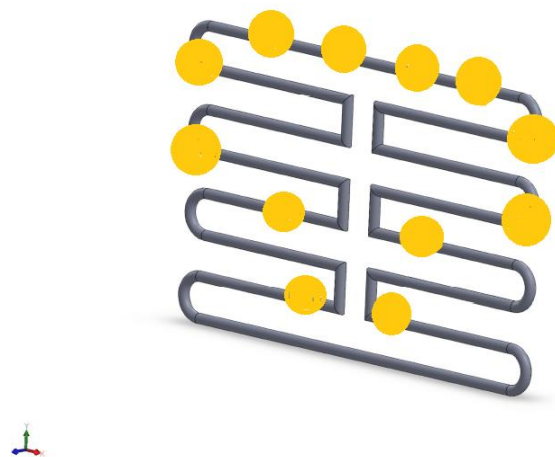


Figura 3.2. Esbozo de la nanoestructura rectangular de ADN funcionalizada con AuNPs.

Rectángulo de $90 \text{ nm} \times 70 \text{ nm}$

El siguiente paso consistió en pasar del esbozo a caDNAno. Para ello se eligió la red cuadrada de trabajo (de los dos posibles, ver “Antecedentes”), puesto que ésta permite la formación de figuras planas, al ofrecer una mayor densidad de entrecruzamientos. En esta red se seleccionaron 32 hélices paralelas para el andamio. Estas se extendieron 224 nt cada una, y se formó una horquilla de 73 nt para liberar tensión aumentando la entropía de la figura, y completar los 7249 nt. Se posicionaron los entrecruzamientos del andamio en forma de “costura” que pasa justo por la mitad de la figura. Después se utilizó la función “auto staple” para posicionar las grapas con el andamio y se le dio una longitud promedio de 32 bases por grapa, manteniéndose dentro de los límites de 10 a 50 bases. Se posicionaron los entrecruzamientos de las grapas de acuerdo las reglas establecidas en

“Antecedentes”.

Adicionalmente, se utilizaron otras herramientas de caDNAno para lograr la estructura deseada. Para impedir la curvatura en la superficie plana de la nanoestructura, pares de bases se dejaron sin aparear. CaDNAno simboliza estos “nicks” con una “X” roja. Enseguida, con la intención de evitar el apilamiento de las nanoestructuras en solución, debido a la interacción π - π , se elongaron algunas grapas de la periferia con secuencias de 5 adeninas. Finalmente, caDNAno genera un archivo con extensión JSON del diseño que a su vez se utiliza en CanDo para llevar un cabo un estudio de estabilidad termodinámica a partir de la aplicación de esfuerzos cortantes y de giro en la nanoestructura

En el sitio de red de CanDo (<http://cando-dna-origami.org>), se cargó el archivo tipo JSON del diseño de caDNAno. Inicialmente se selecciona la red cuadrada y el modelo de fluctuaciones térmicas en CanDo. Este fue un proceso de retroalimentación entre caDNAno y CanDo con el propósito de optimizar el diseño de la nanoestructura deseada. Finalmente se llegó a los diseños reportados en los resultados.

Preparación de grapas y andamio

Una vez terminado el diseño, se introdujo la secuencia del andamio en el programa con la función *scaffold sequence* y se exportó en un archivo Excel conteniendo las secuencias específicas de todas las grapas.

Se localizaron las grapas en las que se esperaba enlazar las nanopartículas, y dentro del archivo EXCEL se les agregó una secuencia de 24 adeninas (A_{24}) en la dirección $5' \rightarrow 3'$ (secuencia de extensión). Por lo tanto, se estableció que la secuencia complementaria (secuencia de captura) sería de 24 timinas (T_{24}) en las dos direcciones. Además, se utilizaron secuencias de 5 timinas (T_5) para enlazarse a las AuNPs con la finalidad de inhibir su aglomeración. Estas T_{24} y T_5 se enlazarían a las AuNPs por medio de grupos tioles. Se tuvo precaución de que la longitud total de cada grapa no excediera las 60 bases. La selección de las grapas para su extensión se describe enseguida.

Con el propósito de obtener el patrón de la Figura 3.2, se buscaron las grapas cuyos extremos coincidieron con la posición de las nanopartículas. Se extendieron 2 grapas para cada sitio de enlace en la periferia y 3 grapas para aquellas posicionadas en el interior del rectángulo (Figura 3.3). Dicha extensión se capturó manualmente en la lista de grapas exportada de por caDNAno.

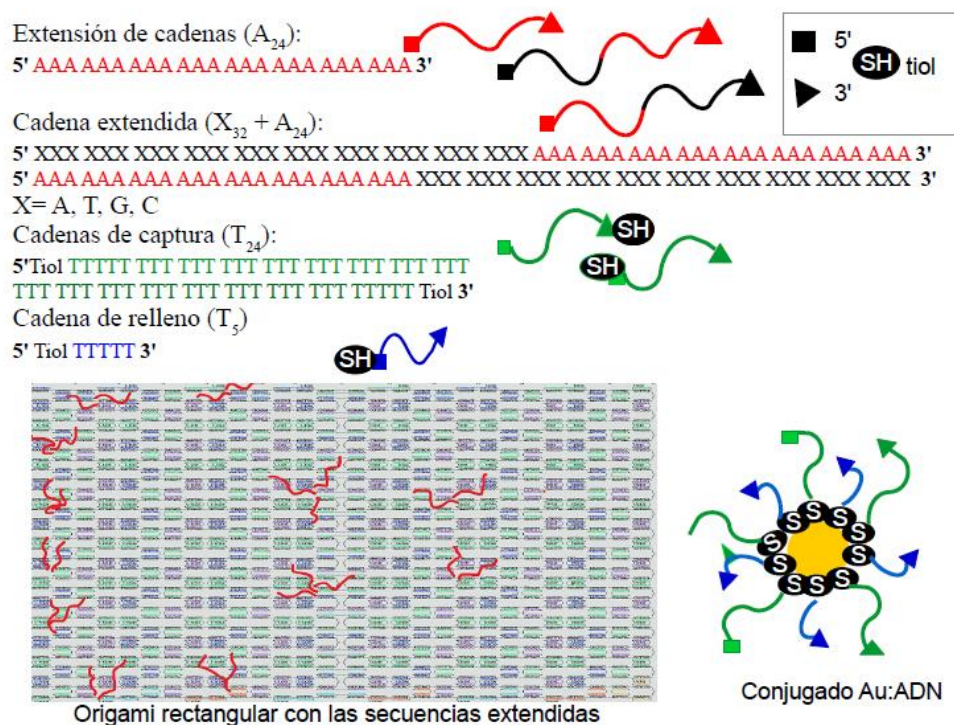


Figura 3.3. Diagrama del origami rectangular con las grapas extendidas. Se muestran las cadenas X_{32} (donde X es cualquier nucleótido) extendidas con A_{24} , las de relleno T_5 , las cadenas de captura T_{24} y el ensamblaje de estas con la AuNP mediante enlaces con tioles. El triángulo y el círculo representan los extremos 3' y 5' de las cadenas, respectivamente.

El andamio y los oligonucleótidos para el origami rectangular se adquirieron comercialmente. Las grapas complementarias al andamio (X_{32}), las extendidas ($X_{32} + A_{24}$), las de saturación (T_5) y las de captura (T_{24}), se compraron en *Integrated DNA Technologies* (IDT). Se ordenaron 25 nmoles de las secuencias normales y de las extendidas, y 1 μ moles de las T_{24} . La cadena sencilla del andamio M13mp18 fue adquirida de New England BioLabs.

Una vez en el laboratorio, cada una de las grapas se diluyó en agua DDI (destilada y desionizada) y se llevó a una concentración de 100 nM y 200 nM para las X- A_{24} y T_{24} , respectivamente. Para ello, se utilizó el espectrofotómetro UV-Vis Nanodrop. La concentración se determinó por medio de la ley de Lambert-Beer, puesto que ésta relaciona la absorbancia A de una muestra con su concentración c , la distancia de trayectoria óptica l , y su coeficiente de extinción molar ϵ : $A = \epsilon lc$. Los valores de ϵ son característicos para cada secuencia y son proporcionados por IDT y el valor de l está determinado por el equipo Nanodrop. Sin embargo, se puede determinar ϵ de cualquier secuencia usando el programa *Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator*

(<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html#helpOD>). Las soluciones de cadenas sencillas de ADN se almacenaron siempre a 253 K.

Recocido de la nanoestructura, electroforesis en gel de agarosa y purificación.

Para eliminar el excedente de las grapas en la solución de los origamis, se hicieron lavados con la solución amortiguadora $1\times$ TAE Mg^{2+} . Se hicieron cuatro lavados por cada muestra usando tubos con filtros de 100 kDa. Los 100 μ l de la muestra se mezclaron con 300 μ l de la solución amortiguadora y se centrifugaron en el equipo Techne 2000 a 2400 g por 2 min en cada lavado.

La primera prueba para determinar la formación de las nanoestructuras fue electroforesis de gel de agarosa, utilizando el equipo Mini-Sub $\text{\textcircled{R}}$ Cell GT Systems de BIO-RAD (Figura 3.4). Se preparó un gel con agarosa *Agarose A de Bio Basic INC* al 1% en una solución amortiguadora $10\times$ TAE Mg^{2+} , utilizando un horno de microondas para disolver la agarosa en la solución amortiguadora. A esta se le agregó 2 ml del colorante GelRed para hacer visible la doble cadena de ADN bajo luz UV. Las muestras se corrieron bajo un potencial de 100 V por 60 minutos. Las muestras se corrieron a la par con un marcador de peso molecular de ADN llamado “escalera”.

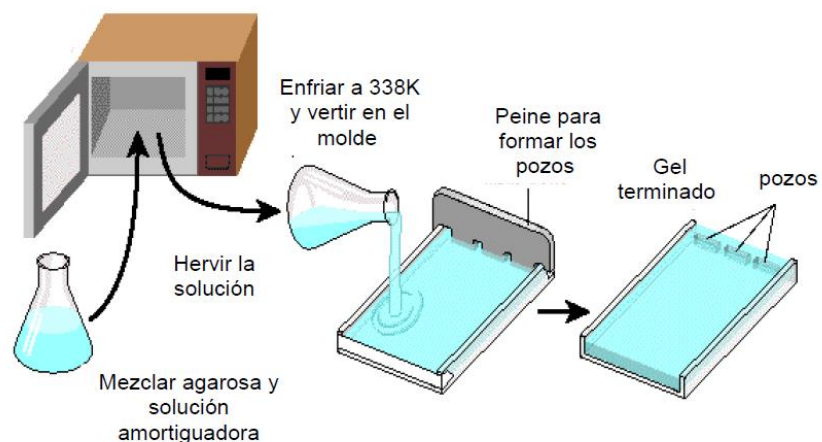


Figura 3.4. Pasos para la preparación de un gel de agarosa para hacer electroforesis del origami purificado del exceso de grapas.

Después de haber verificado por electroforesis la formación de las nanoestructuras, éstas se visualizaron por microscopia de fuerza atómica usando los equipos Cypher y Nanoscope y después de haber obtenido a las estructuras con la forma y dimensiones idóneas, de acuerdo a las imágenes obtenidas, se prosiguió con su funcionalización.

Funcionalización con AuNPs y *freeze and squeeze*

La formación de los patrones de nanopartículas de oro sobre el rectángulo de ADN consistió en la formación de los conjugados AuNP:ADN, seguida del autoensamble de estos conjugados con el origami con grapas extendidas.

Para formar los conjugados Au:ADN se prepararon simultáneamente la solución de AuNPs y las grapas T₂₄ y T₅ tioladas. Se utilizaron dos grapas T₂₄ tioladas: una con el grupo tiol en el extremo 3' y la otra en el extremo 5', así como la cadena T₅. El enlace entre el ADN y las AuNPs se da mediante un azufre, por lo que fue necesario desprotonar el grupo tiol para formar el conjugado. Se realizaron los siguientes pasos para cada una de las grapas (las T₂₄ y T₅). La remoción del hidrógeno se hizo con un gel reductor de azufre llamado TCEP (por sus siglas en inglés *Immobilized TCEP Disulfide Reducing Gel*) y la solución amortiguadora 10×TE en una relación de 5 µl de TCEP y 1.66 µl de 10×TE para 15 µl de ADN 100 µM. Todos estos se mezclaron en un tubo de 200 µl en un plano rotatorio (360°) por 24 h. Después de este tiempo, se centrifugó la solución a 2400 g por 30 segundos y se extrajo el sobrenadante, que contenía las grapas desprotonadas. Finalmente las 3 soluciones (una de cada secuencia) se almacenaron a 277 K.

La preparación de las AuNPs (de la compañía Ted Pella Inc) consistió en la remoción del grupo citrato de la superficie de las nanopartículas, puesto que este limita su reactividad. Para ello se mezclaron 10 ml de la solución de AuNPs con una concentración de 5×10^{13} nanopartículas/ml con 3 mg de *Bis (p-sulfonatophenyl) phenylphosphine dihydrate dipotassium salt* (BSPP) al 97%, de la compañía *Sigma-Aldrich* en un tubo y se dejó la solución en agitación por 12 h. Enseguida, se agregaron de 130 mg a 260 mg de NaCl a la solución de AuNP+BSPP, ésta se mezcló en un Vortex hasta disolver toda la sal. Esta solución de AuNPs+NaCl+BSPP se pasó a un tubo de 2 ml. La solución cambió su color de rojo a marrón y se centrifugó por 30 min a 1260 g y temperatura ambiente. Después se desechó el sobrenadante y se mezcló el precipitado (que correspondían a las AuNPs) con 200 µl de una solución de 3mg de BSPP en 10 ml. Esta solución se centrifugó a 1200 g durante 30 min a temperatura ambiente. Se extrajo el precipitado y se diluyó en 50 µl de la solución BSPP. Estas nanopartículas se encontraban finalmente sin el citrato en la superficie.

Finalmente se procedió a hacer el autoensamble del conjugado AuNP-ADN (Figura 3.5). Las

proporciones utilizadas fueron de 5 cadenas T_{24} con el azufre en 5', 5 cadenas T_{24} con el azufre en 3', y 60 cadenas T_5 por cada nanopartícula. En un tubo se mezclaron las tres soluciones de ADN y la última solución de AuNPs por 10 segundos en un Vortex. Posteriormente se dejaron en agitación a 120 rpm por 48 h en un agitador orbital TekTrator[®] V. La solución resultante contenía los conjugados de AuNP-ADN y el exceso de grasas que no se enlazaron al oro.

La separación de los conjugados de AuNP-ADN de las grasas excedentes, se realizó por electroforesis siguiendo un proceso llamado *freeze and squeeze*. En este se siguió el procedimiento de electroforesis descrito anteriormente en la visualización del origami, pero con algunas modificaciones: se utilizó la agarosa al 3%, no se utilizó EtBr, se agregó glicerol al 50%, y se corrió el gel por 15 min a 100 V. Enseguida se identificó la marca del conjugado por la tonalidad roja (característica de las AuNPs de 5 nm de diámetro), ésta se extrajo con una navaja, se trituró y se pasó a un filtro del kit de purificación *Freeze 'N Squeeze™* de BIO-RAD. Este filtro se introdujo a un tubo del mismo kit y se dejó a 253 K por 5 minutos. Después, este tubo se centrifugó a 6200 g durante 2 minutos, se agregaron 20 μ l de $1\times$ TAE y se volvió a centrifugar de igual manera. Se pasó la solución extraída a un tubo de 2 ml y se midió la concentración de los conjugados por espectroscopía UV-Vis usando el equipo Nanodrop. Esta solución se almacenó a 277 K.

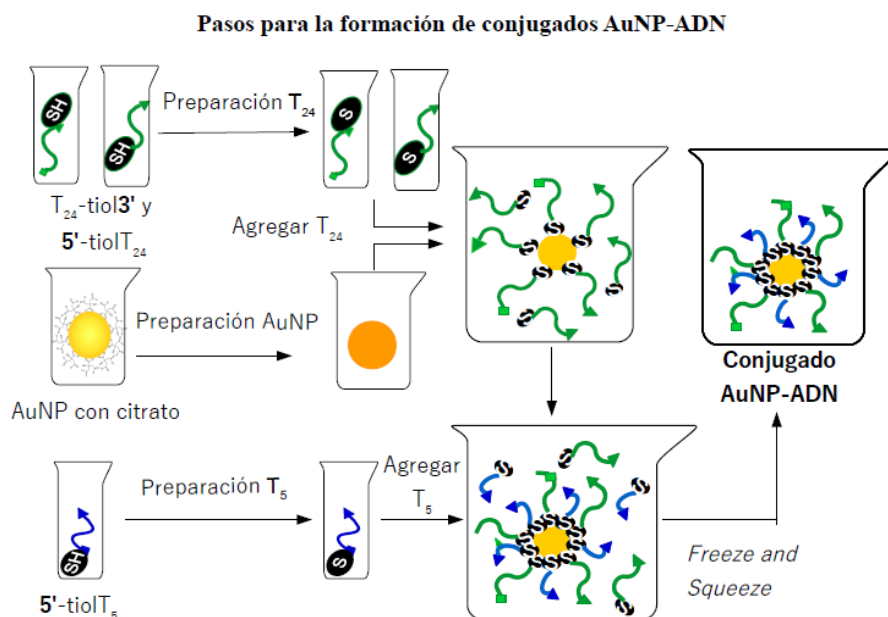


Figura 3.5. Diagrama de flujo para la formación de conjugados AuNP-ADN. Inicialmente se prepara la solución de AuNPs, las dos de T_{24} , y la de T_5 . Después se forma el autoensamble, añadiendo primero las T_{24} , luego las T_5 y finalmente se elimina el exceso de grasas por *freeze and squeeze*.

En este punto se tenía la solución de los conjugados AuNP-ADN y la de los origamis rectangulares. Su autoensamble se realizó justo antes de visualizarlos por AFM.

Visualización por microscopía de fuerza atómica

Para definir las condiciones óptimas del autoensamble, se corrieron tres experimentos de funcionalización. El primero, referido aquí como funcionalización en solución, consistió en agitar la solución del origami con los conjugados a una razón molar de 5:1 AuNP-Origami por 12 h. Pasado ese tiempo, se incubó la mezcla a 309 K durante 20 min y se visualizó en el AFM. En el segundo experimento el origami se ancló a una superficie de mica y enseguida se añadieron los conjugados. Esta técnica se conoce como funcionalización en superficie y fue reportada por Pilo-Pais en el 2011 [15]. El último experimento consistió en la incubación de las dos soluciones con la proteína C8-B^{Ss07d} [32] (que neutraliza las cargas negativas en el ADN y en los conjugados AuNPs:ADN), seguida de la funcionalización en solución. Cada una de las muestras se visualizó a una concentración 1 nM, en una solución amortiguadora 1x TAEMg²⁺, con agua DDI, puntas *Bruker SNL 10*, y en modo *tapping* usando una celda de fluido.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron resultados de cada operación descrita anteriormente; es decir, del diseño de caDNAo y su simulación por CanDo, del estudio por electroforesis de la formación del origami y de la visualización del autoensamble origami-AuNPs por AFM. Estos se presentan y discuten a continuación.

Diseño en CaDNAno y simulación de su estabilidad por CanDo

El diseño básico del rectángulo de ADN empleado fue tomado a partir del diseño se tomó a partir del publicado por Rothmund [16]. Esta nanoestructura básica fue estudiada en caDNAno para identificar las grapas que podrían extenderse con la secuencia A₂₄. En la Figura 4.1 se muestra el diseño así como la simulación de su estabilidad termodinámica de acuerdo a los resultados de CanDo,

El diseño de la Figura 4.1 en caDNAno se basó en el andamio del fago M13mp18 que consiste en 7249 nt, con entrecruzamientos antiparalelos localizados a la mitad del rectángulo y con una

horquilla hecha con 73 nt en uno de los lados. Esta cadena sencilla circular se dobló por medio de 253 grapas de 32 nt cada una, cuyos entrecruzamientos ocurrieron cada 16 pares de bases. En total se tuvieron 32 dobles hélices paralelas, que sumadas darían una longitud total de aproximadamente 65 nm (de arriba abajo Figura 4.1); si se visualizan como varillas, cada una de éstas tendría una longitud de aproximadamente 75 nm (de izquierda a derecha Figura 4.1), de acuerdo a los valores de la Tabla I (ver antecedentes).

El archivo en *.json del diseño del rectángulo generado en caDNAno se cargó al programa CanDo. La Figura 4.1 despliega el resultado del estudio de la estabilidad del rectángulo creado en caDNAno en un diagrama de mapa de calor, el cual indica las fluctuaciones térmicas; o bien, flexibilidad de la nanoestructura. Se observa que las fluctuaciones solo son alrededor de 2.7 nm en dos esquinas opuestas y en la mayor parte del área es menor a 2 nm. Esto es una señal de la escasa curvatura de la nanoestructura cuando se somete a esfuerzos axiales, torsionales y de flexión; por lo tanto, la superficie del rectángulo diseñada en caDNAno es llana. Estos valores dieron pauta al uso de este rectángulo como superficie plana.

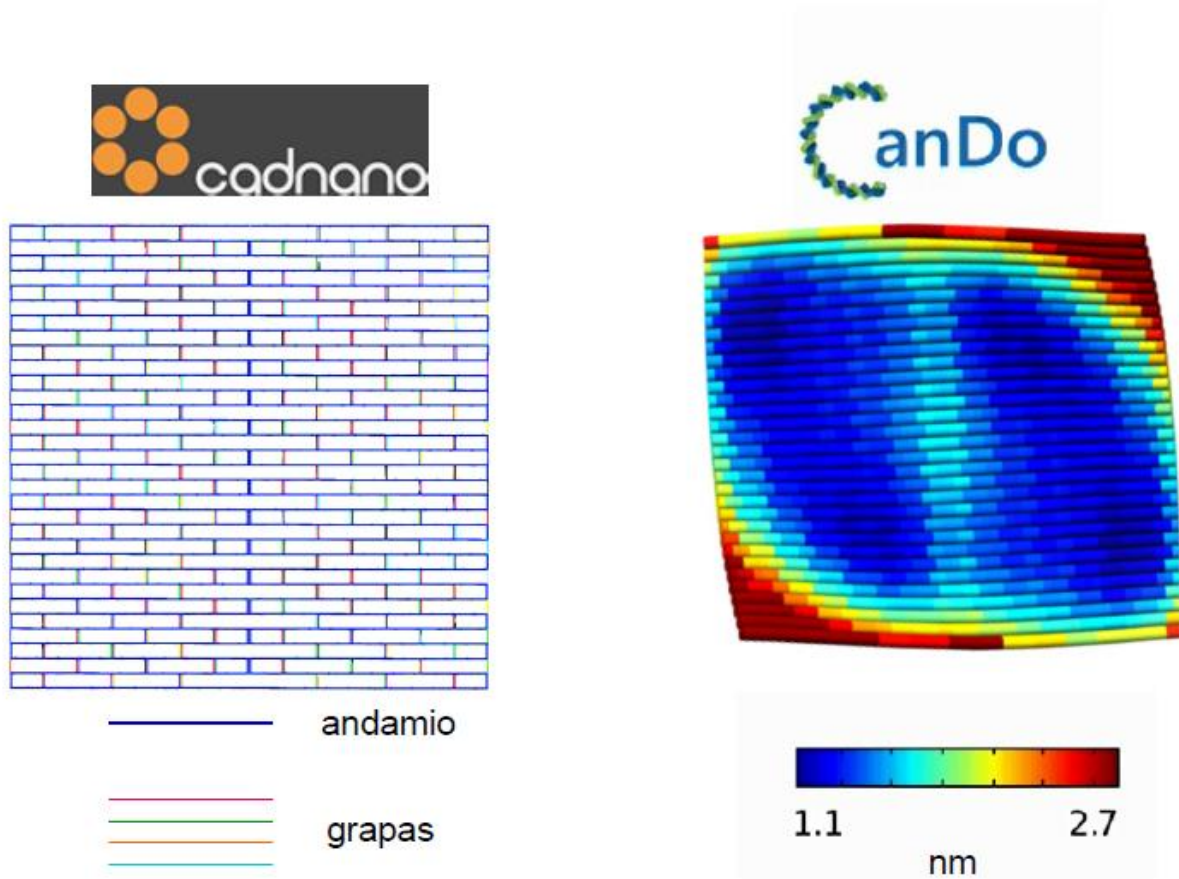


Figura 4.1. Diseño del origami rectangular en caDNAo y la simulación de sus fluctuaciones térmicas calculadas por CanDo. A la izquierda se representa la cadena del andamio con una línea de color azul y las grapas con líneas de colores. A la derecha se encuentra un mapa de calor que representa las fluctuaciones térmicas en nanómetros.

Estudio por electroforesis de la formación del rectángulo

La primera caracterización constó en probar la formación de la nanoestructura de forma rectangular de origami de ADN por la técnica de electroforesis en gel de agarosa. El campo eléctrico **E** en este gel permitió el desplazamiento de las cadenas de ADN, debido a que estas poseen una carga negativa. La velocidad de migración del ADN es inversamente proporcional a su peso molecular, que a su vez se ve influenciado por el número de bases que lo conformen y por la naturaleza de la cadena; es decir, si es cadena sencilla, doble o una nanoestructura. Por lo tanto, las cadenas sencillas se desplazan más rápido que las dobles, y de este modo se puede identificar la formación del origami.

En el gel de la Figura 4.2 se analizaron 4 muestras: en el 1er pozo se encontraban 5 μ l de una solución de marcadores de peso molecular de ADN, conocida como “escalera de ADN”; en el 2do pozo se pipetearon 10 μ l a una concentración de 50 nM de las grapas del rectángulo; en el 3ro 10 μ l 5 nM del andamio; y en el 4to, 10 μ l a 5 nM de una solución de origami de ADN purificado del exceso de grapas.

Las 11 bandas de la escalera sirven de referencia para conocer el peso molecular aproximado de las demás muestras. La primera banda (de arriba a abajo) corresponde a una doble cadena de 1500 pares de bases, mientras que la última de abajo a 100 pares de bases. Se puede notar que la banda de las grapas (pozo 2) migró más lejos que la banda de 100 pares de bases, lo cual concuerda con lo esperado puesto que cada una de estas grapas tiene una longitud promedio de 32 nt. Como se esperaba en el tercer pozo, el andamio M13 (de cadena sencilla circular) apareció sobre la banda de 1500 pares de bases, puesto que éste tiene una longitud de 7249 nt. Esta misma banda se presentó en la muestra del origami purificado, lo que sugiere que se encontraban andamios sin aparear. En esta muestra además se presentó una señal sobre la del M13, que correspondió a la nanoestructura, puesto que la nanoestructura está conformada de dobles cadenas de ADN; o bien, de 7176 pares de bases. Finalmente, se encontró una señal tenue entre la del origami y del andamio. Se dedujo que esta señal correspondió a nanoestructuras parcialmente formadas.

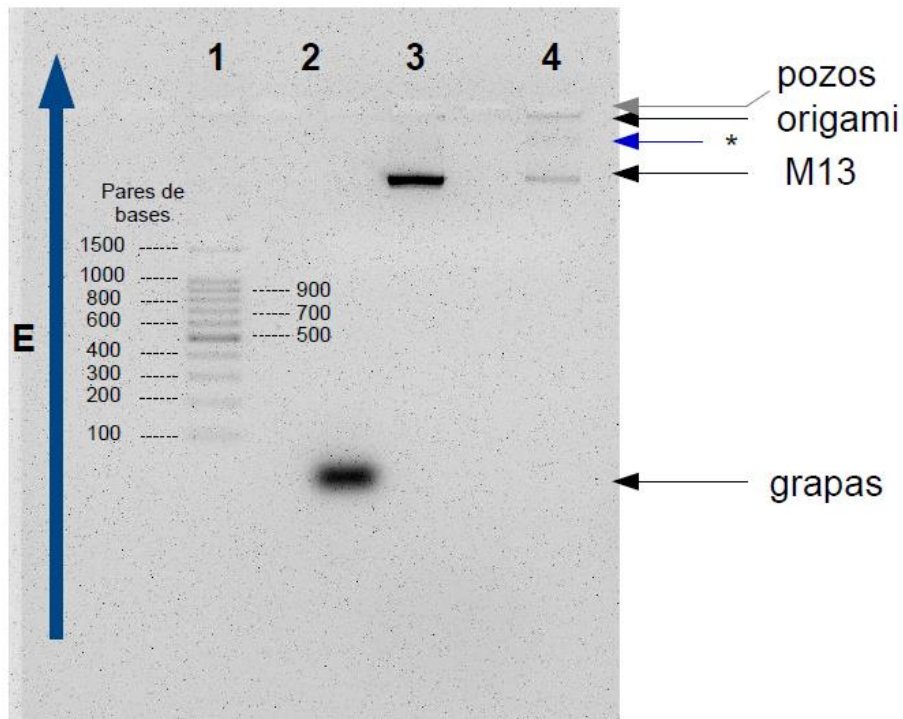


Figura 4.2. Imagen del gel de agarosa al 1.7 % iluminado con luz UV de la solución del origami rectangular purificado. En el pozo 1 se encuentra un marcador de peso molecular, en el 2 la solución de grapas, en el 3 el andamio M13 y en el 4 el origami.

Micrografías por AFM del rectángulo sin nanopartículas de oro

Una vez mostrada la formación de la nanoestructura por electroforesis, se prosiguió con la visualización por microscopía de fuerza atómica en modo intermitente (*tapping*) usando una celda de fluido. Para ello se preparó la muestra a una concentración de 0.5 nM sobre un sustrato de mica recién escindida (después de haber removido la capa superficial). La micrografía de AFM mostrada en la Figura 4.3 señala que el autoensamble de la nanoestructura a una concentración de 0.5 nM fue exitoso. En ella se muestran 5 nanoestructuras, 4 de ellas apiladas debido a la interacción π - π de los anillos aromáticos de los nucleótidos, como se observa en la Figura 4.3.

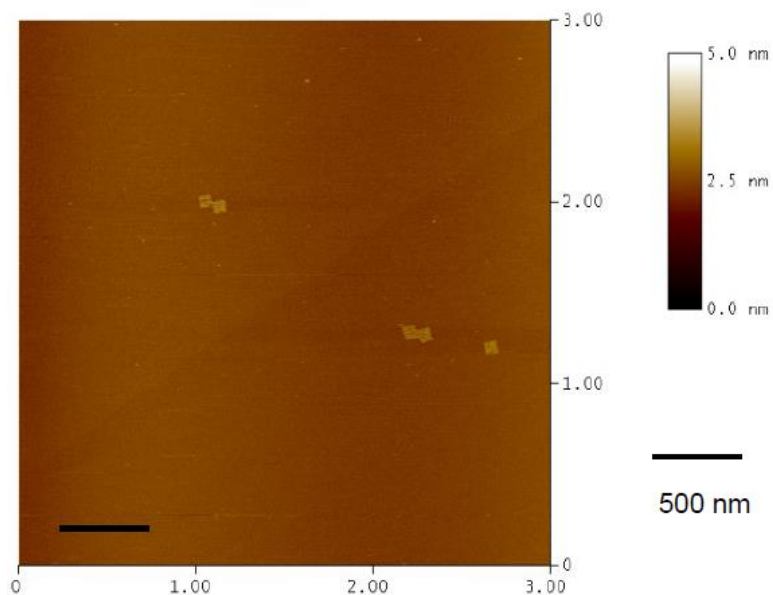


Figura 4.3. Micrografía por AFM del origami rectangular a 0.5 nM. Se muestran 5 rectángulos.

Adicionalmente, se determinaron las dimensiones de la nanoestructura con el software *NanoScope Analysis*, ver Figura 4.4. A partir de 5 muestreos se midieron 18 rectángulos en total y se obtuvieron los valores de $(72.46 \text{ nm} \pm 5.92 \text{ nm}) \times (95.26 \text{ nm} \pm 11.84 \text{ nm})$, correspondientes a las 224 pares de bases de ancho, y a las 32 dobles hélices de largo, respectivamente. Estas mediciones cayeron dentro de los $70 \text{ nm} \times 90 \text{ nm}$, anteriormente reportados por Rothmund [16]. Una vez que se corroboró la correcta formación del origami rectangular, se prosiguió con los experimentos de funcionalización con AuNPs.

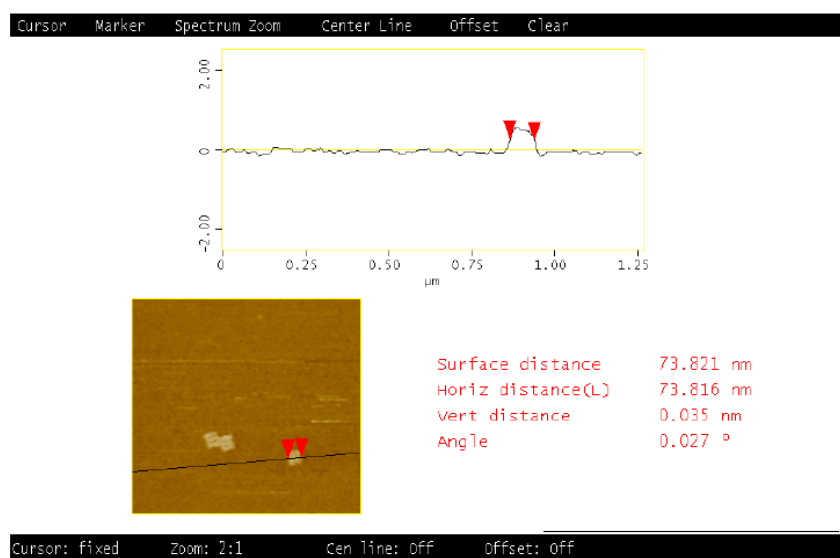


Figura 4.4. Análisis seccional de la micrografía por AFM del origami rectangular. Se muestran dimensiones aproximadas a $80 \text{ nm} \times 110 \text{ nm}$.

Micrografías por AFM del rectángulo con nanopartículas de oro

Con la finalidad de obtener el arreglo de las 12 AuNPs enlazadas en cada origami de forma rectangular, se realizaron tres metodologías para realizar este autoensamble.

En la primera, referida como funcionalización en solución, a una concentración 1 nM se obtuvieron origamis con una o ninguna nanopartícula enlazada, ver Figura 4.5.a y 4.5.c. Se infiere que esto se debió a la repulsión electrostática entre las AuNPs, así como a la libertad de movimiento que estas adquieren cuando se encuentran en solución. De aquí que tienen capacidad de desplazarse e interactuar (repulsión electrostática) con más conjugados por todo el volumen de la muestra.

La segunda metodología, definida como funcionalización en superficie, mostró mejores resultados. De acuerdo a la micrografía de la Figura 4.5.b, se enlazaron en promedio 2 nanopartículas a cada origami a la misma concentración que las anteriores metodologías, 1 nM. La explicación en la mejoría radica en que en este protocolo los origamis estaban semi-fijos a la superficie del sustrato (mica, gracias a su buena adsorción de electrolitos en su superficie), de esta manera las AuNPs tienen contacto con una sola cara del rectángulo. Así, las nanopartículas tienen mayor probabilidad de encontrar su sitio de unión sobre el origami.

Finalmente, los mejores resultados se obtuvieron siguiendo la metodología de funcionalización en solución, pero agregando la proteína C8-B^{Ss07d}, los resultados se muestran en la Figura 4.6. Las micrografías obtenidas muestran conjugados con hasta 8 nanopartículas enlazadas por origami. La proteína C8-B^{Ss07d} tiene una parte hidrofóbica que se intercala con el ADN [32], de modo que durante las 12 h de incubación, esta proteína se adhirió al origami y a las cadenas T₂₄ de los conjugados. Una explicación en el incremento en el número de AuNPs adheridas al origami es que la parte de la proteína atraída al ADN, neutralizó la carga negativa del grupo fosfato, y más conjugados AuNP-ADN se ensamblaron con el origami.

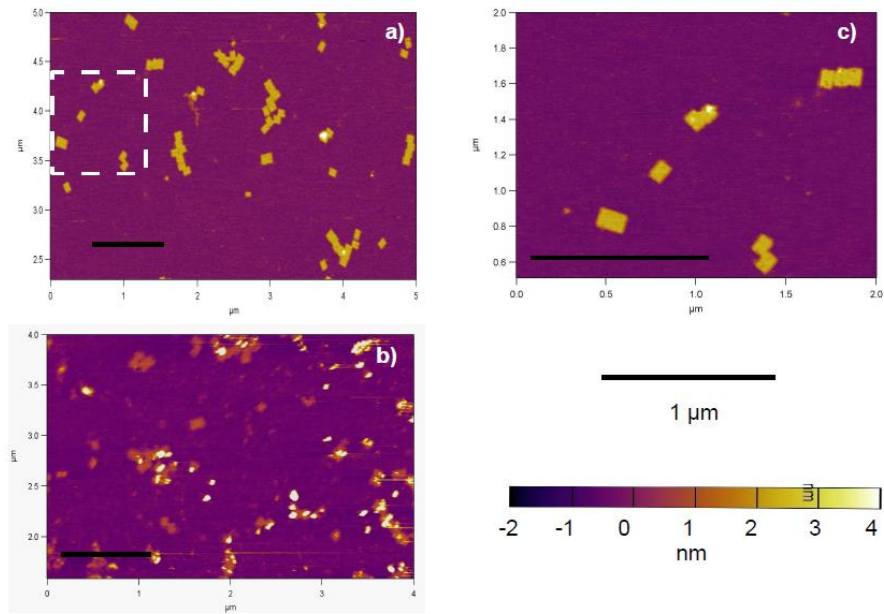


Figura 4.5. Micrografía por AFM del origami rectangular funcionalizado con AuNPs en a) solución y en b) superficie. Los puntos brillantes corresponden a las AuNPs. La micrografía en c) es una ampliación de a) que muestra que sólo una AuNP se enlazó a una nanoestructura, mientras que en b) se enlazaron más AuNPs.

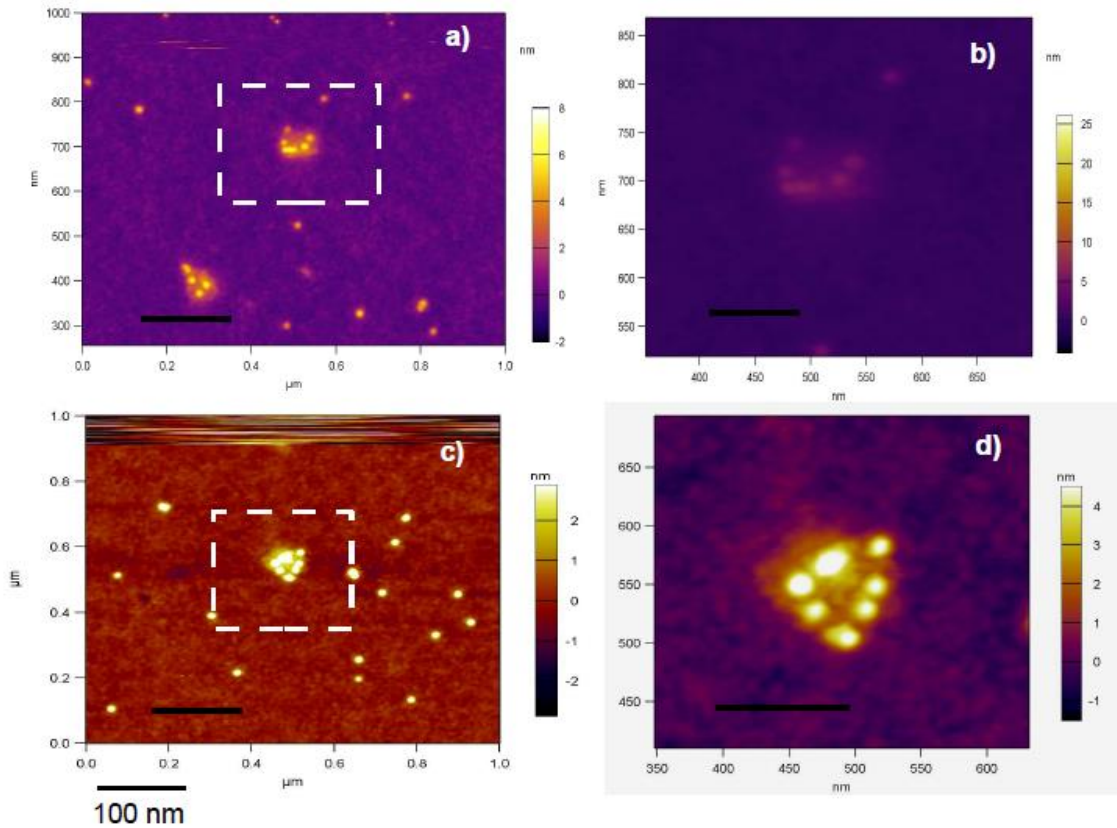


Figura 4.6. Micrografías por AFM del autoensamble del rectángulo de origami de ADN con AuNPs usando la proteína C8-BS^{s07d} para mejorar el rendimiento. Las imágenes b) y d) corresponden a ampliaciones de a) y c), respectivamente.

Los resultados de la Figura 4.6 son una primera aproximación al *Split ring resonator* planteado en la hipótesis. De las 12 AuNPs del patrón original, faltaron 4 de enlazar. Se espera que al tener un mejor conocimiento de la concentración de la proteína C8-BS^{s07d}, se lograrán enlazar las 12 AuNPs como en el diseño de la Figura 4.7.c. A partir de este patrón de AuNPs, el siguiente paso sería la formación del circuito cerrado mediante un proceso llamado metalización, reportado por Pilo-Pais y colaboradores [15]. Éste consiste en la reducción de una solución de AgNO₃ sobre las AuNPs usando el kit de metalización *HQ SILVER™ ENHANCEMENT*, de modo que las nanopartículas se unirían con plata. La formación de este circuito se aproximaría al de la Figura 4.7.a, que físicamente equivale a un circuito de dos capacitores conectados en serie con un inductor, ver Figura 4.7.b.

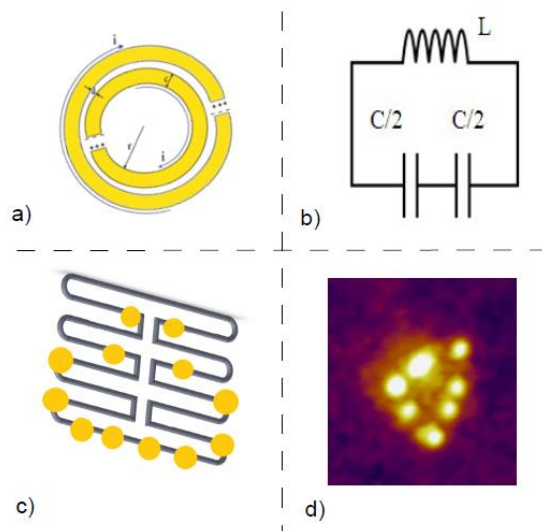


Figura 4.7. Perspectiva general de los resultados obtenidos. Se muestra a) un *split ring resonator*, su b) circuito equivalente: dos capacitores C conectados en serie con un inductor L , c) el diseño de la aproximación de un *split ring resonator* con origami de ADN funcionalizado con AuNPs y d) el resultado obtenido de dicha aproximación.

A partir de estos resultados se puede reflexionar que la construcción de nanodispositivos por las técnicas *bottom-up* exige un entendimiento no solo de las propiedades intrínsecas de los materiales precursores, sino también de aquellas que éstos adquieren cuando se encuentran en un medio. Asimismo se puede notar que la complejidad del sistema aumenta conforme se alcanzan niveles más grandes. Es decir, que las propiedades de las nanoestructuras de ADN con AuNPs son más que las de cada entidad por separado. Este hecho se evidencia con las interacciones electrostáticas presentes entre las nanoestructuras de ADN con las AuNPs, y con la solución iónica en que se encuentran. Describir sistemas complejos es uno de los principales objetivos de las ciencias exactas, y las técnicas *bottom-up* han marcado el camino para lograrlo.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y TRABAJO A FUTURO

La técnica de origami de ADN es una herramienta versátil para el autoensamble de nanoestructuras con geometría distinguible. En particular, el origami rectangular aquí empleado es una superficie plana, fácil de diseñar y con alto potencial de ser utilizado en aplicaciones de nanoelectrónica.

En cuanto a la metodología adoptada, se ha comprobado reproducibilidad en los experimentos reportados por Pilo-Pais y Rothmund [15, 16]. Las dimensiones reportadas del rectángulo variaron dentro de un 10-20% con las medidas por AFM. Además, la formación de las nanoestructuras fue completa y concordó con lo analizado por CanDo.

De las tres metodologías utilizadas para el autoensamble de los origamis con los conjugados AuNP-ADN, la que permitió que más nanopartículas se enlazaran fue la de funcionalización en solución con la proteína C8-BS^{s07d}. Haciendo uso de ésta, se enlazaron hasta 8 de 12 AuNPs. La afinidad de uno de los bloques de esta proteína hacia el ADN fue determinante para neutralizar cargas superficiales en las nanoestructuras funcionalizadas. Las otras dos metodologías consistieron en exponer al origami con los conjugados en solución, o bien, sobre una superficie de mica. Esta última reportó en promedio 2 AuNPs/origami y en la primera de 0 a 1 AuNP/origami, ambas soluciones a 1 nM.

En este estudio se propuso la funcionalización de este rectángulo con nanopartículas de oro para crear circuitos eléctricos. El circuito aquí desarrollado consistió en un *Split-ring resonator*, debido a su potencial uso en aplicaciones de nanoelectrónica y nano-óptica. El patrón obtenido de 8 nanopartículas necesita ser mejorado para lograr enlazar las 12 nanopartículas inicialmente propuestas. Para ello, se plantea encontrar las concentraciones óptimas de la proteína C8-BS^{s07d} para aumentar el número de AuNPs enlazadas.

Una vez que se haya logrado enlazar las 12 AuNPs sobre el rectángulo, el siguiente paso será la unión de estas nanopartículas mediante la reducción de plata en solución. Esta metodología está reportada por Pilo-Pais y colaboradores [15]. Cuando se llegue a este paso, se podrá proseguir con la

caracterización eléctrica de los nano-circuitos. Recientemente se desarrolló una técnica por litografía por haz de electrones para medir la corriente a lo largo de un origami metalizado [33].

Las metodologías de construcción *bottom-up* aquí implementadas permiten la descripción de sistemas complejos. A partir del estudio de los niveles fundamentales de la materia, como los átomos y las moléculas, o bien, como los iones y del ADN, se puede alcanzar niveles más altos de complejidad, como las nanoestructuras de ADN funcionalizadas con AuNPs.

CAPÍTULO VI

REFERENCIAS

1. Binns, C. 2010, "Introduction to Nanoscience and Nanotechnology" in *Introduction to Nanoscience and Nanotechnology*.
2. UT-Battelle. 2007. Productive Nanosystems A Technology Roadmap. 198. doi:10.1088/0031-9120/40/4/003
3. Schmidt, J. 2004. Unbounded Technologies: Working Through the Technological Reductionism of Nanotechnology. *Discovering the nanoscale*.
4. Billon, L. & Borisov, O. 2016, "Macromolecular self-assembly" in *Macromolecular Self-assembly*, pp. 1-257.
5. Seeman, N.C. 1982, "Nucleic acid junctions and lattices", *Journal of theoretical biology*, vol. 99, no. 2, pp. 237-247.
6. Recuperado el 30-05-2017 de:
https://en.wikipedia.org/wiki/List_of_DNA_nanotechnology_research_groups
7. Adleman, L.M. 1994, "Molecular computation of solutions to combinatorial problems", *Science*, vol. 266, no. 5187, pp. 1021-1024
8. SantaLucia Jr., J. & Hicks, D. 2004, *The thermodynamics of DNA structural motifs*.
9. Vincent, J.F.V., Bogatyreva, O.A., Bogatyrev, N.R., Bowyer, A. & Pahl, A.-. 2006, "Biomimetics: Its practice and theory", *Journal of the Royal Society Interface*, vol. 3, no. 9, pp. 471-482
10. Majikes, J. 2016, "DNA origami folding pathways". PhD thesis in Materials Science and Engineering. North Carolina State University. NC, USA.
11. Adleman, L. 1998, "Computing with DNA", *Scientific American*. pp. 34-41
12. Zahid, M., Kim, B., Hussain, R., Amin, R. & Park, S. H. 2013, DNA nanotechnology: a future perspective. *Nanoscale Res. Lett.* no. 8 vol. 119
13. Topkaya, S.N., Azimzadeh, M. & Ozsoz, M. 2016, "Electrochemical Biosensors for Cancer Biomarkers Detection: Recent Advances and Challenges", *Electroanalysis*, vol. 28, no. 7, pp. 1402-1419.
14. Douglas, S.M., Bachelet, I. & Church, G.M. 2012, "A logic-gated nanorobot for targeted transport of molecular payloads", *Science*, vol. 335, no. 6070, pp. 831-834.
15. Pilo-Pais, M., Goldberg, S., Samano, E., Labean, T.H. & Finkelstein, G. 2011, "Connecting the

- nanodots: Programmable nanofabrication of fused metal shapes on DNA templates", *Nano Letters*, vol. 11, no. 8, pp. 3489-3492
16. Rothmund, P.W.K. 2006, "Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns", *Nature*, vol. 440, no. 7082, pp. 297-302.
 17. Gopinath, A., Miyazono, E., Faraon, A. & Rothmund, P.W.K. 2016, "Engineering and mapping nanocavity emission via precision placement of DNA origami", *Nature*, vol. 535, no. 7612, pp. 401-405.
 18. Wilner, O.I. & Willner, I. 2012, "Functionalized DNA nanostructures", *Chemical reviews*, vol. 112, no. 4, pp. 2528-2556.
 19. Wegener, M. & Linden, S. 2010, "Shaping optical space with metamaterials", *Physics Today*, vol. 63, no. 10, pp. 32-36.
 20. F. Antonii, Panacea. 1618, "Aurea-Auro Potabile; Bibliopolio Frobeniano" in Hamburg.
 21. Watson, J.D. & Crick, F.H. 2007, "Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid.", *Clinical orthopaedics and related research*, vol. 462, pp. 3-5
 22. Alivisatos, A.P., Johnsson, K.P., Peng, X., Wilson, T.E., Loweth, C.J., Bruchez Jr., M.P. & Schultz, P.G. 1996, "Organization of 'nanocrystal molecules' using DNA", *Nature*, vol. 382, no. 6592, pp. 609-611.
 23. Pedersen, R., Marchi, A., Majikes, J., Nash, J., Estrich, N., Courson, D., Hall, C., Craig, S., LaBean, T., 2014, "DNA properties" in *Handbook of nanomaterials properties*, pp 1125-1157
 24. Lu, M., Guo, Q., Marky, L.A., Seeman, N.C. & Kallenbach, N.R. 1992, "Thermodynamics of DNA branching", *Journal of Molecular Biology*, vol. 223, no. 3, pp. 781-789
 25. Zhang, Y. & Seeman, N.C. 1994, "Construction of a DNA-truncated octahedron", *Journal of the American Chemical Society*, vol. 116, no. 5, pp. 1661-1669
 26. Marchi, A.N., Saaem, I., Vogen, B.N., Brown, S. & Labean, T.H. 2014, "Toward larger DNA origami", *Nano Letters*, vol. 14, no. 10, pp. 5740-5747.
 27. 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*, vol. 7, no. 40, pp. 16621-16624.
 28. 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*, vol. 37, no. 15, pp. 5001-5006.
 29. Castro, C.E., Kilchherr, F., Kim, D.-., Shiao, E.L., Wauer, T., Wortmann, P., Bathe, M. & Dietz,

- H. 2011, "A primer to scaffolded DNA origami", *Nature Methods*, vol. 8, no. 3, pp. 221-229.
30. Wang, C.-., Wu, S.-., Li, H.-. & Chang, H.-. 2016, "Biomedical Applications of DNA-Conjugated Gold Nanoparticles", *ChemBioChem*, , pp. 1052-1062.
31. Roller, E.-., Khorashad, L.K., Fedoruk, M., Schreiber, R., Govorov, A.O. & Liedl, T. 2015, "DNA-assembled nanoparticle rings exhibit electric and magnetic resonances at visible frequencies", *Nano Letters*, vol. 15, no. 2, pp. 1368-1373.
32. Estrich, N.A., Hernandez-Garcia, A., De Vries, R. & LaBean, T.H. 2017, "Engineered Diblock Polypeptides Improve DNA and Gold Solubility during Molecular Assembly", *ACS Nano*, vol. 11, no. 1, pp. 831-842.
33. 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*, vol. 32, no. 40, pp. 10159-10165