



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA DE MATERIALES
“SÍNTESIS DE NANOESTRUCTURAS BASADAS EN ADN USANDO UN MINI-
ANDAMIO, Y FUNCIONALIZACIÓN CON NANOPARTÍCULAS METÁLICAS”

TESIS

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

PRESENTA:
ING. KAREN LIZBETH CARDOS TISNADO

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. HUGO TIZNADO VÁZQUEZ
CENTRO DE NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA

ENSENADA, B. C., MÉXICO, 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.

CONTENIDO

RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
CAPÍTULO 1	1
1.1. Introducción	1
1.2. Hipótesis	5
1.3. Objetivos	5
1.3.1 Objetivo general.....	5
1.3.2. Objetivos específicos	5
CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO.....	6
2.1 Historia del ADN	6
2.2 Componentes químicos de los ácidos nucleicos	7
2.2.1 Azúcar	7
2.2.2 Bases nitrogenadas.....	8
2.2.3 Grupo fosfato	9
2.3 Estructura Del Adn	9
2.3.1 Nucleótido.....	9
2.3.2 Doble hélice	10
2.4. Adn como Material de Construcción.....	13
2.4.1 La unión holliday y el ADN como ladrillo y mezcla.....	14
2.4.2 Origami de ADN.....	20
2.5 Resonancia plásmonica superficial.....	26
CAPÍTULO 3: TÉCNICAS EXPERIMENTALES.....	29
3.1 Electroforesis	30
3.2 Espectroscopía de Uv-Vis.....	33
3.3 Microscopía de Fuerza Atómica	36
CAPÍTULO 4: METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	41
4.1 Diseño del triangulo de ADN	41
4.2 Preparación de oligonucleotidos.	44
4.3 Síntesis de Origami de ADN.....	46
4.4 Purificación de las nanoestructuras de Origami de ADN	48
4.5 Activación de oligonucleótidos tioladas y backfill.....	49
4.6 Tratamiento de nanopartículas de oro (AuNPs).....	53
4.7 Purificación de nanopartículas de oro.....	55

4.8 Funcionalización en superficie	58
CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
5.1 Visualización de triángulo de Origami de ADN con AFM	60
5.2 Imágenes del triángulo funcionalizado con AuNPs por AFM.....	72
5.3 Comprobación de formación de nanoestructura por electroforesis	78
CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO	81
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA	83
APENDICE.....	92
APÉNDICE A: BOSQUEJO DEL ANDAMIO	92
APÉNDICE B: DISEÑO caDNAno	93
APÉNDICE C: SIMULACIONES CanDo.....	94
APÉNDICE D: SECUENCIA DEL MINI-M13mp18	95
APÉNDICE E: LISTADO DE SECUENCIA DE GRAPAS PARA FORMAR EL TRIANGULO DE ADN	96
APÉNDICE F: LISTADO DE GRAPAS EXTENDIDAS.....	99
APÉNDICE G: SUGERENCIAS DE DISEÑO	101
APÉNDICE H: HIDRATACIÓN DE GRAPAS.....	102

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Gráfica original de la ley de Moore (Moore , 1965).	3
Figura 2. Representación esquemática de las moléculas de los azúcares presentes en ARN y ADN.....	7
Figura 3. Representación esquemática de la estructura molecular de las bases nitrogenadas.....	8
Figura 4. Molécula del radical fosfato	9
Figura 5. Esquema mostrando los componentes de un nucleótido.	10
Figura 6. a) Unión entre dos desoxirribosas a través de un enlace fosfodiéster. b) Representación esquemática de una cadena sencilla de ADN (ssDNA).....	11
Figura 7. Diagrama esquemático de la cadena doble de ADN.	12
Figura 8. Representación de la doble hélice del ADN y sus principales características.	13
Figura 9. a) Unión Holliday y el punto ramal que le confiere movilidad. b) Cuatro cadenas de ADN sintéticas sin punto ramal por lo que son inmóviles c) Extremos pegajosos, con secuencia complementaria a otro extremo pegajosos, añadidos a una cadena de cada extremo. d) Arreglo periódico de ADN.....	16
Figura 10. Estructura de ocho y doce brazos de ADN (Wang & Seeman , 2007).....	17
Figura 11. Formación de un entrecruzamiento entre dos hélices. Las esferas rojas y azules representan los átomos de fósforo tal que los dos colores indican dos cadenas sencillas complementarias.	17
Figura 12. Se esquematizan los cinco isómeros, las flechas negras indican la simetría de las cadenas y las flechas en rojas y azul indican la orientación 3'.....	18

Figura 13. Imágenes de AFM de: a) un tetraedro, b) un dodecaedro, c) un fullereno y d) nanotubos con geometrías de tres, cuatro y cinco brazos. Imágenes reconstruidas con la microscopia cryo-TEM se incluyen en a), b) y c).....	19
Figura 14. Primeras estructuras sintetizadas con el método de origami de ADN (Rothemund P. W., 2006).	21
Figura 15. Esquema del primer paso en el diseño de una nanoestructura usando origami de ADN.	22
Figura 16. Bosquejo del segundo paso en el diseño de una nanoestructura usando origami de ADN mostrando la manera en que el andamio se pliega.	23
Figura 17. Esquema del tercer paso en el diseño de una nanoestructura usando origami de ADN mostrando un posible arreglo de las grapas complementarias.	24
Figura 18. Bosquejo del cuarto paso en el diseño de una nanoestructura usando origami de ADN y mostrando el arreglo óptimo de las grapas que confieran mayor estabilidad a la nanoestructura de ADN.....	24
Figura 19. Movimiento de iones dentro de un campo eléctrico en electroforesis.	31
Figura 20. Cámara de electroforesis mostrando un gel horizontal de agarosa	32
Figura 21. Atenuación de un haz de radiación electromagnética, $I \leq I_0$, por una disolución.	34
Figura 22. Imagen del equipo NanoDrop©, Thermo Scientific, Sistema de microlitro y cubeta. ..	35
Figura 23. Diagrama esquemático del AFM. 1) Diodo láser, 2) “Cantilever”, 3) espejo, 4) fotodetector sensible a la posición, 5) scanner y 6) piezoeléctrico con muestra (Ricci & Braga , 2004).....	37
Figura 24. A) Punta piramidal con base cuadrada, B) punta cónica aguda, C) cantilever de forma “V” y D) cantilever de barra rectangular (Johnson , Hilal , & Bowen , 2009).....	38

Figura 25. Esquematación del principio de funcionamiento del AFM (Eaton & West , 2010).	39
Figura 26. Celda especial de AFM para muestras en fluido.	40
Figura 27. Se representan de manera esquemática los pasos de Freeze ‘N Squeeze.....	57
Figura 28. Imagen de nanoestructuras triangulares de origami de ADN [1nM] con Cypher.	61
Figura 29. Amplificación a una región de la imagen 28 [1nM] con Cypher.	62
Figura 30. Imagen de nanoestructuras triangulares de origami de ADN [1nM] con Nanoscope.62	
Figura 31. Amplificación de $2 \times 2 \mu\text{m}$ una región de la imagen 30 [1nM] con Nanoscope.	63
Figura 32. Acercamiento de $1.5 \times 1.5 \mu\text{m}$ de la Imagen 30 [1nM] con Nanoscope.	63
Figura 33. Imagen en seco [1nM] con AFM Nanoscope.....	65
Figura 34. Disminución de tamaño de barrido de la figura 33, $2 \times 2 \mu\text{m}$ con Nanoscope.	66
Figura 35. Ampliación de la figura 33 a $1.25 \times 1.25 \mu\text{m}$	66
Figura 36. Acercamiento a $400 \times 400 \text{ nm}$ de dos triángulos de la figura 33	67
Figura 37. Medida de la mediana de uno de los triángulos de la figura 28.	68
Figura 38. Medición de la longitud de un lado, distancia entre vértices, de uno de los triángulos de la figura 28.	69
Figura 39. Medición de la mediana y una arista de un triángulo de la figura 32 con Nanoscope.	70
Figura 40. Medición de las tres diferentes aristas del triángulo de la figura 35 con Nanoscope..	70
Figura 41. Diseño en caDNAno visualizado con Autodesk Molecular Viewer y las dimensiones aproximadas de sus lados.....	71
Figura 42. Triángulo de ADN funcionalizado con AuNPs en dos de sus vértices.	73
Figura 43. Triángulo de ADN funcionalizado con una AuNP en uno de sus vértices.	74
Figura 44. Triángulo de ADN funcionalizado con una AuNP en uno de sus vértices	74

Figura 45. Medición de la longitud de la mediana del triángulo de la figura 34.	76
Figura 46. Medición longitudinal de un lado, distancia entre AuNPs.	77
Figura 47. Imágenes de gel de agarosa con las diferentes muestras iluminado usando: a) luz UV y b) luz visible.....	80

RESUMEN

La naturaleza siempre ha sido fuente de inspiración para el desarrollo de muchas de las tecnologías que hoy son indispensables para nuestro día a día. Si nos remontamos más de cinco siglos atrás, el artista e ingeniero Leonardo da Vinci fue uno de los pioneros que dedicó su vida a observar y tratar de describir a detalle diversos fenómenos. Entre estos se encuentran el vuelo de las aves, la anatomía del hombre, etc.; de ahí surgieron algunas ideas que posteriormente se concretaron en la construcción de un aeroplano o conocimiento del cuerpo humano.

El conjunto de estas diversas observaciones a través del tiempo e intentos de imitar dichos fenómenos ha dado lugar a un nuevo campo de investigación, que se conoce como materiales biomiméticos. En esta nueva área, el estudio del ADN ha tomado importancia no solo como material genético; sino, también como material de construcción. Esto por el reconocimiento molecular que existe entre sus bases, concibiendo en principio un proceso de autoensamble estricto. Esto ha sido la base para la creación de diferentes formas estructurales con precisión nanométrica y, posiblemente de manera insospechada, el desarrollo de nanodispositivos para aplicaciones en áreas tan diversas como: médicas, electrónicas, fotónicas, entre otras.

En este proyecto de investigación se describen los principios de la técnica de origami de ADN; así como, el proceso de síntesis para la obtención de una nanoestructura con forma triangular utilizando la tercera parte del genoma del bacteriófago M13mp18 (2,404 nt). Así mismo, la posterior funcionalización con nanopartículas de oro en una geometría específica, en los vértices internos y externos de la nanoestructura triangular, para futuras aplicaciones plasmónicas.

ABSTRACT

Nature has always been a source of inspiration for the development of many technologies, which today are essential to our daily life. Five centuries ago, the artist and engineer Leonardo da Vinci dedicated most of his life to observe and describe in detail several phenomena from the scientific point of view, such as the bird's flight, the human anatomy, the water flow, etc. From these observations, he foresaw new technologies such as the construction of an airplane or hydroelectric power.

The understanding these phenomena and the development of new materials mimicking nature has given a rise to a new field of research, biomimetic materials. This new area is based on molecular biology and biotechnology. In particular, DNA has been used as a build block besides been responsible of the genetic information in living organisms. This is due to the molecular recognition between their bases and self-assembly during hybridization. This has been the basis for the creation of different shapes with nanometer accuracy and, hopefully the development of new nanodevices for a variety of applications in medicine, electronics, photonics, etc.

This research project describes the principles of the DNA origami technique; as well as the synthesis process for obtaining a nanostructure with a triangular shape using the third part of the M13mp18 genome (2,404 nt). (The DNA origami + gold nanoparticles complexes) are studied by placing the inorganic material at the inner and outer vertices of the triangular nanostructure for future plasmonic applications.

CAPÍTULO 1

1.1. INTRODUCCIÓN

Han pasado más de 50 años desde la icónica conferencia del físico Richard Feynman para la Sociedad Americana de Física (APS por sus siglas en inglés), titulada “*There’s a plenty of room at the bottom*” [1]. Feynman, ofrece una visión futurista, y tal vez utópica, donde el alcance tecnológico será tal que se logrará la manipulación controlada de uno por uno de átomos. Esta predicción se vio materializada en 1990, cuando la división de investigación de IBM posicionó de manera individual átomos de Xenón para formar las mismas siglas de la compañía utilizando el microscopio de efecto túnel para tal fin (STM, en inglés) [2]. Hoy en día, Feynman es considerado el padre de la Nanociencia, disciplina que ha dado paso al desarrollo de nuevas y revolucionarias nanotecnologías. Lo especial de esta nueva tendencia a lo nano se debe a que los materiales pueden presentar diferentes e interesantes propiedades a esa escala, las cuales pueden ser aprovechados para mejorar o desarrollar nuevas tecnologías. En general, los nanomateriales son todos aquellos que miden entre 1 a 100 nanómetros (nm), 1 nm equivale a 10^{-9} metros. Para tener una idea más clara de lo que significa un nanómetro, el grosor de un cabello es aproximadamente de 50,000 a 180,000 nanómetros [3].

En la naturaleza existen diferentes materiales en la nanoescala, desde un virus hasta objetos inanimados como un punto cuántico. Los procesos de construcción que sigue la naturaleza son una fuente de inspiración para los investigadores quienes intentan imitarlos para sintetizar novedosos materiales y desarrollar nuevas tecnologías [4]. El autoensamble es un ejemplo

notable de construcción natural utilizado para crear sistemas biológicos complejos. Este método “ingenieril” ofrece un control a nivel molecular de la estructura, dimensiones y morfología del material; por consiguiente, hace posible la construcción de nanoestructuras en 1-, 2- y 3-dimensiones [5]. El ADN se rige por este método de autoensamble, debido a su direccionalidad química y su apareamiento Watson-Crick predecible. Por tanto, el ADN se puede considerar como es un bloque de construcción ideal para crear diferentes nanoarquitecturas con resolución nanométrica [6].

El ADN es famoso como material genético, pero también se ha destacado como material de construcción. De acuerdo a la revista *Nature Nanotechnology*, la nanotecnología basada en ADN es una de las cuatro principales áreas de interés, además de nanotoxicología, grafeno y nanoporos [7]. La investigación en nanotecnología de ADN se ha vuelto popularizado en los últimos años, ya que además de poder sintetizar diferentes nanoestructuras también ha servido de templete para organizar y posicionar de manera precisa moléculas funcionales, materiales inorgánicos, entre otros. Esto con el fin de desarrollar dispositivos a escala nanométrica prácticos, novedosos y de gran capacidad. Uno de los componentes principales de estos dispositivos es el transistor, cuya invención en 1947 [8] dio paso al desarrollo de circuitos integrados [9], desencadenando el desarrollo de varios dispositivos electrónicos ahora básicos en nuestra vida cotidiana.

En 1965, Moore predijo una tendencia en la industria de los semiconductores donde la densidad de transistores en circuitos integrados se duplicaría aproximadamente cada 18 meses (figura 1). Esto a su vez impulsó la creación de computadoras portátiles y dispositivos de bolsillos con una enorme capacidad de procesamiento a precios bajos. Hasta el día de hoy esta predicción es

comúnmente conocida como la Ley de Moore [10]. Muchos tecnólogos han pronosticado la desaparición de la Ley de Moore e incluso el mismo Moore ha declarado que el crecimiento exponencial no puede durar por siempre [11]. Por esto, se buscan nuevas alternativas que replacen el método tradicional de fabricación de los transistores y circuitos integrados.

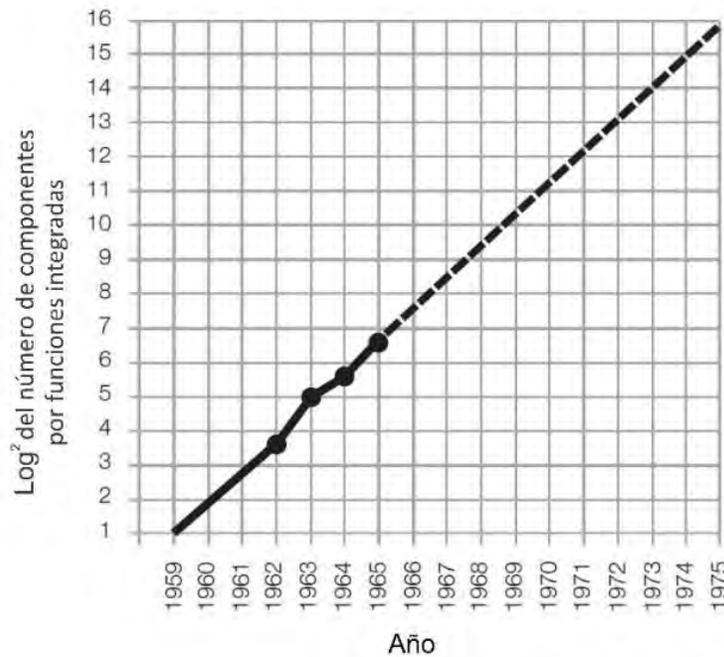


Figura 1. Gráfica original de la ley de Moore [10].

Una alternativa propuesta es el uso de materiales con propiedades plasmónicas, debido a su potencial aplicación en la miniaturización de dispositivos ópticos, sensores y circuitos fotónicos; así como para diagnósticos médicos y terapéuticos. La fabricación de dichas dispositivos plasmónicas se realiza con litografía, lo que dificulta sintetizar estructuras en tres dimensiones [12]. Para mitigar estas limitaciones, se han buscado métodos “bottom-up” como el autoensamble para sintetizar materiales con estructuras bien definidas y propiedades plasmónicas

controlables. Es por esto que la nanotecnología de ADN, incluyendo su funcionalización con nanopartículas metálicas, es de gran interés para el desarrollo de nuevos dispositivos optoelectrónicos [13].

En este trabajo de tesis se describe la síntesis de una nanoestructura de ADN de forma triangular basada en la técnica de origami de ADN. Para llevar a cabo este propósito se plantea un diseño novedoso basado en el uso de la tercera parte del plásmido M13mp18 (2,404 nt) tal que la nanoestructura resultante tenga geometría distinguible, al ser visualizada por técnicas convencionales como AFM. La literatura reciente reporta el diseño de un triángulo equilátero basado en la unión de tres trapezoides idénticos como el tradicional [14,26]. Desafortunadamente, una de las desventajas de este esquema es la funcionalización de material inorgánico en sus vértices. De aquí que este trabajo propone un enfoque distinto en el que el triángulo esté formado por un trazo continuo que “barra” por completo el área delimitada por los bordes exterior e interior, tal como se muestra en el apéndice A. Esta propuesta permite la colocación precisa de nanopartículas metálicas, por ejemplo, equidistantes entre sí. Además, el tamaño de las nanopartículas se puede incrementar utilizando un método de metalización por medio de una solución que contenga plata u oro. Todo lo anterior es una gran ventaja cuando se desean realizar estudios plasmónicos en un futuro.

1.2. HIPÓTESIS

- Es posible obtener una nanoestructura de forma triangular con un diseño novedoso a partir de la tercera parte del plásmido M13mp18 (2,404 nt) y la colocación de nanopartículas de oro funcionalizadas en sus vértices internos y externos.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GENERAL

- Sintetizar nanoestructuras con forma reconocible para aplicaciones plasmónicas futuras.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Diseñar una nanoestructura con forma triangular utilizando los softwares caDNAno y CanDo.
- Determinar los sitios para la colocación de nanopartículas de oro lo más cercano posible a los vértices internos y externos del triángulo de ADN.
- Verificar por diversas técnicas la formación de las nanoestructuras de forma triangular ADN y la colocación de nanopartículas de oro en los sitios preseleccionados, así como medir sus dimensiones características.

CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO

2.1 HISTORIA DEL ADN

En 1869, el médico suizo Friedrich Miescher fue el primero en obtener una muestra pura de ADN al tratar de separar las proteínas, que se creía hasta entonces que formaban el material genético, de las células. En sus experimentos Miescher notó que el precipitado era una sustancia desconocida ya que no tenía características ni de proteína ni de lípido. En cambio, observó que era una sustancia rica en fósforo y nitrógeno. A esta sustancia Miescher la denominó nucleína, debido a que se encontraba en el núcleo de la célula [15]. Posteriormente, en 1889, Altman perfeccionó la técnica de purificación para analizar mejor la nueva y novedosa sustancia y propuso el término de ácido nucleico, el cual sigue vigente hasta nuestros días [16].

Estudios posteriores permitieron conocer los diferentes constituyentes químicos del ácido nucleico, y que serán descritos con detalle más adelante. En el período entre 1885 y 1901, el alemán Albrecht Kossel identificó y nombró las bases nitrogenadas: Adenina, Guanina, Citosina, Timina y Uracilo, aunque este último no es un componente del ADN [17]. En 1919, Phoebus Levene descubrió la ribosa y desoxirribosa, acuñando los famosos términos ácido ribonucleico y ácido desoxirribonucleico [18]. En 1944, Oswald T. Avery y colaboradores realizaron estudios donde propusieron que el ADN contenía toda la información genética [19]. Años después, en 1952, dicha información fue confirmada por Alfred Hershey y Martha Chase [20]. En 1953, Rosalind Franklin, Maurice Wilkins, Francis Crick y James Watson hicieron historia al resolver la incógnita sobre la estructura del ADN por medio del estudio de su patrón por difracción por

rayos X [21]. De esta manera, propusieron el famoso modelo de la doble hélice para la estructura del ADN, siendo una de las más grandes aportaciones a la ciencia. Para mediados de 1960, el código genético fue descifrado y nació la Biología Molecular. Sin embargo, en este trabajo de tesis trataremos al ADN no como el responsable de las características hereditarias de los seres vivos sino también como un material de construcción. Para ello a continuación se describirán los componentes químicos que le confieren dichas características como son los azúcares, las bases nitrogenadas y los grupos fosfato.

2.2 COMPONENTES QUÍMICOS DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

2.2.1 AZÚCAR

Como se mencionó anteriormente, los ácidos nucleicos se distinguen por tener dos tipos distintos de azúcar, ribosa y desoxirribosa, lo que da lugar al ARN y al ADN, respectivamente. El prefijo “desoxi” significa “ausencia de oxígeno”, el cual hace alusión a la característica principal que diferencia un azúcar del otro, ya que ambos son pentosas; es decir, un monosacárido con cinco átomos de carbono [22], como se ilustra en la figura 2.

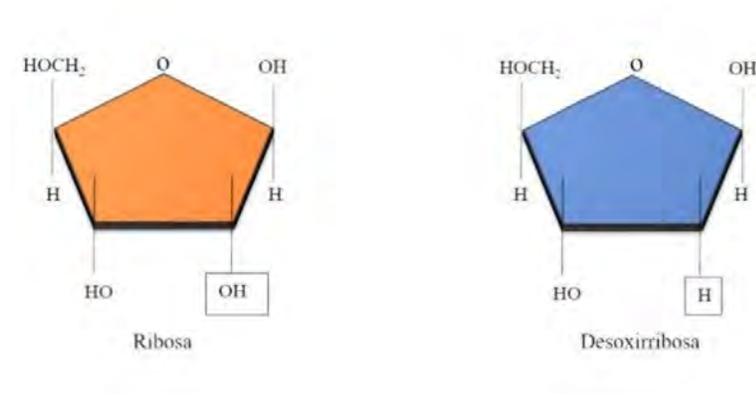


Figura 2. Representación esquemática de las moléculas de los azúcares presentes en ARN y ADN.

2.2.2 BASES NITROGENADAS

Las bases nitrogenadas son anillos de carbono unidos a moléculas de nitrógeno, que al estar en condiciones ácidas cada una se puede enlazar a un H^+ (protón). Por esta razón se les considera como bases de acuerdo a la teoría de Brønsted-Lowry [22]. Hay dos familias en las cuales se dividen las bases nitrogenadas, el primer grupo llamado pirimidinas está conformado por citosina (C), timina (T) y uracilo (U), cuya estructura es a base de un anillo de seis carbonos. Las segundas forman el grupo de las purinas, como la guanina (G) y adenina (A), caracterizadas por un anillo de seis carbonos unido a otro anillo de cinco carbonos (véase figura 3). Cabe señalar que el uracilo sólo se encuentra en el ARN [23].

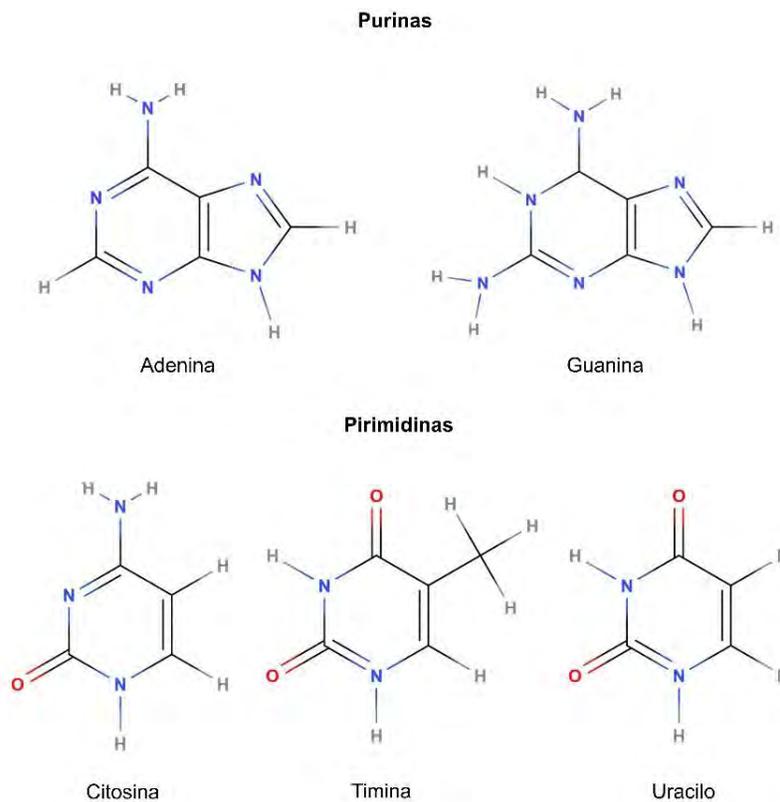


Figura 3. Representación esquemática de la estructura molecular de las bases nitrogenadas.

2.2.3 GRUPO FOSFATO

El grupo fosfato, ver figura 4, actúa como eslabón entre azúcares consecutivos en el ADN a través de un enlace fosfodiéster, el cual se forma entre el grupo hidroxilo (–OH) del azúcar y el fosfato (–PO₄). Esta secuencia alterna constituye la columna vertebral del ADN. Los grupos fosfato confieren una carga negativa a los ácidos nucleicos cuando se encuentran en un pH de 7. En la naturaleza, esta carga se neutraliza a través de las histonas, así como otras proteínas que intervienen en el empaquetamiento del ADN en la célula [24].



Figura 4. Molécula del radical fosfato

2.3 ESTRUCTURA DEL ADN

2.3.1 NUCLEÓTIDO

Los ácidos nucleicos son cadenas largas constituidas por un monómero fundamental llamado nucleótido que es la unión de un azúcar (desoxirribosa o ribosa) a un grupo fosfato por un lado y a una base nitrogenada por el otro [23]. En particular, a la unión de una molécula de desoxirribosa más una base nitrogenada se le conoce como nucleósido y se une por medio de un

enlace glicosídico. Cuando un fosfato se une a un nucleósido por medio del enlace fosfodiéster, antes mencionado, da lugar al componente básico del ADN que es el nucleótido, como se representa en la figura 5.

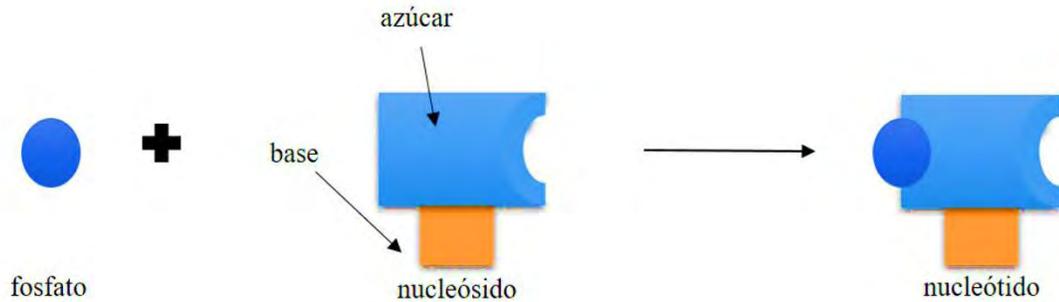


Figura 5. Esquema mostrando los componentes de un nucleótido.

2.3.2 DOBLE HÉLICE

La estructura molecular del ADN se origina por la unión alterna entre cada nucleótido que lo conforma. Es decir, dos desoxirribosas se enlazan entre sí por medio del grupo fosfato, formando un enlace fosfodiéster entre el carbono 3' de un azúcar y el carbono 5' de la siguiente, ver figura 6.a. Estas sucesivas uniones dan lugar a una cadena sencilla de ADN (ssDNA por sus siglas en inglés), ver figura 6.b [21].

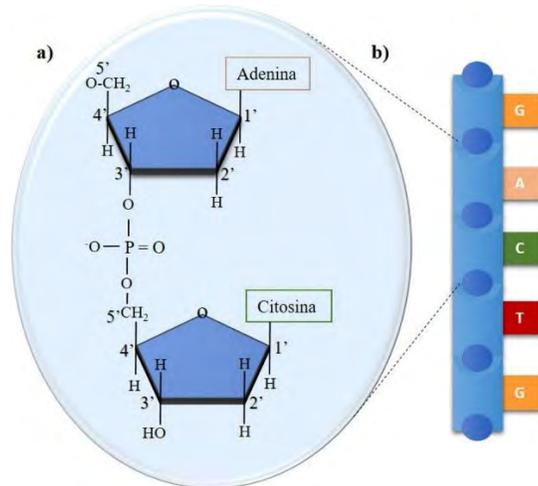


Figura 6. a) Unión entre dos desoxirribosas a través de un enlace fosfodiéster. b) Representación esquemática de una cadena sencilla de ADN (ssDNA).

La popular doble hélice de ADN se genera cuando dos ssADN se unen si las direcciones son antiparalelas entre sí; es decir, mientras una de ellas se encuentra en la dirección 3' a 5', de acuerdo a la nomenclatura de los carbonos en la desoxirribosa, la cadena complementaria debe ir de 5' a 3'. Las bases nitrogenadas son las encargadas de enlazar las dos ssADN complementarias a través de puentes de hidrógeno, A con T y G con C. Específicamente, ya que estas uniones están dadas por el número de puentes de hidrógeno que pueden formar entre cada una de las bases, A con T forman dos puentes de hidrógeno mientras que G con C forman tres puentes de hidrógeno. La literatura se refiere a estos enlaces como apareamiento Watson-Crick [21], un ejemplo de cómo se va conformando la doble cadena de ADN se representa en la figura 7.

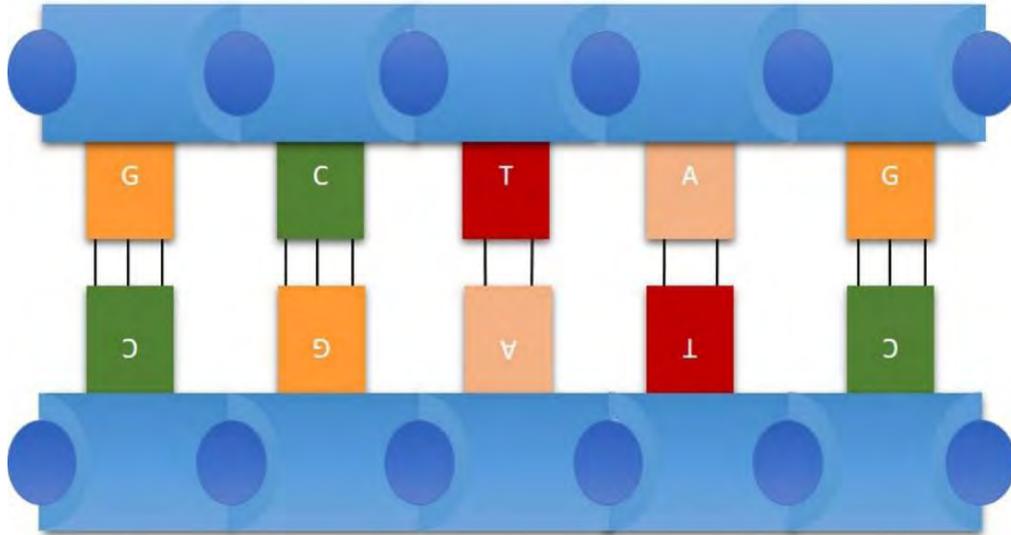


Figura 7. Diagrama esquemático de la cadena doble de ADN.

El ADN es un objeto a nanoescala, y algunas de sus propiedades inherentes son importantes para su manipulación como material de construcción. En la naturaleza, el ADN puede tener diferentes conformaciones dependiendo de su secuencia, modificaciones químicas, condiciones de solución, etc., designadas como: ADN-A, ADN-B y ADN-Z. Sin embargo, en este trabajo de tesis sólo se estudiarán las características y propiedades de la doble hélice más común y denominada como forma B (ADN-B).

Las características del ADN-B son las siguientes: cada vuelta completa de la hélice tiene entre 10.5-10.67 pares de bases (pb) que equivale a 34 Å o 3.4 nm, y un diámetro aproximado de 2.2 a 2.6 nm. Tiene un surco menor con una distancia promedio de 1.2 nm entre fosfato y fosfato y un surco mayor de 2.2 nm de distancia, en la figura 8 se resumen y señalan las características descritas [24].

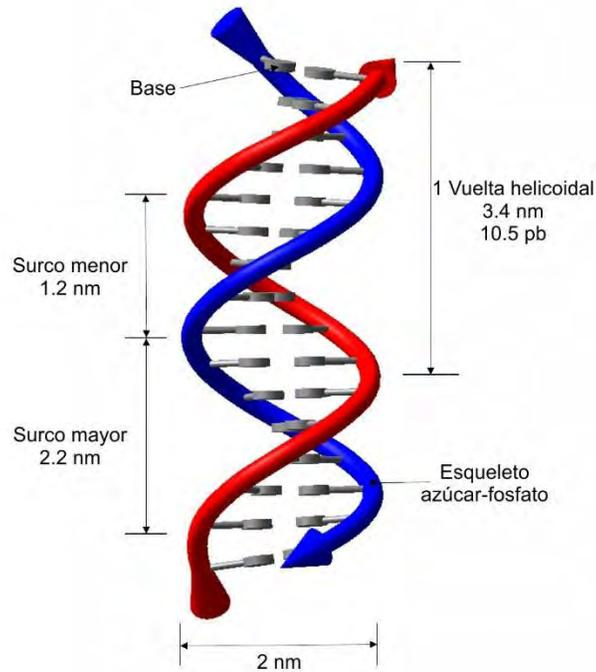


Figura 8. Representación de la doble hélice del ADN y sus principales características.

2.4. ADN COMO MATERIAL DE CONSTRUCCIÓN

Los métodos de nanofabricación pueden clasificarse en dos grupos antagónicos: “top-down” y “bottom-up” [26]. El método “top-down” se enfoca en una especie de grabado en la superficie fotosensible de una muestra por medio de un haz energético de fotones, usualmente en la región UV, o partículas, usualmente electrones, para lograr una estructura lo más pequeña posible. Un ejemplo de este método es el proceso de litografía en la fabricación de circuitos integrados [27]. Aunque los avances logrados por esta técnica han sido económicamente provechosos presenta limitantes físicas. Por ejemplo, las técnicas basadas en “top down” usualmente requieren manipular la materia bajo condiciones especiales como temperaturas criogénicas o ultra alto vacío; por otro lado, se está llegando al límite físico de tamaño mínimo.

En contraste, el método “bottom-up” se basa en la construcción de nanoestructuras idealmente átomo por átomo o molécula por molécula; semejante a como se construye una casa, ladrillo por ladrillo. Por tanto, se han desarrollado dentro de la técnica “bottom-up” métodos alternos como el autoensamble inspirado en los sistemas biológicos. La estructura del ADN por sí sola ejemplifica un excelente sistema de autoensamble con precisión nanométrica, gracias al reconocimiento molecular entre sus bases [28]. El aprovechamiento de estas peculiaridades del ADN ha permitido la creación de diversos arreglos periódicos en dos y tres dimensiones, e inclusive objetos de estructuras complejas como una “carita feliz” [29]. En esta sección se describen los principios fundamentales ideados por diversos investigadores para desarrollar una diversidad de nanoestructuras de ADN, generando un nuevo campo en la investigación conocido como nanotecnología basada en ADN.

2.4.1 LA UNIÓN HOLLIDAY Y EL ADN COMO LADRILLO Y MEZCLA

La unión Holliday o intercambio cruzado es un fenómeno que ocurre en la naturaleza durante la recombinación genética homóloga, como la meiosis. Como el nombre lo indica se trata de dos dobles hélices de ADN cuya secuencia de nucleótidos es igual. Este modelo fue propuesto por el biólogo molecular Robin Holliday en 1962 para explicar el mecanismo de recombinación genética. La unión Holliday consiste en una estructura ramificada de cuatro cadenas sencillas de ADN que forman entrelazados helicoidales. Esta unión tiene la característica de ser móvil ya que tiene un punto ramal que se puede trasladar a lo largo de toda la cadena de ADN. A esto se le llama una migración ramal [30] y se esquematiza en la figura 9.a.

En 1982, el Prof. Nadrian Seeman, experto en cristalografía, buscaba hacer arreglos periódicos con macromoléculas para poder analizarlas usando difracción de rayos-X [31]. Al tener tantos inconvenientes para generar dichos arreglos periódicos, se concentró en la búsqueda de métodos no-convencionales como una solución alternativa. Así fue como, el Prof. Seeman al centrar su atención en las uniones Holliday, se percató que si lograba sintetizar cadenas sencillas de ADN que carecieran de simetría; es decir, que no tuvieran un punto ramal, podría generar cruces entre las cuatro cadenas y que fueran fijas (figura 9.b) [32].

Aunado a esta estructura rígida, el Prof. Seeman agregó una herramienta utilizada en ingeniería genética llamada “extremos pegajosos” (“sticky ends” en inglés). El concepto de extremo pegajoso consiste en extender de cuatro o cinco bases no apareadas distintas en cada extremo de una cadena de ADN de manera tal que al auto-ensamblarse por reconocimiento Watson-Crick se unan a otra cadena de ADN con otras cuatro o cinco bases complementarias a la primera, y así sucesivamente. Esto permite incluso la formación de arreglos periódicos de redes de ADN, como se observa en las (figuras 9.c, 9.d) [33].

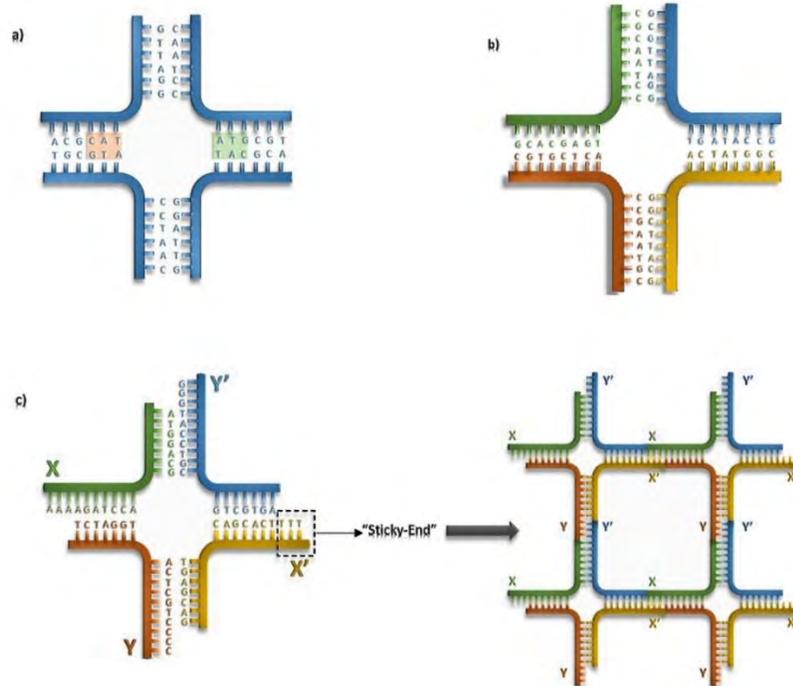


Figura 9. a) Unión Holliday y el punto ramal que le confiere movilidad. b) Cuatro cadenas de ADN sintéticas sin punto ramal por lo que son inmóviles c) Extremos pegajosos, con secuencia complementaria a otro extremo pegajosos, añadidos a una cadena de cada extremo. d) Arreglo periódico de ADN.

No conforme con esto, el Prof. Seeman, inspirado por los grabados del artista M. C. Escher, ideó uniones de cuatro hasta doce brazos o ramales de ADN, ver figura 10, para crear arreglos periódicos en dos dimensiones [34]. No solo diseñó y sintetizó redes periódicas cuadradas y rectangulares sino, además, estructuras en tres dimensiones como cubos, octaedros, tetraedros, etc. [35-38]. Desafortunadamente, estas uniones Holliday modificadas de múltiples brazos con extremos pegajosos han demostrado ser demasiado flexibles e inestables para generar redes a gran escala [39].

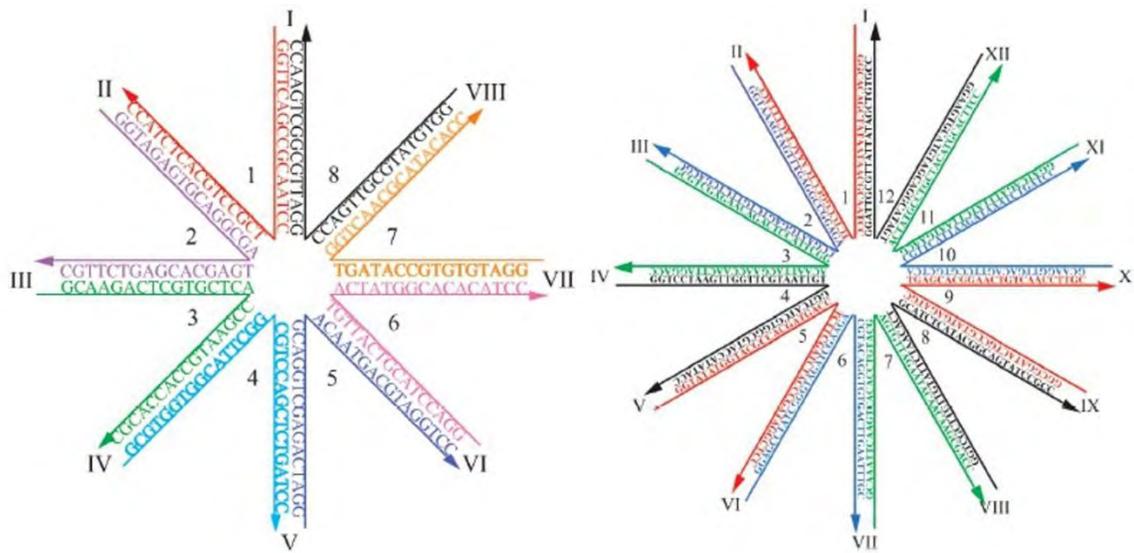


Figura 10. Estructura de ocho y doce brazos de ADN [34].

La generación de arreglos periódicos extensos de ADN requiere de patrones que sean rígidos para formar estructuras estables. Por tanto, el Prof. Seeman y colaboradores diseñaron el modelo conocido como doble entrecruzamiento (DX) [40] que consiste en dos hélices de ADN vecinas que se enlazan por el intercambio de una de sus cadenas. Un entrecruzamiento se puede dar cuando dos átomos de fósforo (P) de hélices contiguas se alinean, esto es similar a lo que sucede en la unión Holliday como se muestra en la figura 11 [41].

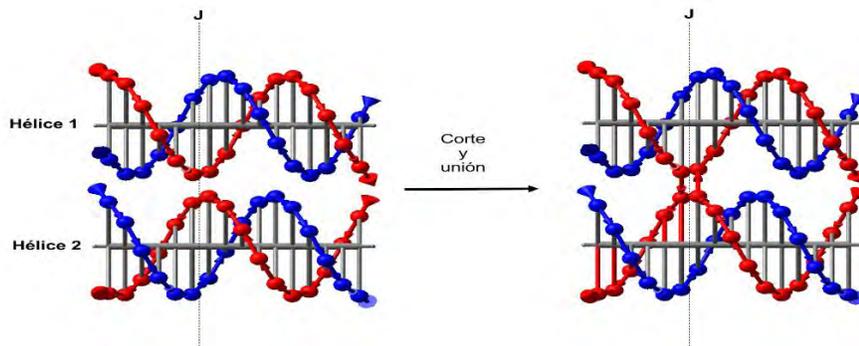


Figura 11. Formación de un entrecruzamiento entre dos hélices. Las esferas rojas y azules representan los átomos de fósforo tal que los dos colores indican dos cadenas sencillas complementarias.

Se han estudiado cinco posibles combinaciones de este tipo de entrecruzamientos y están definidos por los acrónimos DAE, DAO, DPE, DPOW y DPON (figura 12). Los acrónimos denotan lo siguiente: la primera letra resalta que se trata de un doble entrecruzamiento (D), la segunda letra indica la orientación entre las hélices vecinas ya sea paralela (P) o antiparalela (A). Una tercera letra dice el número de medias vueltas que hay entre puntos de cruce, ya sea par o impar (E u O, en inglés) y, por último, solo aquellas de orientación paralela y número impar (DPO) pueden clasificarse por el exceso de menor o mayor surco de separación (N o W), por sus nombres en inglés) [40]. En este trabajo de tesis solo se describirán a detalle los isómeros DAE y DAO, ya que son los más estables y, por lo tanto, más convenientes para la construcción de nanoestructuras basadas en ADN.

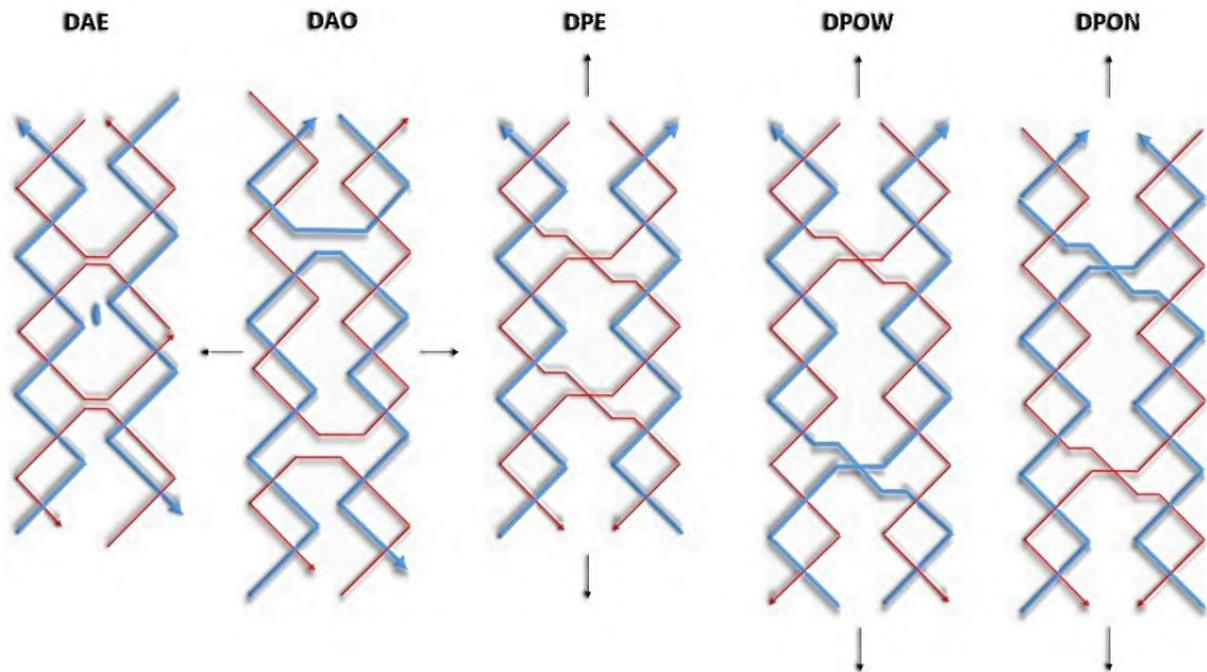


Figura 12. Se esquematizan los cinco isómeros, las flechas negras indican la simetría de las cadenas y las flechas en rojas y azul indican la orientación 3'.

Un isómero DAE indica que la distancia óptima entre dos entrecruzamientos debe ser de 21 pb. Si tomáramos que una vuelta helicoidal completa corresponde a 10.5 pb, entonces dos vueltas helicoidales son 21 pb. Por tanto, dos vueltas helicoidales completas corresponden a cuatro medias vueltas y cuatro es un número par, de ahí su acrónimo (E, por “even” en inglés). Este DX une las cadenas externas de las dobles hélices, mientras que el isómero DAO las cadenas internas, con un espaciamiento de 16 pb, corresponden a tres medias vueltas helicoidales, que es un número impar acrónimo O (por “odd” en inglés) [42]. Nuevas y más estables estructuras se han sintetizado utilizando estos isómeros, algunas de ellas se muestran en la figura 13 [43,44].

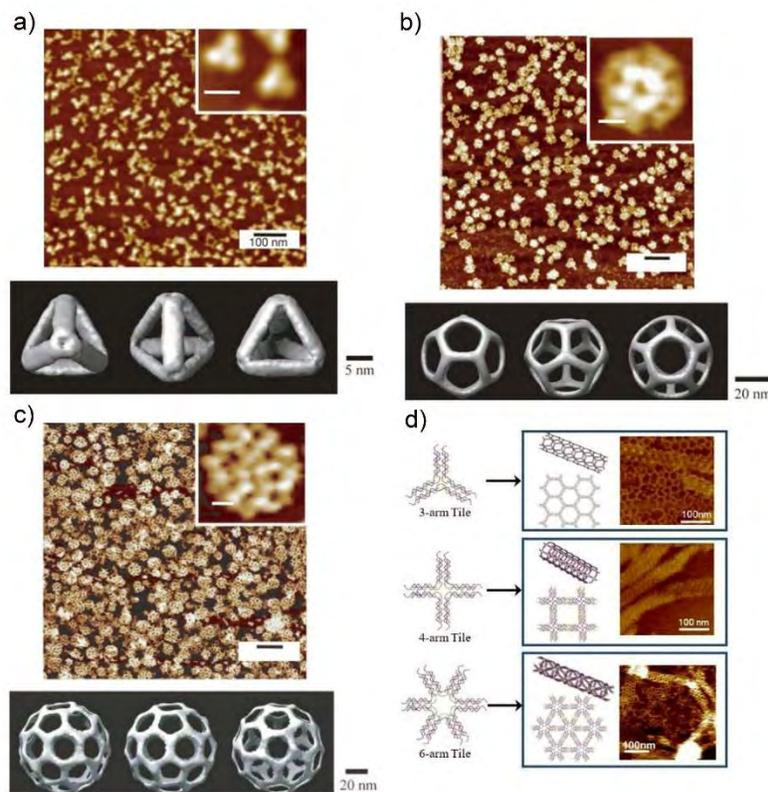


Figura 13. Imágenes de AFM de: a) un tetraedro, b) un dodecaedro, c) un fullereno y d) nanotubos con geometrías de tres, cuatro y cinco brazos. Imágenes reconstruidas con la microscopía cryo-TEM se incluyen en a), b) y c).

2.4.2 ORIGAMI DE ADN

A pesar del gran éxito de la propuesta del Prof. Seeman y otros investigadores de crear redes periódicas extensas u objetos finitos en tres dimensiones, ésta presenta ciertas desventajas. Por ejemplo, la formación de estas grandes estructuras requiere de un control estequiométrico preciso de los distintos oligos que las forman, además de purificaciones continuas. Estos errores inconvenientes y procesos de síntesis largos y tediosos han provocado la búsqueda de métodos alternos que sean más sencillos, efectivos y rápidos en las síntesis de nanoestructuras basadas en ADN [45].

En 2006, el Prof. Paul Rothemund hizo una contribución notable en el avance de nuevos métodos para la construcción de objetos con base de ADN al desarrollar un procedimiento novedoso basado en el uso de un andamio (scaffold) de un bacteriófago muy conocido y estudiado en Biología Molecular. El Prof. Rothemund llamó a este método origami de ADN [29]. En general, origami se refiere al arte japonés de doblar y plegar una hoja de papel que dé como resultado diferentes objetos. Extrapolando esta idea, origami de ADN se basa en el uso de una cadena sencilla de ADN (scaffold) que se pliega por la intervención de diversos oligonucleótidos complementarios sintéticos, de longitud corta y cadena sencilla, a los cuales se refieren como grapas. Cada grapa tiene una secuencia única y posición específica en el scaffold determinada a partir del diseño de la nanoestructura, por lo que estas cadenas cortas determinan de manera precisa la forma y tamaño de la estructura final. El Prof. Rothemund comprobó la versatilidad de su método al planear, diseñar y sintetizar nanoestructuras basadas en ADN

teniendo diferentes formas usando como andamio el plásmido del fago M13mp18, actualmente el más utilizado [29], como se observa en la figura 14.

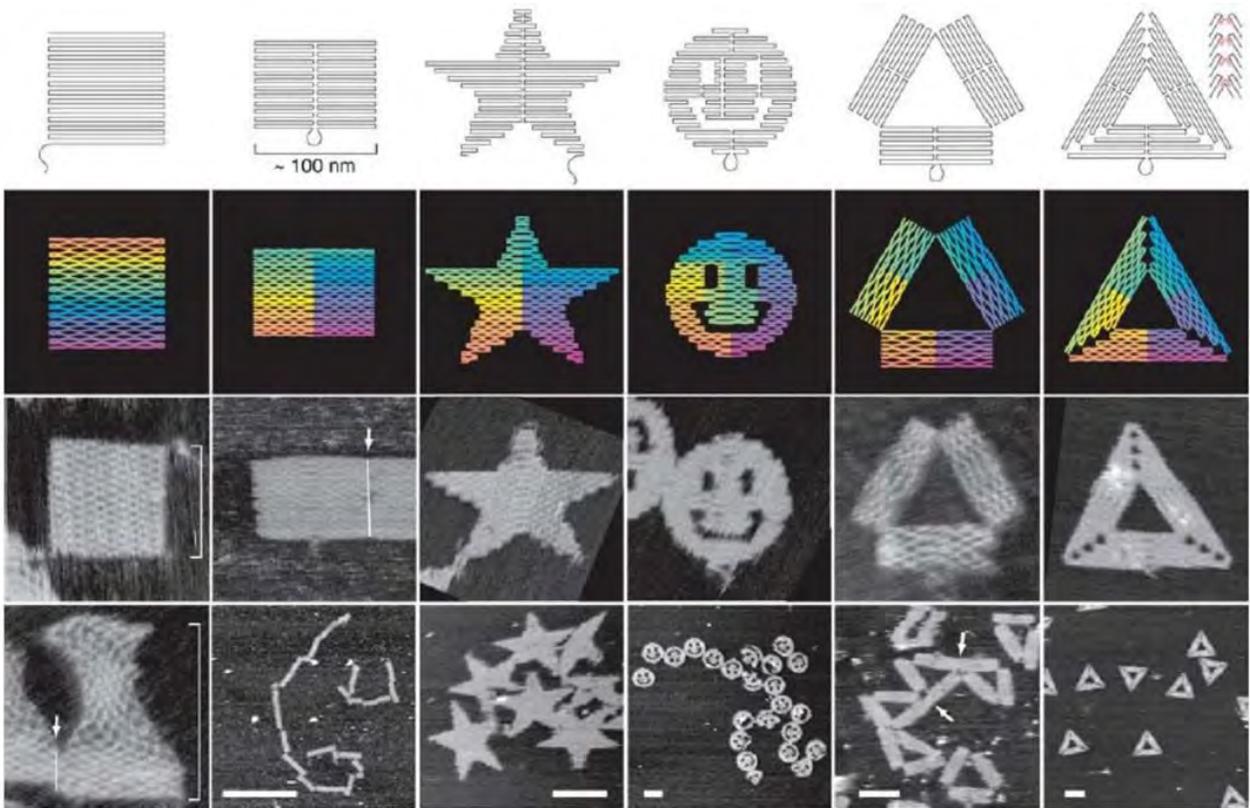


Figura 14. Primeras estructuras sintetizadas con el método de origami de ADN [46].

Una de las principales razones por las cuales esta técnica ha generado un gran impacto y optimismo se debe a su simplicidad y eficacia, ya que se obtienen resultados experimentales en menos de 2 horas con un rendimiento alto. A su vez, el cuidado en la relación de concentración molar entre el andamio y las grapas es menos exigente que en otras técnicas ya que las grapas pueden ser añadidas en exceso sin afectar la síntesis y el proceso de purificación es más simple y económico.

2.4.2.1 PRINCIPIOS DE DISEÑO DE ORIGAMI DE ADN

Los principales pasos para el diseño de cualquier nanoestructura basada en la técnica de origami de ADN [46] se resumen a continuación:

- 1) Se debe inicialmente bosquejar en papel el contorno o perímetro de la figura que se desea crear. Después, la superficie de la imagen se cubre completamente con tantas filas horizontales como sea necesario de un número entero de doble hélices representadas por cilindros. Este cilindro simboliza una vuelta helicoidal de ADN con las características ya descritas de 10.67 bases correspondiendo a una longitud de 3.6 nm para una vuelta completa y un diámetro de 2 nm. Para asegurar la unión entre las dobles hélices que se encuentren en filas adyacentes, se señalan todos los sitios potenciales para un entrecruzamiento; es decir, cada 1.5 vueltas de doble hélice o 16 pares de bases (DAO). Esto se muestra en figura 15 de manera tal que las pequeñas líneas en azul simbolizan los entrecruzamientos.

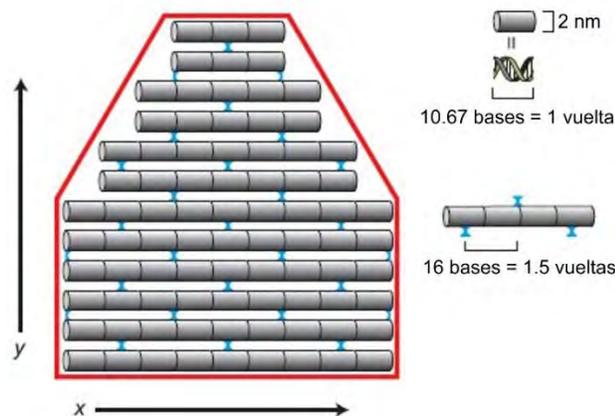


Figura 15. Esquema del primer paso en el diseño de una nanoestructura usando origami de ADN.

2) Después se esquematiza la manera en que el andamio o scaffold será plegado. Para este propósito se traza una línea o ruta cuyo trayecto debe terminar donde inicie el andamio, que es una cadena sencilla circular de ADN. Ésta recorre una sola vez sin entrelazarse a lo largo de todos los cilindros que conforman la nanoestructura, este recorrido se muestra como una línea gruesa en la figura 16. Al hacer este trazo, el scaffold genera una sección llamada costura, y es el punto en el cual el andamio cambia de dirección y no se cruza, la costura se muestra con las marcas **X** en la parte central de la figura 16.



Figura 16. Bosquejo del segundo paso en el diseño de una nanoestructura usando origami de ADN mostrando la manera en que el andamio se pliega.

3) Posteriormente se diseñan el conjunto de cadenas complementarias al andamio o grapas, mostradas como pequeños dobleces de varios colores en la figura 17, las grapas serán las encargadas de hacer los entrecruzamientos marcados en azul en la figura 15.

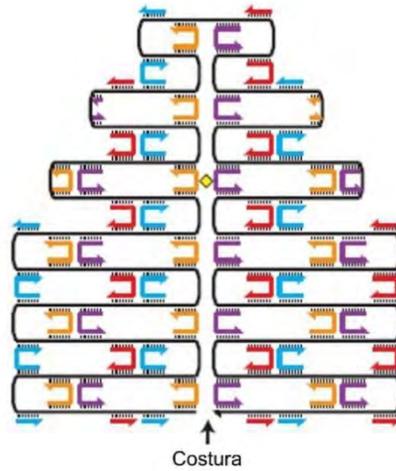


Figura 17. Esquema del tercer paso en el diseño de una nanoestructura usando origami de ADN mostrando un posible arreglo de las grapas complementarias.

4) Luego, tomando como referencia las grapas sugeridas en la figura 17, se modifican la longitud de éstas y la manera en que ajusten los entrecruzamientos para minimizar la tensión en la nanoestructura, como se observa en la Figura 18. Es importante señalar que diferentes arreglos de grapas pueden generar la misma estructura, pero no conferir la misma estabilidad.

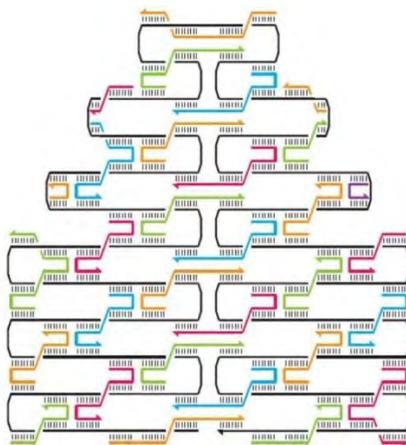


Figura 18. Bosquejo del cuarto paso en el diseño de una nanoestructura usando origami de ADN y mostrando el arreglo óptimo de las grapas que confieran mayor estabilidad a la nanoestructura de ADN.

2.4.2.2 USO DE LOS PROGRAMAS CanDo Y caDNAno EN EL DISEÑO DE NANOESTRUCTURAS DE ADN

Siguiendo los pasos anteriormente descritos, los primeros diseños de origami de ADN se realizaron a mano o con la ayuda de algunos programas no especializados en la materia, lo que se tornaba en una tarea complicada, fastidiosa y con alta probabilidad de errores. Por tanto, se han desarrollado distintas herramientas computacionales para facilitar y mejorar el diseño de las nanoestructuras de ADN. Algunas de estas herramientas siguen vigentes mientras muchas otras están casi en desuso [47]. Actualmente, el software más utilizado es caDNAno (computer-aided design for DNA nanostructures, su nombre en inglés). Este programa en su comienzo tenía como objetivo original diseñar estructuras de ADN en tres dimensiones basado en el método de origami de ADN, pero poco tiempo después adicionó la plataforma para el diseño de estructuras en dos dimensiones [48]. Para nanoestructuras en 2D utiliza la interfaz “square lattice” la cual se basa en el DAO, mientras que la interfaz para 3D se conoce como “honeycomb” y se basa en el DAE.

CaDNAno condensa todas las reglas o principios del método de origami de ADN ya descrito para el diseño óptimo de cualquier nanoestructura. Dependiendo del diseño, caDNAno sugiere la colocación de las grapas. Además, da libertad al diseñador para que éste ajuste las grapas y el andamio según su criterio. Por último, caDNAno genera en Excel el listado de las secuencias complementarias al andamio de cada una de las grapas [49].

Otra herramienta computacional complementaria a caDNAno, es CanDo (Computer-aided engineering for DNA origami.). Este programa tiene el objetivo de modelar y predecir la estabilidad de las nanoestructuras de origami de ADN partiendo de los documentos generados por caDNAno. De esta manera CanDo prevé el mejor desempeño termodinámico posible en la síntesis de una nanoestructura. CanDo utiliza un método de elemento finito para predecir la estructura de ADN cuyos parámetros de estabilidad mecánica serían los obtenidos al llevar a cabo mediciones experimentales. La doble cadena de ADN se representa como una barra homogénea elástica y se simula la deformación que sufriría la estructura al aplicarle fuerzas externas para doblar, curvar y estirar. El usuario obtiene imágenes y videos en 3D que representan la deformación axial y lateral en ambas direcciones del plano de la estructura al estar expuesta a esfuerzos externos. También, se adiciona un mapa de colores que representa las fluctuaciones térmicas inducidas, lo que también indica la flexibilidad de la nanoestructura. Actualmente CanDo no modela repulsiones electrostáticas entre las hélices ni considera el medio fisiológico, buffer, en el cual se encuentre inmersa la nanoestructura [50].

2.5 RESONANCIA PLÁSMONICA SUPERFICIAL

La plasmónica es una nueva rama de la fotónica que estudia la interacción que resulta de ondas electromagnéticas en la región visible del espectro y metales nobles. La plasmónica ha adquirido relevancia debido a sus potenciales aplicaciones en miniaturizar equipos ópticos, incluyendo el equivalente a un láser, sensores y circuitos fotónicos; así como ayuda en diagnósticos médicos y terapéuticos. Los comportamientos que se observan son generados por la presencia de electrones libres en la banda de conducción de la superficie de las nanopartículas metálicas. Se asocia un

cuanto de energía, llamado plasmón, a la absorción de los fotones del haz de luz incidente, por los electrones libres produciendo una excitación colectiva de densidad de carga. El modelo que explica esta oscilación en nanoestructuras es llamado un plasmón de superficie localizado (LSP, por sus siglas en inglés), y es el resultado del confinamiento de un plasmón de superficie en una nanopartícula metálica con tamaño menor que la longitud de la onda electromagnética utilizada para excitar el plasmón [51].

La resonancia del plasmón de superficie (LSP) tiene la capacidad de absorber determinadas frecuencias de la luz incidente y de transmitir las frecuencias no absorbidas que se asocian a un determinado color [13]. Nanopartículas de metales nobles, como el oro y la plata, la resonancia es máxima en la región visible del espectro electromagnético. También el tamaño de las nanopartículas influye en la absorción de la longitud de onda de la radiación incidente. En una dispersión coloidal de nanopartículas de oro de tamaño $d \leq 30$ nm, absorben la luz de la zona visible del espectro electromagnético de color azul-verde ($\lambda = 450$ nm) y producen una luz reflejada de color rojo ($\lambda \approx 700$ nm), tomando la disolución coloidal un color rojo intenso [52]. Las nanopartículas metálicas también muestran el efecto corrimiento-al-rojo, incremento de la longitud de onda, en el máximo de luz dispersada, resonancia, cuando el tamaño de las nanopartículas aumenta. Por ejemplo, la posición del pico de la intensidad de luz dispersada por nanoesferas de plata aumenta de 424 a 490 nm cuando el tamaño varía de 20 a 80 nm, respectivamente [53].

La fabricación por medio del método “top-down” de estructuras plasmónicas con respuesta óptica controlada en el rango espectral visible sigue siendo un reto, ya que los procesos de

fotolitografía están limitados en la resolución y la habilidad de generar arquitecturas en tres dimensiones. El método de origami de ADN facilitaría la síntesis de estructuras plasmónicas en dos y tres dimensiones en las cuales se dispongan arreglos pre-diseñados de nanopartículas con precisión nanométrica [54]. La funcionalización controlada se logra a partir de cadenas sencillas de ADN modificadas que se conjugan a nanopartículas metálicas, programadas para enlazarse a lugares específicos por reconocimiento molecular y generar estructuras bien definidas. La novedosa estructura de origami con forma triangular propuesta en este trabajo, permite la colocación de nanopartículas de oro en los vértices internos y externos, a una distancia máxima de aproximadamente 70 nm aproximadamente. La distancia y el tamaño de las nanopartículas se puede variar de una manera controlada para estudiar las interacciones plasmónicas entre ellas; y así, determinar las condiciones que generen la máxima interferencia constructiva del campo eléctrico generados por ellas o “hot spot” en inglés.

CAPÍTULO 3: TÉCNICAS EXPERIMENTALES

La técnica experimental es una manera específica de recolectar y guardar datos manteniendo control de algunos parámetros. Es decir, los diversos procedimientos y tareas experimentales que permiten obtener los datos que serán posteriormente analizados e interpretados. Las técnicas que se expondrán en este trabajo de investigación son las *ad hoc* para corroborar la forma y dimensiones de las nanoestructuras de ADN con forma triangular que han sido sintetizadas. Desde los inicios de la Nanotecnología basada en ADN, la formación de las primeras estructuras de ADN sintetizadas sólo se podía comprobar a través de la técnica de electroforesis, la cual se describe en la sección 3.1 de este capítulo. Actualmente, además de servir como un método práctico de filtración en el tratamiento de las AuNPs y del mismo origami, se sigue utilizando como una manera adicional de verificación al comparar una nanoestructura con el andamio. Así mismo, durante la síntesis de origamis de ADN se requiere de control en la concentración molar entre los distintos componentes que intervienen en la síntesis; como son, las cadenas sencillas de ADN y AuNPs. Las concentraciones molares se pueden determinar con un espectrofotómetro de UV-vis exclusivo para volúmenes del orden de microlitros. El equipo comercial llamado NanoDrop© cumple dichos requisitos y se describen en la sección 3.2. En relación al estudio morfológico, hace sólo 30 años se desarrolló una novedosa y revolucionaria técnica llamada microscopía de fuerza atómica (AFM) que posibilitó la obtención de imágenes a escala nanométrica de estructuras de ADN y determinación de sus dimensiones, los principios de dicha técnica se describen en la sección 3.3.

3.1 ELECTROFORESIS

Desde tiempos muy remotos, la curiosidad del hombre lo ha llevado a desarrollar técnicas que le permitan analizar los componentes de cualquier mezcla y/o sustancia. La ciencia de hoy en día ha desarrollado una variedad de técnicas simples y complejas para lograr dicho objetivo como son: filtración, destilación, precipitación, etc. Sin embargo, al avanzar los conocimientos y la complejidad de los sistemas a estudiar, como son los biológicos, han requerido del desarrollo de nuevas tecnologías con mayor alcance. Un ejemplo de esto es la electroforesis que en macroescala se aplica a una diversidad de problemas de separación analítica difíciles como aniones y cationes inorgánicos, aminoácidos, fármacos, carbohidratos, péptidos, ácidos nucleicos, etc. [55].

Tiselius es considerado como uno de los pioneros en el desarrollo de la técnica de electroforesis para el estudio de los componentes del suero sanguíneo [56], lo que le mereció el premio Nobel en 1948. La electroforesis puede ser definida como la migración de iones en un medio gelificado inmerso en un “buffer” bajo la presencia de un campo eléctrico. Como es bien sabido, las biomoléculas pueden estar cargadas ya sea positiva o negativamente y en una solución la corriente eléctrica fluye entre los electrodos a través del movimiento de los iones [57]. El electrodo positivo (ánodo) atraerá los iones con carga negativa (aniones), lo mismo para el electrodo negativo (cátodo) que atraerá a los iones de carga contraria (cationes), tal como se muestra esquemáticamente en la figura 19 [58].

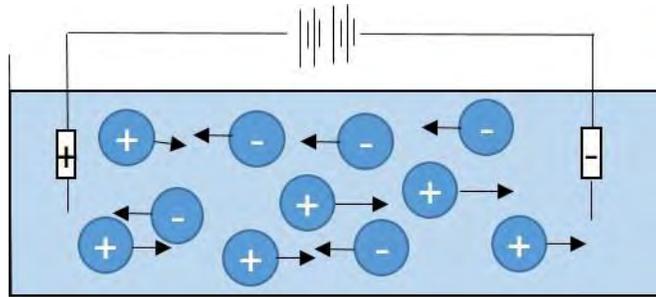


Figura 19. Movimiento de iones dentro de un campo eléctrico en electroforesis.

Una separación electroforética se lleva a cabo mediante un dispositivo que permite la generación de un campo eléctrico ya sea en un tubo estrecho o en un medio de soporte poroso y plano; por ejemplo, papel o un gel semisólido. La muestra se coloca usualmente cercana al cátodo en el interior de pequeños huecos hechos en el medio poroso [55]. El soporte idóneo es un gel semisólido o gelatinoso, compuesto por polímeros que forman una especie de malla o microporos tridimensionales a través de los cuales avanza la muestra. Los gels pueden ser de agarosa o poliacrilamida [59].

El gel o soporte es sumergido en una solución amortiguadora con alto contenido de electrolitos que permiten la transmisión de la corriente eléctrica, manteniendo el pH estable al paso de la corriente [59]. Las moléculas disueltas de la muestra a analizar se desplazan o migran en presencia de un campo eléctrico a una velocidad determinada por la porosidad que presente el gel utilizado; además, de su relación carga: masa [60].

En la técnica de electroforesis para estudiar ácidos nucleicos, comúnmente se utiliza gel horizontal de agarosa, como se muestra en la figura 20. La carga negativa natural que presenta el ADN se le confiere a la columna de fosfatos que lo conforman, lo que provoca la migración de

ácidos nucleicos hacia el ánodo. Mientras más grande o larga sea la cadena de ADN más espacio viajará a través del gel, ya que un mayor tamaño presenta mayor resistencia al movimiento [61]. Cabe mencionar que existen diferentes factores que pueden afectar la migración del ADN como son: la concentración de gel utilizado, el voltaje aplicado, el incremento de la temperatura del buffer al aplicarse el voltaje, la calidad del buffer y la muestra, etc. Por tanto, deben ser inspeccionados para obtener resultados confiables.

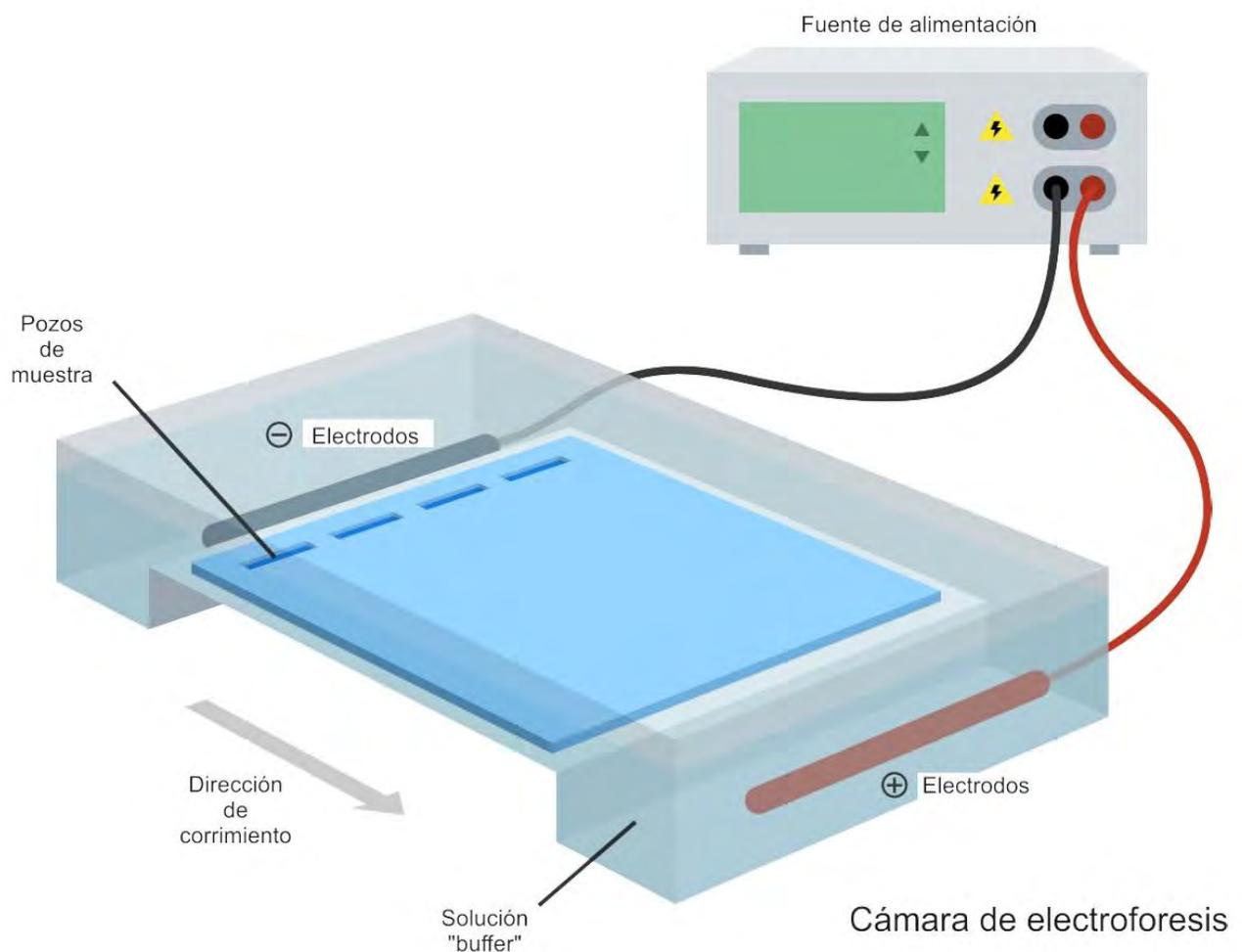


Figura 20. Cámara de electroforesis mostrando un gel horizontal de agarosa

3.2 ESPECTROSCOPIA DE UV-VIS

La espectrofotometría utiliza las interacciones de la radiación electromagnética con la materia para obtener información sobre una muestra. Se estimula normalmente la muestra de alguna manera mediante la aplicación de energía externa en forma de calor, energía eléctrica, luz, partículas o de una reacción química. Existen diferentes tipos de espectroscopia, tales como de emisión, quimioluminiscencia, fosforescencia, fluorescencia, entre otras [62]. En este proyecto de tesis se utilizó el equipo comercial NanoDrop© que se basa en el principio de funcionamiento de espectroscopia de absorción, de aquí que se describirá ésta.

La espectroscopia de absorción mide la cantidad de luz absorbida por una muestra, principalmente en la región UV/visible del espectro, como función de la longitud de onda. La luz pasa a través de un monocromador (puede ser ya sea un prisma, rejilla o incluso un filtro) para seleccionar una longitud de onda. El haz de luz de una sola longitud de onda se dice que es monocromática, lo que significa “un color”. La luz monocromática, de intensidad I_0 , incide sobre la muestra y recorre una longitud b en ella. La intensidad del haz que emerge de la muestra después de haber interactuado se le denota por I . Parte de la luz puede ser absorbida por la muestra y transfiere energía a la molécula, lo que resulta en una disminución en la intensidad de la radiación electromagnética incidente; por tanto, $I \leq I_0$ [63]. La figura 21 esquematiza la interacción de luz en la región UV/visible en una muestra. Por otro lado, la transmitancia (T) es la fracción de la radiación incidente que pasa a través de la muestra, usualmente en solución, que se expresa como un porcentaje [64].

$$T = \frac{I}{I_0}$$

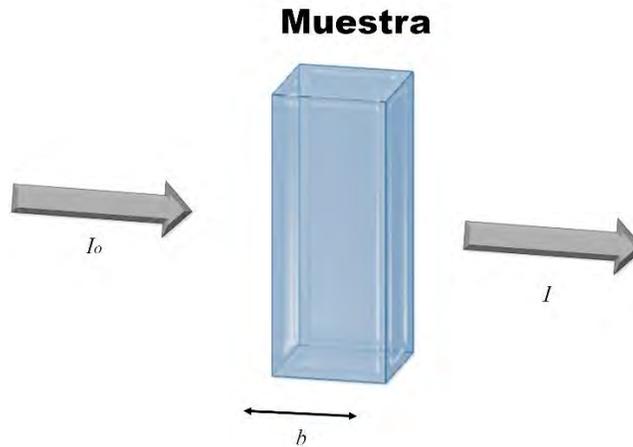


Figura 21. Atenuación de un haz de radiación electromagnética, $I \leq I_0$, por una disolución.

A su vez, la transmitancia se relaciona con la absorbancia, la cual indica la cantidad de luz que fue retenida (I) por la muestra (Olsen , 1990). La absorbancia A se define como:

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = -\log T$$

La ley de Beer-Lambert permite determinar que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de las especies absorbentes, c , y a la longitud de la trayectoria, b , del medio absorbente y una constante de proporcionalidad, ϵ , llamada absorvitudad molar [65]. Dicha relación se obtiene de la siguiente manera:

$$I = I_0 e^{-\alpha x}$$

$$\log\left(\frac{I}{I_0}\right) = \log(e^{-\alpha x})$$

$$-\log\left(\frac{I_0}{I}\right) = -\alpha x$$

$$A = \alpha x = \epsilon cb$$

donde:

$\alpha x = \epsilon cb$, es la absorbancia

En la expresión anterior, la concentración c , tiene unidades de moles por litro, b en cm y ϵ maneja unidades de $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. El NanoDrop[®] es un equipo que se basa en la espectrofotometría de absorción para medir pequeños volúmenes de muestra, 0.5-2 μl , con gran exactitud y reproducibilidad, el equipo se muestra en la figura 22. La tensión superficial hace que se mantenga una gota de la muestra entre dos fibras ópticas. Además, el uso esta tecnología permite abarcar una región amplia del UV/vis que va desde los 190 a 840 nm. Por tanto, tiene la capacidad de medir muestras muy concentradas sin necesidad de diluirlas. Esta característica lo hace idóneo para medir la concentración de ácidos nucleicos y determinar su grado de pureza [66].



Figura 22. Imagen del equipo NanoDrop[®], Thermo Scientific, Sistema de microlitro y cubeta.

3.3 MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA

Desde la invención del microscopio de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés) en 1986 por G. Binnig y colaboradores en la Universidad de Stanford [67], se ha convertido en una técnica de análisis importante. Esta técnica permite “ver y medir” dimensiones de superficies desde una escala micro- hasta nanométrica, no importando si el material es duro o suave, sintético o natural. La muestra generalmente se analiza en aire en condiciones estándar de presión y temperatura; aunque en algunos casos la muestra puede estar inmersa en algún medio líquido y otras condiciones.

El AFM se diferencia de otros microscopios ya que su principio de funcionamiento no se basa en obtener imágenes al enfocar algún haz de electrones o luz sobre la superficie de interés, como lo hace un microscopio óptico o electrónico [68]. El AFM “siente” físicamente la superficie de la muestra por medio de una punta aguda que mide las diferentes alturas y el tipo de topografía que presenta. Se podría decir que es un “microscopio ciego” ya que es semejante al sentido del tacto para “sentir” la fuerza entre los átomos que interactúan entre sí: aquellos de la superficie de la muestra y los de la punta. De esta forma el AFM crea una imagen de la topografía local de una muestra por medio de un arreglo experimental como el mostrado en la figura 23 [69].

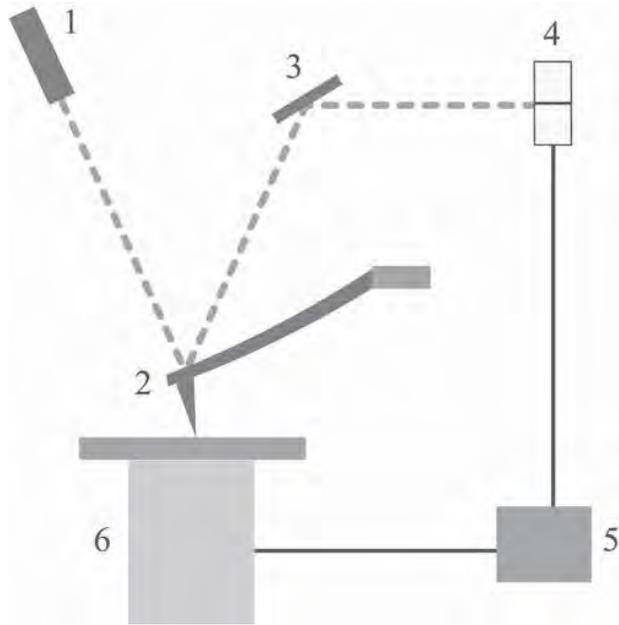


Figura 23. Diagrama esquemático del AFM. 1) Diodo láser, 2) "Cantilever", 3) espejo, 4) fotodetector sensible a la posición, 5) scanner y 6) piezoeléctrico con muestra [68].

La muestra se coloca sobre un cilindro hecho de un material piezoeléctrico que dependiendo de en qué parte del cilindro y cuánto voltaje se aplique se produce una contracción o expansión en dirección perpendicular a la dirección del campo eléctrico aplicado en el piezoeléctrico. Por ejemplo, cuatro electrodos colocados paralelos al eje cilíndrico del piezoeléctrico y opuestos diametralmente producen un movimiento controlado sobre el plano de la muestra. Todo esto por medio de un controlador electrónico que de manera cíclica genera que la punta "barra" sobre una región determinada de la muestra y explore o adquiera una imagen. El área de "barrido" puede variar dependiendo del tipo de piezoeléctrico que se use para ampliar o reducir dicha área. También existe otra configuración de escáner en la cual la muestra permanece inmóvil y el cantiléver se mueve a través de la superficie controlado por el mismo material piezoeléctrico [70].

La punta usualmente está hecha de silicio o nitruro de silicio con un radio de curvatura, r , de 30 a 50 nm. Incluso existen puntas comerciales con un radio de curvatura menor a 1 nm. Cuando una punta se acerca a la muestra se pueden producir diferentes tipos de interacciones como fuerzas eléctricas, magnéticas y mecánicas [71]. Se podría suponer que mientras más aguda sea la punta mejores imágenes se obtienen. Sin embargo, esto no ocurre en general ya que todo depende del área de contacto en la muestra debido a una punta muy aguda, lo que produce un mayor desgaste de la punta y a la vez dañar la muestra. La punta puede tener forma piramidal de base cuadrada o cono-cilíndrica, como se ve en las figuras 24.A y 24.B [71].

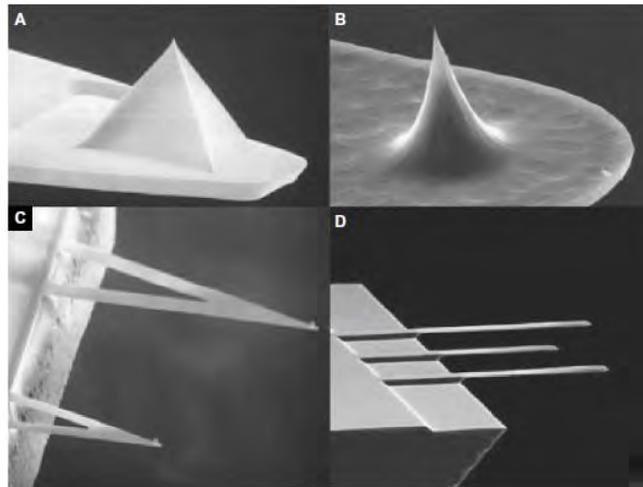


Figura 24. A) Punta piramidal con base cuadrada, B) punta cónica aguda, C) cantilever de forma “V” y D) cantilever de barra rectangular [72].

Las fuerzas entre la punta y la muestra se determinan por la respuesta mecánica del cantiléver, el cual soporta en uno de sus extremos a la pequeña punta. El cantilever está unido a un pequeño chip, usualmente de forma rectangular, que permite una fácil colocación y posicionamiento en el

portacantilever del AFM. Existen dos diseños esenciales en los cantiléver, la forma “V” o barra (figura 24.C y 24.D) [72]. El cantiléver puede vibrar libremente ya que es flexible y sujeto en sus extremos al chip. Este movimiento se mide al incidir y reflejarse el haz de un láser sobre la cara anterior del cantiléver y dirigirse hacia un fotodetector dividido en cuatro cuadrantes que mide la deflexión vertical y horizontal del láser en el AFM, este proceso se exhibe en la figura 25. El cantiléver puede variar su frecuencia de resonancia, alrededor de su valor de resonancia natural dependiendo del medio en el que oscile, aire o fluido [72].

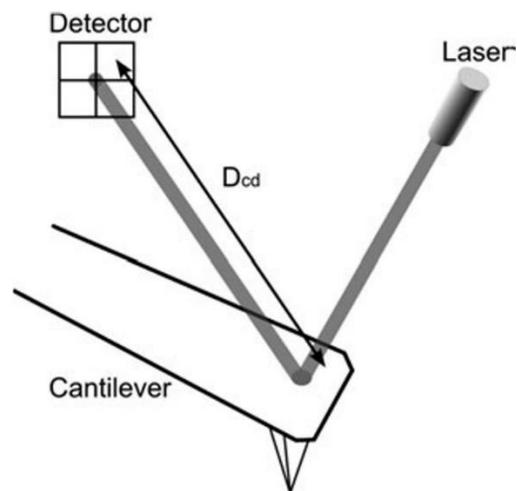


Figura 25. Esquematación del principio de funcionamiento del AFM [70].

Existen dos modos generales de observación que puede operar el AFM, el modo contacto y el modo “tapping”. El último (modo “tapping”) se distingue del primero ya que el cantiléver se hace vibrar por medio de un voltaje AC externo. El modo contacto fue el primero en ser desarrollado, además de ser la base para las otras diferentes modalidades. Este consiste en solo acercar hasta que la punta “toque” la superficie de la muestra y medir las deflexiones, como se muestra en la figura 25. El modo contacto es el más usual cuando se trata de muestras sólidas

duras o superficies casi planas, además de ser la operación más sencilla. Sin embargo, cuando se tratan de muestras suaves y delicadas, como lo es el ADN, pueden ser fácilmente dañadas y alteradas. Además, las fuerzas laterales que ejerce la punta pueden rasgar y deteriorar la muestra. Afortunadamente, la técnica de modo “tapping” fue desarrollada para resolver estos problemas.

El modo “tapping” o contacto intermitente permite la oscilación del cantiléver al acercarse la punta a la muestra y barrer su superficie de manera tal que el tiempo de contacto es del orden de milésimos de segundo o menos. La amplitud de la oscilación de la punta se va modificando dependiendo de la morfología superficial de la muestra. La combinación de modo “tapping” con una celda de fluido es esencial para visualizar muestras que se encuentran inmersas en soluciones líquidas [73]. Ésta consiste en una celda especial de cristal que encierra al cantiléver con la punta y la muestra, como se muestra en la figura 26. El análisis morfológico de las nanoestructuras de ADN en esta tesis se realizó usando un AFM en el modo “tapping” con una celda de fluido para así aislar las muestras del ambiente y mantenerlas en el “buffer” apropiadas al observarlas.



Figura 26. Celda especial de AFM para muestras en fluido.

CAPÍTULO 4: METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En esta sección se describen los programas usados en el diseño y los protocolos que se siguieron para la formación efectiva, síntesis, de la nanoestructura de ADN con forma triangular. Además, se detalla el tratamiento que se dio a las nanopartículas de oro para que estas se puedan enlazar a los sitios designados y el protocolo que se siguió para comprobar la formación de la nanoestructura antes y después de ser funcionalizadas.

4.1 DISEÑO DEL TRIANGULO DE ADN

El proceso para la síntesis de una nanoestructura basada en ADN comienza por el bosquejo o diseño de dicha figura. Hoy en día esta tarea se facilita gracias al desarrollo de una diversidad de softwares tales como caDNano [48] y CanDo [50]. El primero permite el desarrollo de cualquier tipo de esbozo hasta el diseño preconcebido mientras que el segundo predice la estabilidad de la nanoestructura a través de un análisis numérico finito, como se describe en el capítulo 2.4.2.2. A continuación, se describen de manera breve los principales pasos por medio de caDNano para el diseño de una nanoestructura con forma de triángulo del presente trabajo, los cuales están establecidos en la literatura por P. Rothmund [46].

- Una vez familiarizado con la interfaz del programa caDNano, se selecciona la red o enrejado. El software ofrece dos tipos de enrejado, como se describe en la sección 2.4.2.2, “honeycomb” para el diseño de nanoestructuras en tres dimensiones y “square

lattice” para nanoestructuras planas de dos dimensiones. En el caso del triángulo, la segunda opción es la más adecuada.

- Hecho lo anterior, se bosqueja el contorno o perímetro del triángulo basado en el andamio como esta descrito en el capítulo de Marco Teórico (2.4.2.1). La longitud del andamio se ajusta al número de nucleótidos (nt) que componen la tercera parte del plásmido M13mp18, y que corresponden a 2404 nt. Esto se logró al utilizar el comando llamado “skip” que ofrece el programa y que permite dejar libre un par de bases libres además de conferir distensión en la estructura. En el apéndice A se muestra el bosquejo del triángulo.
- Después de tener la periferia del triángulo, se agregan los oligonucleótidos complementarios o grapas usando el comando “autostaple”. El programa permite ajustar la longitud de dichas cadenas a preferencia del diseñador con la ayuda del comando “break”, la literatura recomienda que la longitud sea de un máximo de 40 nt y un mínimo de 16 nt [47]. Así mismo, se seleccionan de antemano los sitios convenientes para la funcionalización con nanopartículas de oro (AuNPs), el cual es el objetivo principal de esta tesis. En el apéndice B se muestra el diseño al que se le han añadido las grapas y se marcan los sitios elegidos para la funcionalización. La secuencia de enlace que se utilizó fue propuesta por Liedl y colaboradores [54] y los sitios de enlace se tomaron de acuerdo a Bokor y colaboradores [74].
- Posteriormente, ya obtenido el diseño en caDNAno que se considera como satisfactorio, se estudia la estabilidad térmica de la nanoestructura por medio de CanDo usando el archivo generado por caDNAno para obtener diferentes imágenes y videos simulando la estabilidad de la nanoestructura, con barra de fluctuaciones termodinámicas como

referencia. En caso de ser necesario, los pasos anteriores se repiten hasta lograr una nanoestructura lo más estable posible. Por supuesto, hay que recordar que CanDo solo es una aproximación basado en un método numérico. En el apéndice C se muestran las aproximaciones arrojadas por CanDo.

- Luego de obtener el diseño con las características más pertinentes y convincentes, esto depende del criterio y experiencia del diseñador, se añade la secuencia del plásmido que se utilice como andamio. CaDNAno cuenta con las secuencias predeterminadas más comunes como: M13mp18, p7308, p7560, entre otros. Aunque, también se pueden añadir secuencias externas tal es el caso del triángulo ya que se requirió ingresar de manera manual la tercera parte del bacteriófago M13mp18, denominado mini M13 (apéndice D).
- Realizar lo anterior permite exportar un documento en Excel que detalla el listado de todas las grapas con su secuencia complementaria al scaffold, así como la longitud exacta y su ubicación en el diseño (apéndice E). De esta manera se pudieron modificar aquellas grapas que se determinaron serían extendidas y ligarían a las nanopartículas de oro (Apéndice F).
- Por último, cuando se tuvo el documento de Excel listo con todas las grapas necesarias, se prosiguió con la solicitud de compra en la compañía de IDT (Integrated DNA Technologies). Algunas sugerencias extras para un diseño óptimo se describen en el apéndice G.

4.2 PREPARACIÓN DE OLIGONUCLEOTIDOS.

Es recomendable que antes de realizar la síntesis de cualquier estructura basada en origami de ADN, se cuantifique la concentración molar de cada grapa para cerciorarse que estas sean iguales o la diferencia entre ellas sea mínima. Esto con el fin de que cada oligonucleótido se encuentre en la misma proporción molar al momento de realizar la síntesis. A continuación, se enlistan los pasos que se siguieron para la preparación y medición de la concentración de los oligos:

- Se verificó que la secuencia de los oligonucleótidos solicitados a IDT cumplieran con los requisitos especificados, la compañía proporciona un documento en Excel donde se pueden analizar los siguientes datos: nombre de la grapa, secuencia, temperatura de desnaturalización, peso molecular, concentración molar o número de moles según sea el caso y coeficiente de extinción.
- En particular, las grapas del triángulo no se encontraban en solución sino en polvo. Por ende, se procedió a hidratar con agua doblemente destilada y desionizada (DDI·H₂O). El volumen de DDI·H₂O necesario para tener una concentración de 200 μM se calculó usando la fórmula de molaridad dada por:

$$M = \frac{n}{V},$$

donde:

M= molaridad (n/L)

n= número de moles

V= volumen

- Una vez que se agregó el volumen de DDI·H₂O calculado, se mezcló con un agitador vortex G560 de Scientific Industries para obtener una mezcla homogénea. Para después, usar la centrifuga Thermo Scientific Sorvall Legend XTR Centrifuge para que la solución se asiente en la parte inferior del contenedor. Las condiciones fueron 500 rpm durante 2 minutos a 20 °C.
- Después, se ratificó que la concentración de las grapas hidratadas correspondía a la calculada, de 200 μM. Ya que el volumen está en el orden de microlitros (μl), se hizo uso del equipo NanoDrop modelo 2000c de Thermo Scientific para determinar la absorbancia de cada una de las mezclas de grapas.
- Ya que se tomaron las lecturas de absorbancia de cada solución, se aplicó la Ley de Beer-Lambert, descrita en la sección 3.2, para encontrar la concentración molar de cada cadena sencilla de ADN [66]. El apéndice E y F contiene la lista de las diferentes absorbancias y concentraciones correspondientes a cada grapa.
- Como paso último, cuando se tuvo el listado de las concentraciones correspondientes, se compararon éstas para asegurar que tenían valores en un rango de 200 μM ± 30 nM. Las muestras se almacenaron a -20 °C. Algunos pasos adicionales se incluyen el en apéndice H.

4.3 SINTESIS DE ORIGAMI DE ADN.

En esta sección se describe el protocolo que se siguió para la síntesis de la nanoestructura con forma de triángulo, y que es un proceso sencillo y rápido. Cada paso se describe a continuación:

- En microtubos estériles se crearon los “pools” o mezclas de grapas para facilitar la síntesis del triángulo, se agregaron 2 μ l de cada grapa a 200 μ M. El número de “pools” puede variar según sea lo conveniente, para el triángulo fueron cuatro: 1) con grapas normales; es decir, los oligonucleótidos complementarios para plegar el andamio en forma de triángulo, 2) grapas extendidas (aquellas con secuencia adicional para el enlace de AuNPs) en la parte externa del triángulo más grapas normales, 3) grapas extendidas en el interior del triángulo más grapas normales y 4) grapas extendidas internas y externas más grapas normales.
- Los diferentes “pools” fueron mezclados usando un vórtex para asegurar homogeneidad en la solución. Después de tener los “pools” necesarios, se calculó la concentración molar promedio de cada pool con la fórmula de dilución de una concentración:

$$C_1V_1 = C_2V_2 ,$$

donde:

C_1 = Concentración inicial

V_1 = Volumen inicial

C_2 = Concentración final

V_2 = Volumen final

- Una vez listos los “pools” de grapas, se realizaron los cálculos necesarios para determinar el volumen que se necesitaba de cada componente para sintetizar la nanoestructura de ADN con forma de triángulo: buffer 1×TAE Mg²⁺ (40 nM Tris, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA, 12.5 mM magnesium acetate), DDI·H₂O, “pool” de grapas y “scaffold”. Se mantuvo una relación molar entre el scaffold y grapas de 1:10 con una concentración 5 nM del primero y con un volumen total final de 100 µl, los resultados fueron los siguientes:

	Stock	Síntesis	Volumen (µl)
Scaffold	500 nM	5 nM	1
Pool 1	3.04 µM	50 nM	4.05
TAE Mg²⁺	10X	1X	10
Di·H₂O			100-15.05= 84.95
		Total	100

- Como paso final, en un nuevo microtubo estéril usado para PCR se añadieron los volúmenes calculados anteriormente y se utilizó un termociclador Techne TC-3000 para realizar la síntesis de las nanoestructuras con un cambio de temperatura de 80 °C a 20 °C en 2 horas con una rampa de temperatura de 0.5 °C por minuto.

4.4 PURIFICACIÓN DE LAS NANOESTRUCTURAS DE ORIGAMI DE ADN

Una vez que se realizó la síntesis del triángulo, quedan residuos de grapas que no se enlazaron; ya que estas fueron puestas en exceso para asegurar la formación de las nanoestructuras. Existen dos maneras de realizar dicha purificación, ya sea por medio de electroforesis o a través de filtros. El protocolo que se siguió fue el segundo, el cual se describe a continuación:

- Primero se tomaron dos microtubos estériles, a uno de ellos se le agregaron 300 μl de DDI·H₂O, se coloca una marca hasta el nivel que alcanza el agua y después se desecha el líquido.
- Después, se tomó un filtro de Microcon© tipo “DNA fast flow centrifugal filter with ultracel membrane”. Este se colocó al tubo marcado y se añadieron 400 μl de 1× TAE Mg²⁺ al filtro para posteriormente centrifugar por medio de una Fisher Scientific accuSpin Micro 17 a 800 rpm durante 2 minutos para obtener 300 μl de residuo los cuales se desechan y los 100 μl restantes quedan en el filtro.
- De nuevo, se colocó el filtro con los 100 μl de buffer, más los 100 μl de muestra sintetizada para obtener un total de 400 μl , recordar que se agregaron los 200 μl restantes de 1× TAE Mg²⁺. Se repitió el proceso de centrifugación para separar el origami de las grapas sueltas, procurando mantener 100 μl en el filtro y 300 μl en el microtubo que se desechan.
- Se repitió el paso anterior con la variante que se agregan 300 μl de buffer más los 100 μl que se deben mantener en el filtro para un total de 400 μl , se prosiguió a centrifugar y desechar el líquido sobrante. Este paso se repitió entre 2 y 3 veces.

- Una vez que se realizaron los enjuagues necesarios, se prosiguió a recuperar el origami sintetizado. Esto se hizo al colocar en un microtubo nuevo el filtro de manera inversa. Luego, se centrifugó para precipitar el líquido, en teoría se deben recuperar 100 μ l para conservar la concentración molar inicial. En caso que el volumen sea menor o mayor a 100 μ l, es posible recalcular la molaridad final.

4.5 ACTIVACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS TIOLADAS Y BACKFILL

Para lograr cubrir la superficie de las nanopartículas de oro (AuNPs) con cadenas sencillas de ADN, se deben tiolar a las grapas correspondientes en el diseño del triángulo. Para ello se requiere modificar las secuencias de oligos en los extremos 5' y 3' enlazándolos con un grupo tiol (-SH). Además, la superficie de las AuNPs se satura con lo que se conoce como “backfill”. Este consiste en adherir a las AuNPs una cadena sencilla de 5 timinas, o T₅, para evitar la aglomeración entre nanopartículas. Estas secuencias al ser sintetizada contienen diferentes químicos como protección, los cuales deben removerse antes de conjugar los oligonucleótidos con las nanopartículas de oro. El proceso se describe a continuación:

- Primero se siguió el protocolo de preparación de oligonucleótido para hidratar en caso de ser necesario, como se describe en la sección 2 de este capítulo.
- Después, se realizaron los cálculos necesarios para conocer las cantidades precisas que fueron agregadas de TCEP (tris(2-carboxyethyl)phosphine en inglés) que es un agente reductor y el buffer el 10X TE (Tris-EDTA), tomando como base lo siguiente:

5 µl de TCEP	Si se usa 15 µl a una concentración de [100 µM] de cadenas tioladas o backfill
1.66 µl de 10× TE	
5×10^{13}	(AuNPs)/ ml

Cálculos:

- Concentración de AuNPs:

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

- Concentración de grapas tioladas:

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

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

- Se tomó en cuenta una relación AuNPs-Tiol de 1:5 para los cálculos:

1. 5' Tiol

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

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

$$= 9.5 \text{ µL}$$

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

Relación de TCEP:

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

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

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

Para $10 \times \text{TE}$:

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

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

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

2. 3' Thiol

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

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

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

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

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 entre AuNPs y backfill:

3. Backfill

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$\begin{aligned} V_1 T_5 &= \frac{[91.33 \times 10^{-9} \text{ M}][10 \times 10^{-3} \text{ L}]}{[918.64 \times 10^{-6} \text{ M}]} = 9.9418 \times 10^{-7} \text{ L} = (0.99 \mu\text{L}) \times 60 \\ &= 59.4 \mu\text{L} \end{aligned}$$

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

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 $10 \times \text{TE}$:

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

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

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

- Una vez que se determinaron la cantidad de volumen de TCEP y $10 \times \text{TE}$ para 5' -tiol, 3' -tiol y "Backfill", cada mezcla se vertió por separado en un microtubo para PCR.
- Se colocaron los tubos en un agitador rotatorio de 360° , por un tiempo 1 hora mínimo hasta 24 horas, se recomienda que sea el mayor tiempo posible.
- Después de la incubación cada solución se centrifugó, y el sobrenadante se agregó a las AuNPs tratadas, cuyo proceso se describe en una sección posterior.
-

4.6 TRATAMIENTO DE NANOPARTÍCULAS DE ORO (AuNPs)

Nanopartículas de oro (AuNPs) con un diámetro nominal de 5 nm fueron adquiridas en la compañía Ted Pella, INC. Las AuNPs se encuentran en suspensión coloidal con agua, trazas de citrato, ácido tánico y carbonato de potasio. Por tanto, deben ser tratadas para precipitar en pellets a las AuNPs de la suspensión en la que se encuentran. El tratamiento fue el siguiente:

- Se agregaron 10 ml de AuNPs en suspensión coloidal tal como se recibieron en un tubo de plástico con rosca cuya capacidad era la misma que el volumen agregado. Se requiere que sea de esta capacidad para poder notar cambios de coloración.
- Se pesaron 3 mg de Bis(p-sulfonatofenil) fenilfosfona (BSPP por sus siglas en inglés) y se agregaron al tubo con las AuNPs.

- La mezcla de las AuNPs con el BSPP se dejó en agitación durante una noche, el tiempo de incubación puede ser mayor.
- Al finalizar el paso anterior, se retiró el tubo de agitación y se le tomó una foto en un fondo blanco. Esto para tener una referencia y poder observar los cambios de coloración del coloide.
- Después, se pesaron 130 mg de NaCl que se agregaron al tubo y se mezclaron con ayuda de un agitador vórtex hasta disolver por completo la sal. De nuevo, se capturó una segunda imagen en fondo blanco, se debe notar un tono morado en el coloide. Este paso se repitió, pero con cantidades de NaCl menores hasta observar una coloración rosada y translúcida, procurando que la cantidad de sal agregada no sobrepasara de 260 mg.
- Cuando se obtuvo la coloración deseada, se prosiguió a usar la centrifuga Thermo Scientific Sorvall Legend XTR Centrifuge a una aceleración de 1260g por 30 minutos a una temperatura de 24 °C.
- Luego de centrifugar, se observó un precipitado de color negro en el fondo y una solución casi incolora en el sobrenadante.
- El sobrenadante se retiró con la ayuda de una micropipeta sin perturbar el precipitado que se formó.
- Aparte, en un tubo nuevo se preparó una solución con 3 mg de BSPP disueltos en 10 ml de agua, se tomó una alícuota de 200 µl de esta solución y se agregaron al tubo con el pellet, añadiéndole 200 µl de metanol para resuspender las AuNPs.
- La nueva solución de AuNPs se cambió a un microtubo. Para evitar pérdidas en el tubo de 10 ml, se le agregaron 50 µl de la solución BSPP y se incluyeron después al microtubo.

- Posteriormente, se agregaron 200 μl de metanol para obtener la mayor cantidad de AuNPs al centrifugar en la Fisher Scientific accuSpin Micro 17.
- Se desechó el sobrenadante que se formó después de centrifugar, y el pellet se resuspendió con 50 μl de la solución de BSPP.
- Por último, se añadieron las grapas tioladas y el backfill después del tratamiento descrito anteriormente. Se mezcló utilizando un vórtex y luego la solución resultante se incubó durante 2 días en un agitador orbital.

4.7 PURIFICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ORO

Las nanopartículas de oro conjugadas con los oligonucleótidos tiolados, además del “backfill” que las recubre, requieren ser purificadas ya que algunas cadenas sencillas no se adhieren a la superficie de las AuNPs. Esta purificación consta de dos procesos: primero se separan las grapas no enlazadas de las AuNPs conjugadas en una cámara de electroforesis y, después, se recuperan las AuNPs tioladas empleando filtros que se conocen comercialmente como “Freeze N’ Squeeze”. Los pasos que se siguieron se detallan enseguida:

- Primero en una probeta se prepararon 400 ml de buffer $1\times\text{TAEMg}^{2+}$.
- Se preparó un gel de agarosa al 3% con un volumen total de 50 ml de $1\times\text{TAEMg}^{2+}$; por lo tanto, se agregaron 1.5 g de agarosa en un matraz Erlenmeyer.
- Para disolver la agarosa en el buffer, se colocó el matraz en un microondas tratando que el gel no se derramara y mezclando continuamente. Este procedimiento también se puede realizar en una parrilla con agitación y temperatura constante.

- Una vez que se logró una mezcla translúcida y viscosa, se dejó reposar durante 15 min aproximadamente para que la temperatura disminuyera un poco. Posteriormente, se vertió la mezcla en el molde especial de electroforesis junto con la peineta de 8 dientes. La solución se dejó reposar hasta gelificar.
- Ya que transcurrió el tiempo necesario, se retiró la peineta del gel y éste se colocó en la cámara de electroforesis. Es recomendable colocar la cámara de electroforesis en algún contenedor con hielo para mantener una temperatura menor a la ambiente y constante.
- La cámara de electroforesis se cubrió con el buffer $1\times\text{TAEMg}^{2+}$ hasta la marca o hasta que se apreció que el gel estuviera completamente cubierto.
- Posteriormente, se agregó una solución de glicerol al 50% al microtubo que contiene las AuNPs, esto para asegurar que la muestra permanezca en el fondo de cada pozo del gel de agarosa. El volumen de glicerol que se le agregó correspondía a un quinto del volumen total de la muestra. Si la muestra total era de 350 μl , se añadieron 70 μl de glicerol al 50%, etc.
- En seguida de tener lista esta mezcla, se colocaron aproximadamente 40 μl por orificio o pozo del gel, en caso que sobre muestra y aún tiene capacidad se puede agregar un poco más cuidando que no sobrepase la profundidad del pozo.
- Posteriormente, se corre el gel en la cámara de electroforesis a un voltaje de 100 volts durante 15 minutos.
- Después que este tiempo ha transcurrido, se retiró el gel con sumo cuidado para colocarlo sobre un transiluminador UV modelo 2UV y se usó luz blanca para lograr observar la banda de AuNPs conjugadas que se caracterizan por un color rojizo intenso.

- Con una navaja esterilizada se cortaron pequeños pedazos del gel donde se encontraban AuNPs, como se muestra en la figura 27.a) y 27.b), el resto del gel se puede desechar.
- Los pedazos se desmenuzaron hasta alcanzar un tamaño mínimo para poder verterlos en los filtros del kit Freeze N' Squeeze DNA Gel Extaction Spin Columns de BIO-RAD, en la figura 27.c) se ilustra dicho procedimiento.
- Antes de centrifugar, el tubo con filtro se coloca en el congelador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aproximadamente por 5 minutos, esto se representa en la figura 27.d).
- Después el filtro con la muestra se centrifugó a una temperatura de 4°C por 3 minutos a $6200g$ para recuperar la mayor cantidad de AuNPs conjugadas, tal como se ilustra en la figura 27.e).

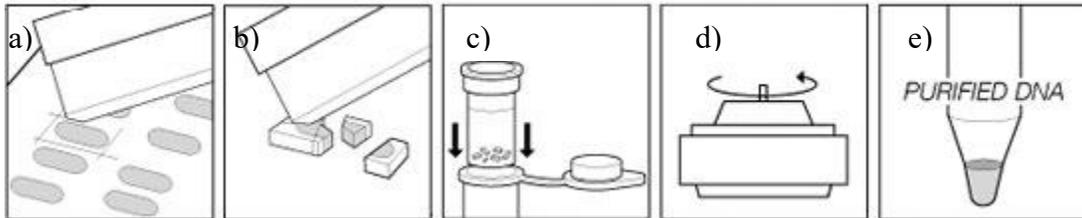


Figura 27. Se representan de manera esquemática los pasos de Freeze 'N Squeeze.

- Una vez que se tuvo el mayor volumen posible de AuNPs, se retiró el filtro y se hizo uso del NanoDrop 2000c de Thermo Scientific para determinar la concentración de las AuNPs recuperada por medio de este procedimiento y se almacenaron en el refrigerador a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

-

4.8 FUNCIONALIZACIÓN EN SUPERFICIE

La funcionalización en superficie permite la visualización inmediata de la muestra en el microscopio de fuerza atómica (AFM por sus siglas en inglés), cuyos principios fueron descritos en el capítulo de técnicas experimentales en la sección 3. Los pasos que se siguieron se describen a continuación:

- Primero se realizaron los cálculos para determinar el volumen de AuNPs dependiendo del volumen y concentración que se utilice de andamio. A continuación, se muestra la fórmula estándar y un ejemplo de su aplicación:

$$l \text{ de AuNPs} = l \text{ de origami} \cdot \frac{\text{moles de origami}}{l} \cdot \frac{\text{No. de AuNPs por origami} \cdot \text{moles en exceso de AuNPs}}{\text{mol de origami}} \cdot \frac{l \text{ de AuNPs}}{\text{moles de AuNPs}}$$

- o Ej., el cálculo es el siguiente para 2 μl de origami a una concentración de 5 nM con un exceso de 3 por 2 sitios que ocupe la AuNPs ya sea en la dirección 3' o 5', el cálculo es el siguiente:

$$(2 \times 10^{-6} \text{ l de origami}) \cdot \left(5 \times 10^{-9} \frac{\text{moles de origami}}{l}\right) \cdot \left(\frac{2 \text{ AuNP por Origami} \cdot 3 \text{ moles de exceso de AuNP}}{1 \text{ mol de origami}}\right) \cdot \left(\frac{l \text{ de AuNPs}}{365 \times 10^{-9} \text{ moles de AuNPs}}\right) = 0.16 \mu\text{l}$$

- Se adhiere un sustrato de mica sobre un disco de acero especial para AFM.
- Con cinta adhesiva se removieron varias capas de mica hasta conseguir una superficie homogénea sin bordes ni orificios evidentes. A este proceso comúnmente se le conoce como clivaje. Una vez que se logra lo anterior, el material debe ser protegido del polvo.
- Se agregaron 10 μl de NiCl_2 a una concentración de 10 nM y se dejó reposar 1 minuto aproximadamente.

- Después se añadió el volumen de origami de ADN y se esperó 3 minutos a que las nanoestructuras se asentaran sobre la superficie de la mica.
- Una vez que transcurrió el tiempo correspondiente, se agregó el volumen necesario, de acuerdo al cálculo hecho anteriormente, de AuNPs. Se dejó reposar durante 15 minutos para proseguir a visualizar por medio de AFM Cypher S.

CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección se presentan los resultados obtenidos de la síntesis del triángulo con la novedosa técnica de origami de ADN. Las imágenes que se exponen se obtuvieron por microscopía de fuerza atómica; así como una caracterización por medio de electroforesis para corroborar la formación de la nanoestructura respecto al diseño por caDNAno y CanDo. Así mismo, se hace una discusión detallada de los resultados experimentales obtenidos entre sí y con el diseño original. Además, se exponen las posibles explicaciones de las diferencias que pudieran existir entre ellos.

5.1 VISUALIZACIÓN DE TRIÁNGULO DE ORIGAMI DE ADN CON AFM

Como se mencionó en el capítulo de técnicas experimentales, el estudio de las nanoestructuras de ADN fue realizado por medio de AFM utilizando dos equipos diferentes (Cypher y Nanoscope), ambos en modo “tapping” con una celda de fluido. Para corroborar y verificar la estabilidad de las nanoestructuras, también se realizó un análisis de las muestras en aire por medio solo del equipo Nanoscope.

La preparación de las muestras a analizar en fluido se realizó colocando 2 μl de la muestra a 5 nM a la que se le añadieron 8 μl de buffer $1\times\text{TAEMg}^{2+}$ para obtener una concentración final de 1 nM. Esta mezcla se depositó sobre una superficie de mica recién clivada para su observación por AFM.

Se muestra una serie de imágenes típicas tomadas a diferentes escalas para estudiar la morfología de las nanoestructuras con forma triangular, tal que las figuras 28 a 29 y 30 a 32 se obtuvieron por medio del Cypher y Nanoscope, respectivamente.

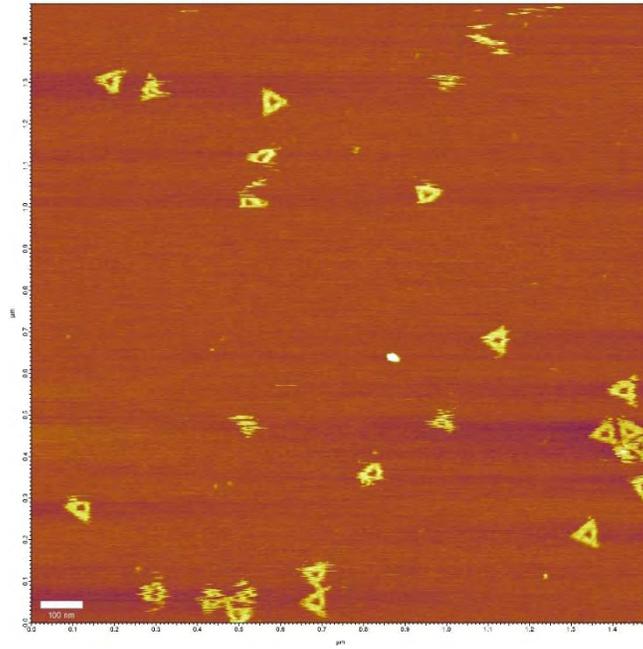


Figura 28. Imagen de $1.5 \times 1.5 \mu\text{m}$ de nanoestructuras triangulares de origami de ADN [1nM].

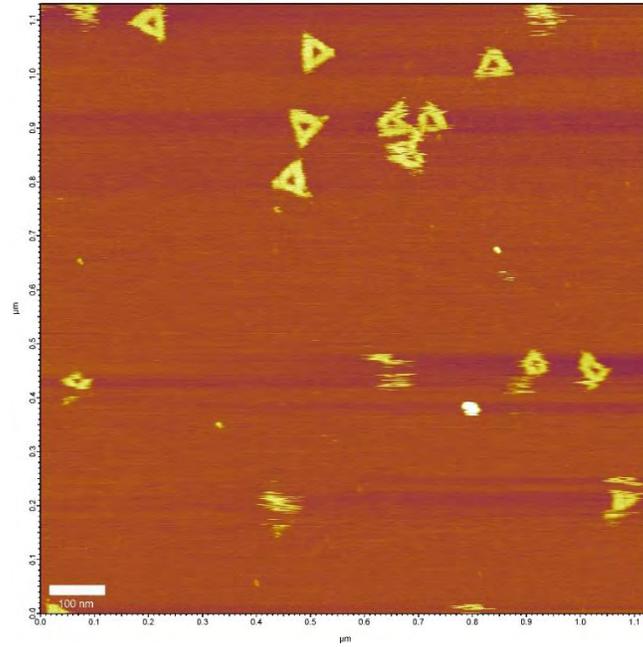


Figura 29. Amplificación a $1.2 \times 1.2 \mu\text{m}$ de una región de la imagen 28 [1nM].

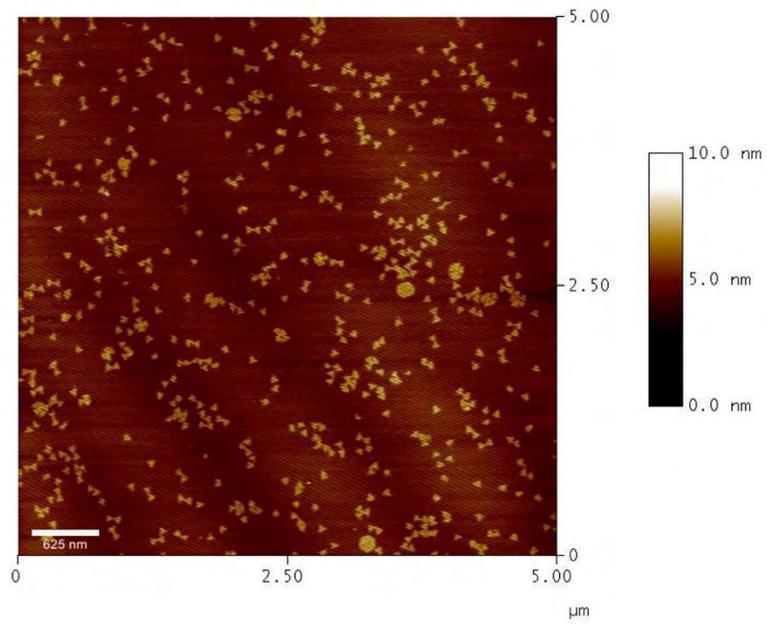


Figura 30. Imagen de $5 \times 5 \mu\text{m}$ de nanoestructuras triangulares de origami de ADN [1nM].

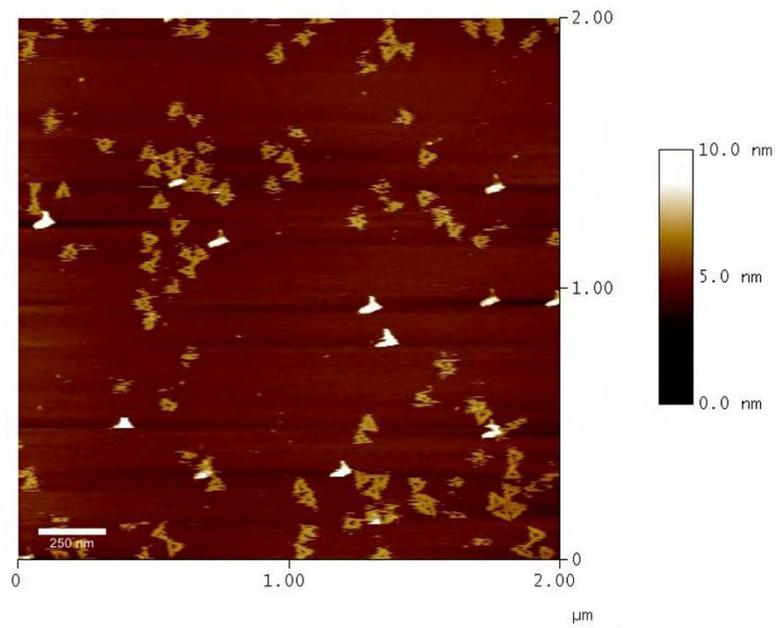


Figura 31. Amplificación a $2 \times 2 \mu\text{m}$ de una región de la imagen 30 [1nM].

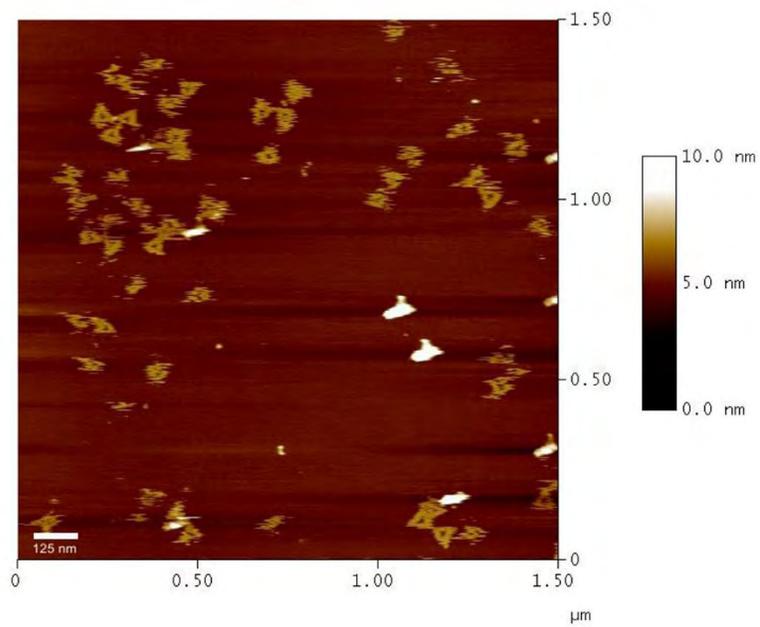


Figura 32. Imagen de un área reducida a $1.5 \times 1.5 \mu\text{m}$ de la imagen 30 [1nM].

Una de las primeras observaciones de estas imágenes es que algunos triángulos parecieran estar incompletos o deformes. Esto se puede deber a que cuando la punta interacciona con la muestra, ésta se deforma, o inclusive se “rasga”, ya que el triángulo de ADN es suave. Este efecto es solo un artificio común ya reportado al usar AFM en modo “tapping” en una celda de fluido. Otra causa podría ser que la punta no hizo el contacto suficiente por la presencia de material espurio, como sales no disueltas del buffer, por lo que en apariencia no se genera señal y el AFM lo interpreta como una sección incompleta o faltante de la estructura. Por otro lado, se aprecia como algunos triángulos se adhieren entre sí, sobre todo a lo largo de sus bases. Este fenómeno se conoce como “ π - π stacking”, o apilamiento π , que se debe a las interacciones entre los anillos aromáticos que forman las bases nitrogenadas y el azúcar del ADN. Es posible que el agrupamiento de los triángulos sea por las cadenas sueltas en las grapas o sobresalientes que se colocaron en el vértice superior, ver figura 41, con una longitud mayor a la sugerida para evitar el “ π - π stacking”, como se describe en el apéndice G.

Con la finalidad de comparar la morfología de las nanoestructuras con y sin buffer, se prepararon una serie de muestras en aire igual que las analizadas en fluido, la única variante fue que se expusieron a un flujo rasante de N_2 . Las figuras 33 a 36 corresponden a micrografías capturadas sin la celda de fluido, en aire, con el equipo AFM Nanoscope a diferentes tamaños de barrido, iniciando por 5 μm hasta alcanzar 400 nm. Estas diferentes imágenes en aire comprueban las hipótesis expuestas para explicar los defectos aparentes que se observan en las figuras 28 a 32 y que ocurren sólo en fluido. En estas micrografías también se observa la aglomeración de nanoestructuras por la interacción “ π - π stacking” ya descrita anteriormente.

Por otro lado, es importante señalar que las imágenes obtenidas con el equipo Nanoscope se obtuvieron seis meses después que aquellas con el Cypher. Lo que permite resaltar la estabilidad de la muestra, ya que se puede almacenar durante periodos prolongados de tiempo a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y posteriormente ser expuesta a temperatura ambiente sin que sufra un cambio significativo en su estructura, menos aún su degradación completa.

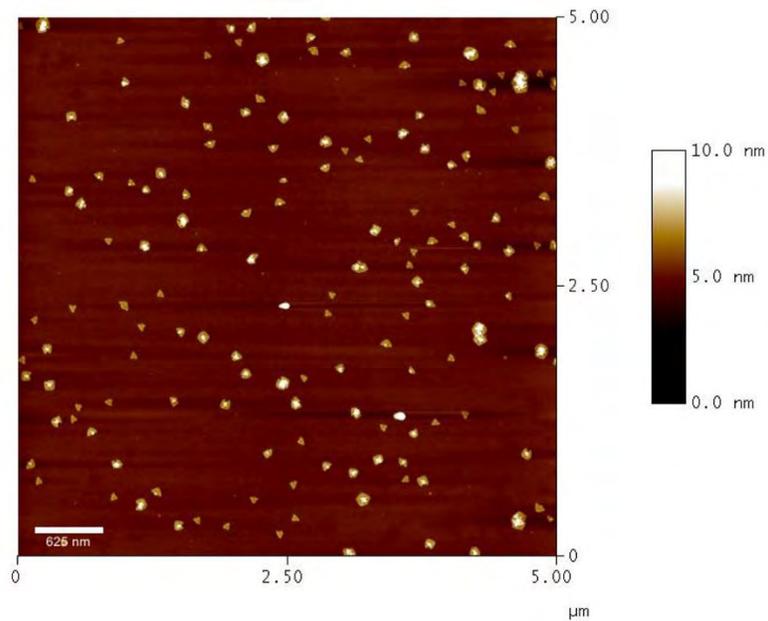


Figura 33. Imagen de $5 \times 5\text{ }\mu\text{m}$ en aire [1nM] con AFM.

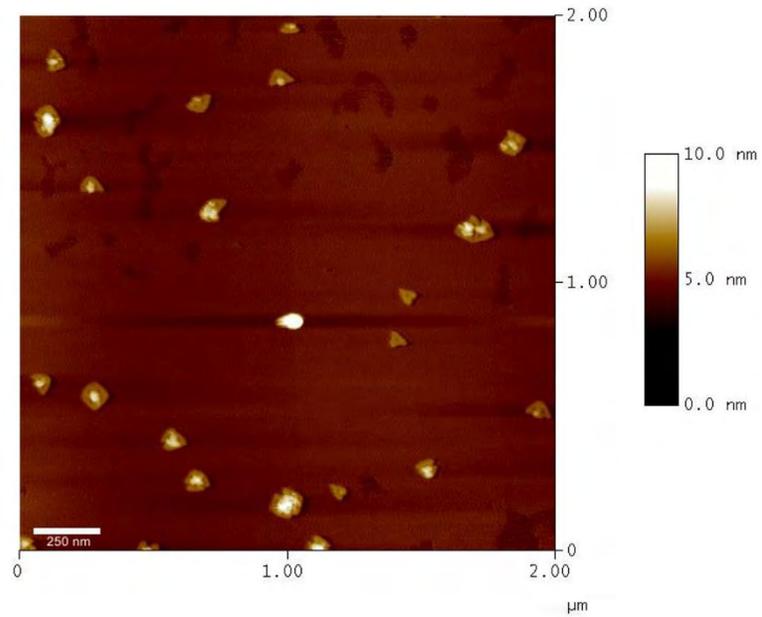


Figura 34. Imagen de un área reducida a $2 \times 2 \mu\text{m}$ [1nM].

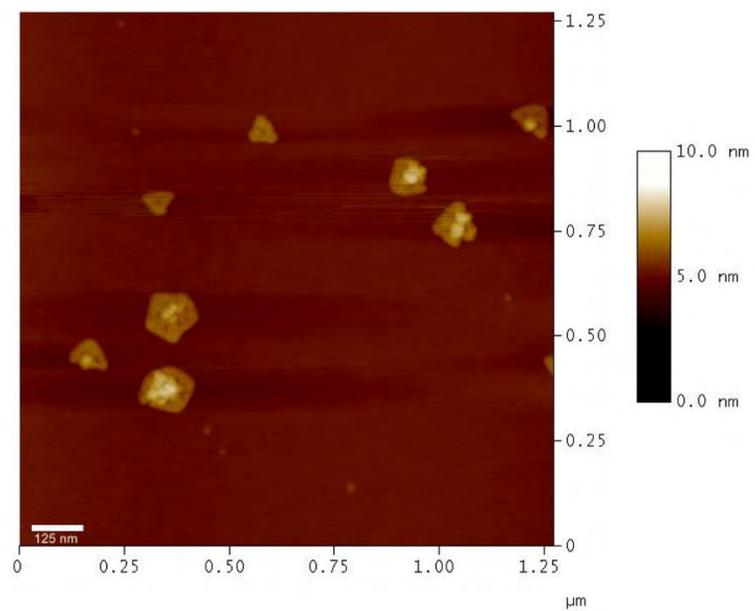


Figura 35. Amplificación a $1.25 \times 1.25 \mu\text{m}$ de la figura 33 [1nM]

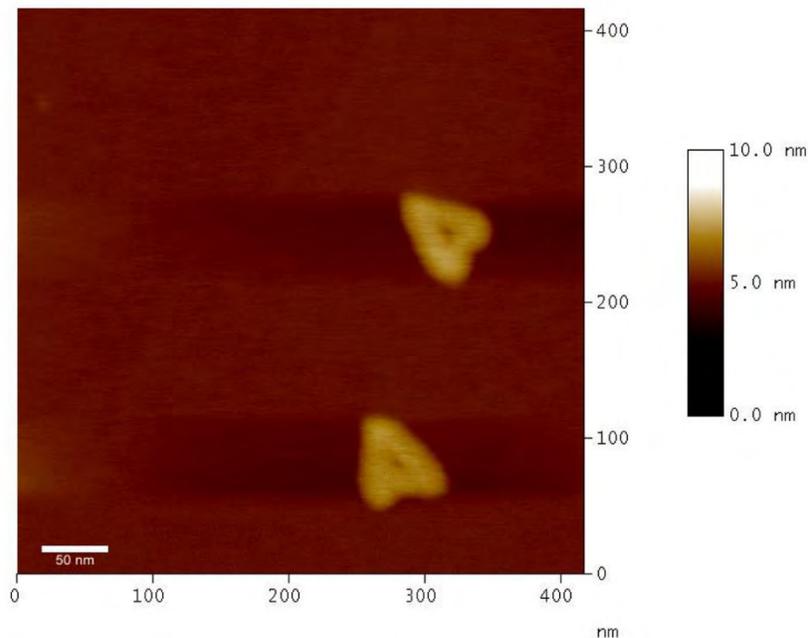


Figura 36. Acercamiento a 400×400 nm de dos triángulos de la figura 34 [1 nM].

A continuación, se determinaron las dimensiones de las nanoestructuras directamente de las imágenes de AFM. En las figuras siguientes 37 y 38 se despliegan cortes seccionales llevados a cabo partir de las imágenes 28 y 29, respectivamente. La figura 37 muestra la mediana del triángulo de ADN; es decir, el segmento que va de uno de los vértices al punto medio de su lado opuesto. La longitud de la mediana corresponde aproximadamente a 60 nm. En la figura 38 se muestra la determinación de la longitud de uno de los lados del triángulo de ADN, la distancia que hay entre vértices resultó ser de 70 nm aproximadamente. Las figuras 39 y 40 engloban las medidas ya mencionadas a uno de los triángulos de la imagen 32, logrando valores similares a los obtenidos en las figuras 37 y 38.

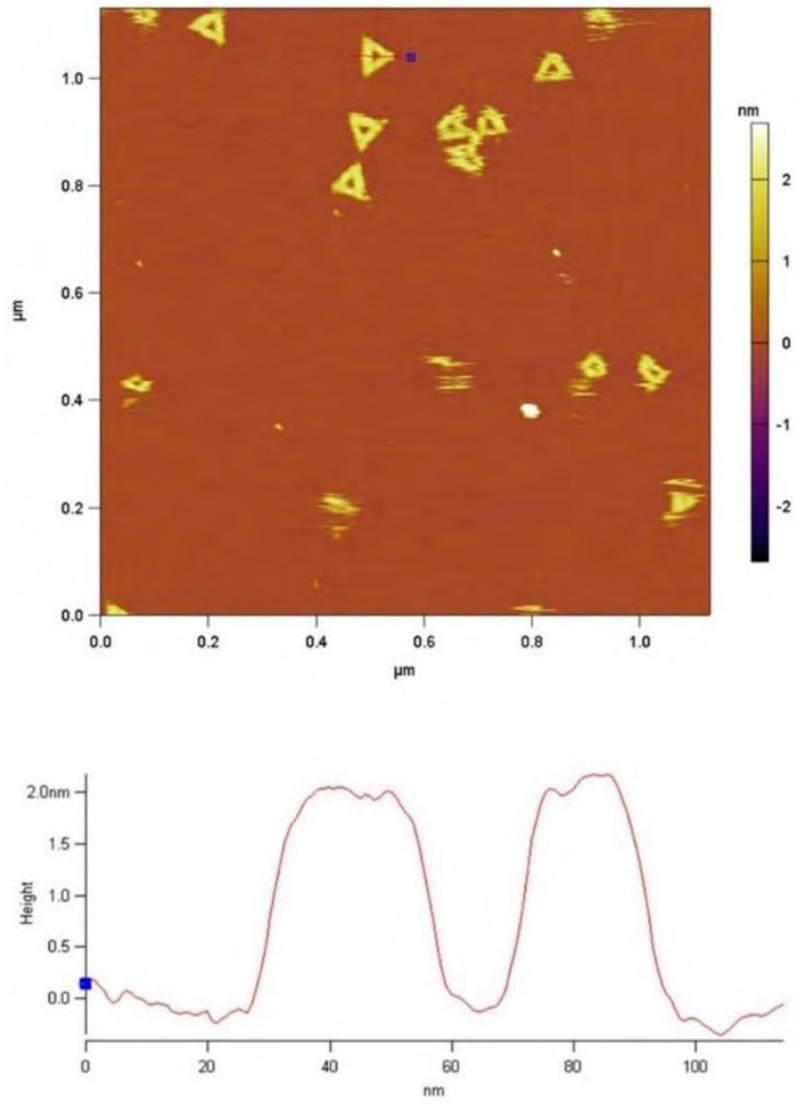


Figura 37. Medida de la mediana de uno de los triángulos de la figura 28.

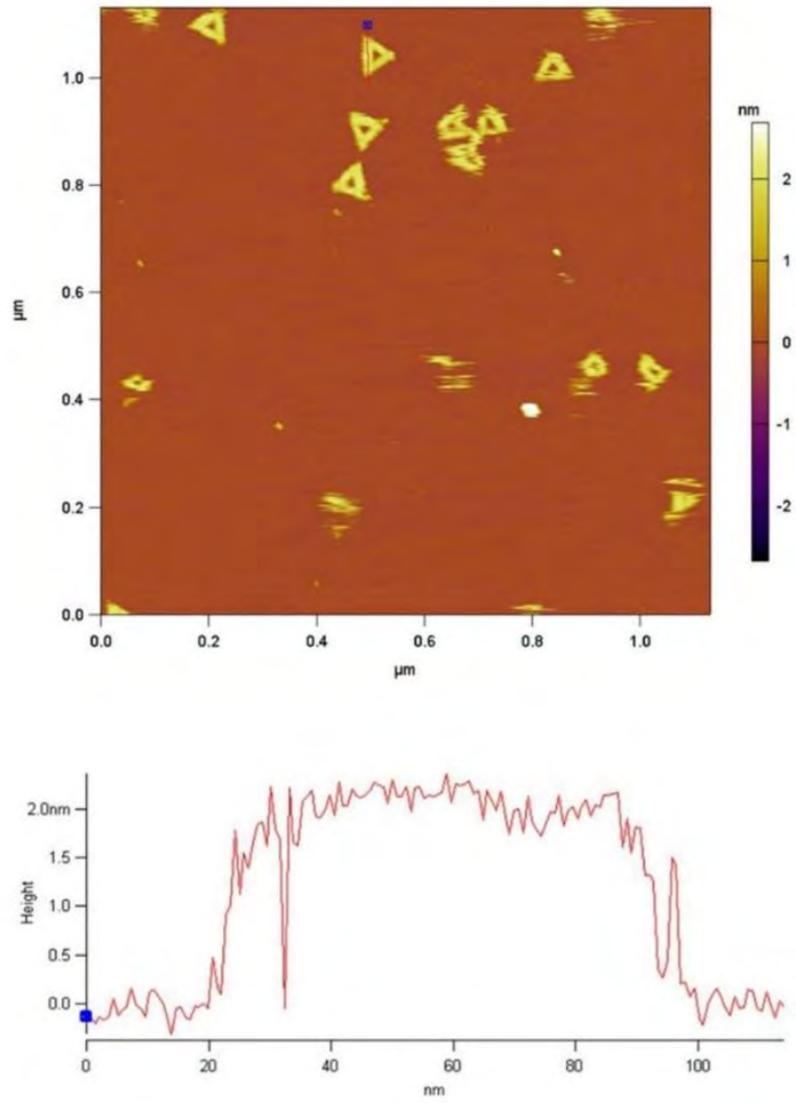


Figura 38. Medición de la longitud de un lado, distancia entre vértices, de uno de los triángulos de la figura 28.

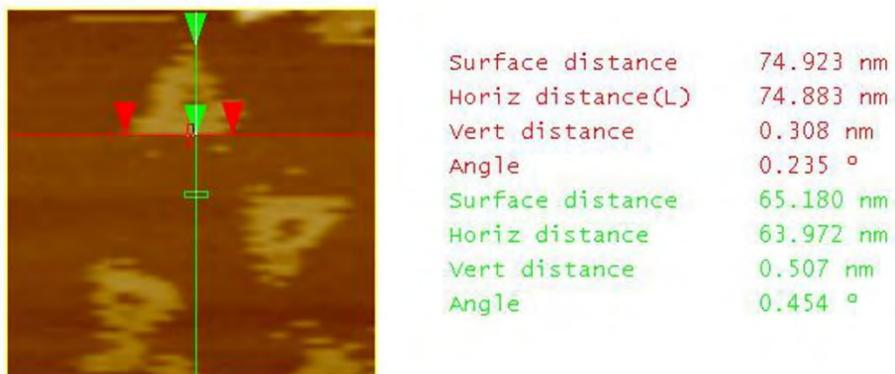


Figura 39. Medición de la mediana y una arista de un triángulo de la figura 32.

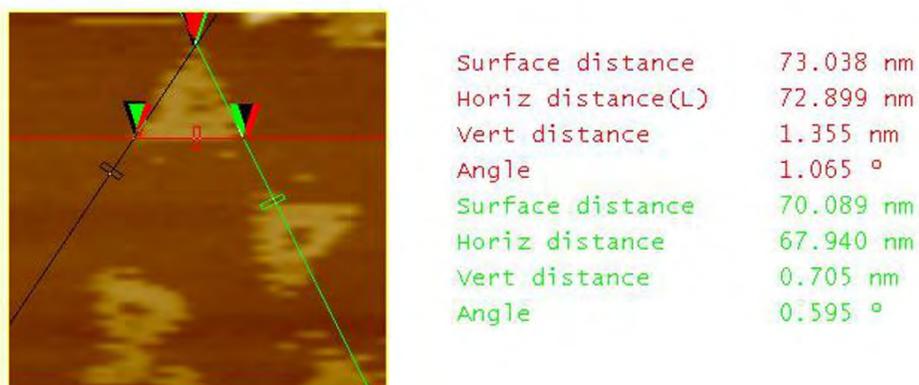


Figura 40. Medición de las tres diferentes aristas del triángulo de la figura 35.

Para obtener un valor promedio de las longitudes de los lados de las distintas nanoestructuras en las muestras, se llevó a cabo una estadística haciendo cortes seccionales en varias imágenes. Se determinó un valor promedio de 72.2 nm con una desviación estándar de 2.1 nm, lo que muestra que el triángulo de origami de ADN es equilátero. La figura 41 exhibe un modelo creado por el visualizador Autodesk Molecular Viewer [75] obtenido a partir del archivo correspondiente generado por caDNAno. A partir de esta figura, las dimensiones del bosquejo del triángulo

resultaron ser isósceles con base de 76.57 nm y dos lados iguales de una longitud de 71.87 nm. La diferencia entre las dimensiones predichas por el programa y los resultados obtenidos por AFM son muy pequeñas, además de que el predicho es isósceles y el medido es equilátero. Una explicación plausible de esto es que el programa no toma en cuenta las repulsiones que existen entre las cargas de los fosfatos del ADN, lo cual genera un espaciamiento o “gap” entre las dobles hélices y supone que la nanoestructura se encuentra en el vacío.

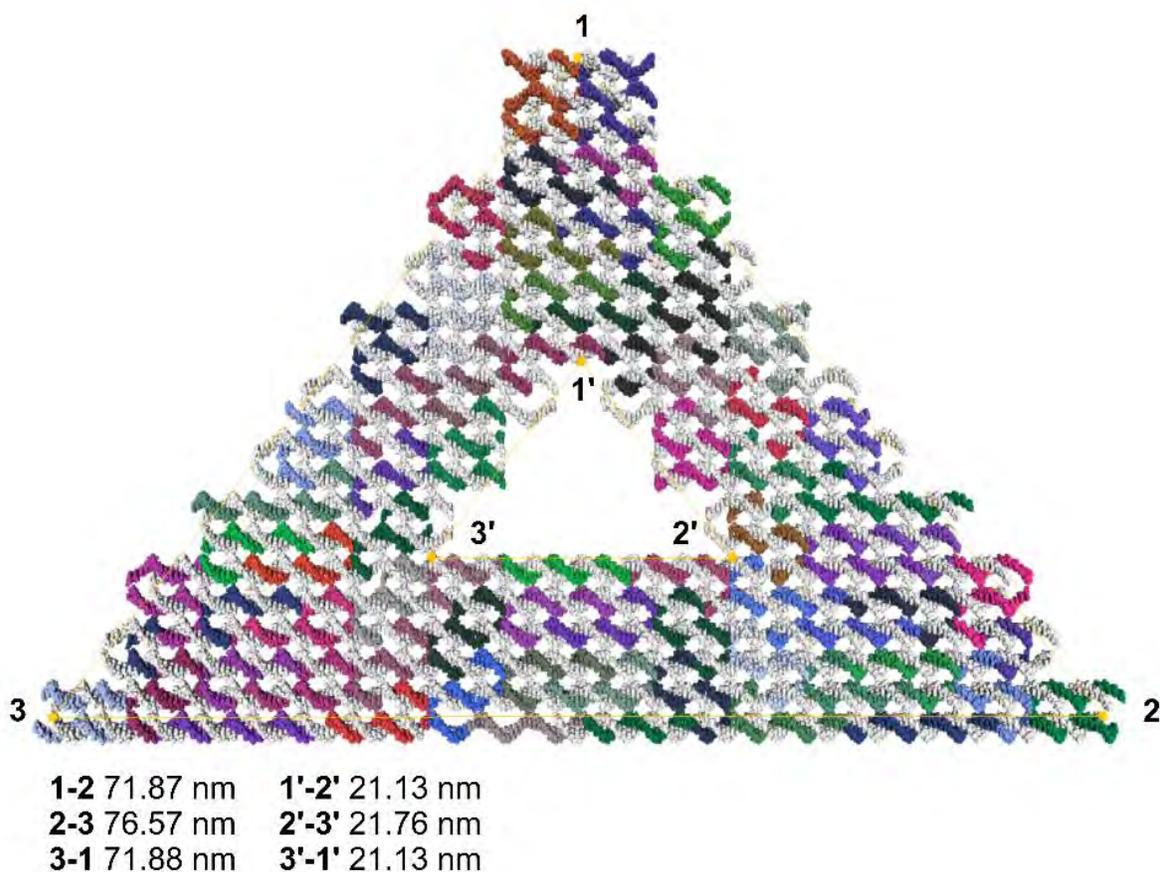


Figura 41. Diseño en caDNAno visualizado con Autodesk Molecular Viewer y las dimensiones aproximadas de sus lados.

5.2 IMÁGENES DEL TRIÁNGULO FUNCIONALIZADO CON AuNPS POR AFM

La funcionalización en superficie del triángulo con AuNPs se realizó siguiendo el protocolo descrito en la sección 4.8. Posteriormente, las muestras se analizaron por medio de AFM utilizando las mismas condiciones que las nanoestructuras sin funcionalizar. Se realizaron variadas combinaciones en volumen entre AuNPs y origamis las cuales se resumen en la tabla 1, el detalle en los cálculos de los volúmenes de la tabla 1 se describen en la sección 4.8. La obtención de imágenes con buena resolución de cada una de las mezclas representaba gran dificultad; por tanto, se describen aquellas que se aprecian mejor.

Volumen Scaffold (μl)	Volumen AuNPs orientación 5' (μ l)	Volumen AuNPs orientación 3' (μ l)
5 [5nM]	12.3	6.9
5 [5nM]	0.13	0.038
2 [5nM]	0.6	0.2
1[5nM]	1	0.5
1 [5nM]	1	-
1[5nM]	-	0.5

Tabla 1. Resumen de las diferentes combinaciones entre origamis y AuNPs.

En la figura 42 se muestra una nanoestructura con forma triangular con AuNPs en dos de sus vértices. Para ésta se mezcló 1 μl de origami con concentración 5nM con 1 μl de AuNPs con orientación 5' y 0.5 μl de AuNPs con orientación 3'. Es factible que las dos nanopartículas de oro adheridas al triangulo son de orientación 5' pues la región planteada para enlazar las AuNP 3' es la misma que generan el apilamiento π como se describió en la sección anterior.

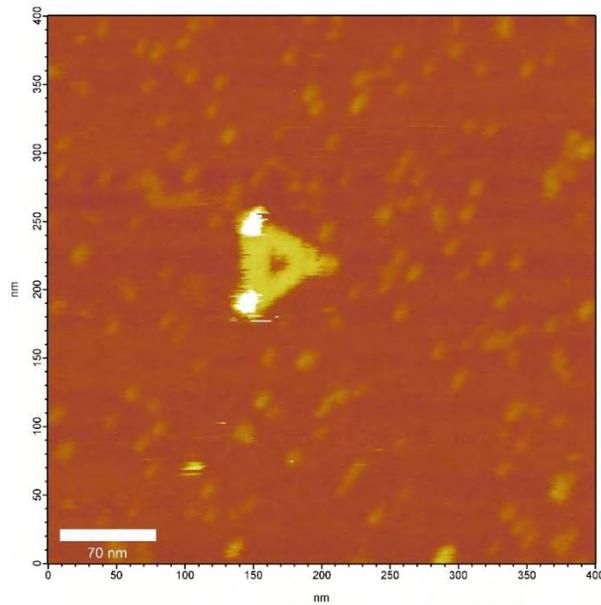


Figura 42. Triángulo de ADN funcionalizado con AuNPs en dos de sus vértices.

Las figuras 43 y 44 muestran un triángulo de origami de ADN con una nanopartícula de oro enlazada a uno de sus vértices, ambas imágenes se encuentran en las mismas condiciones de funcionalización que la figura 42.

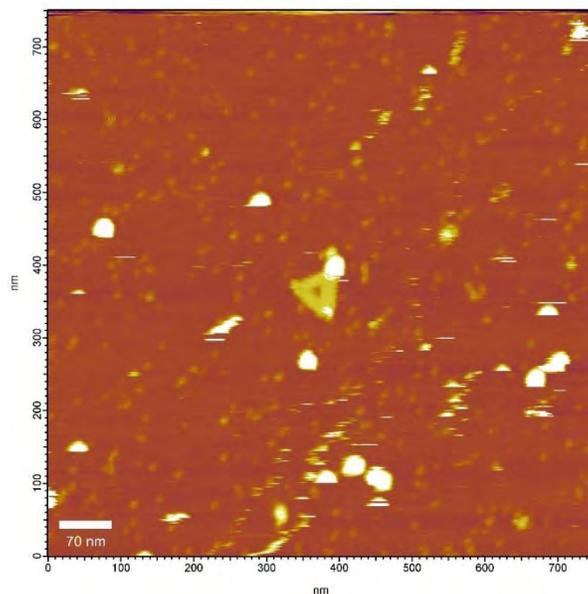


Figura 43. Triángulo de ADN funcionalizado con una AuNP en uno de sus vértices.

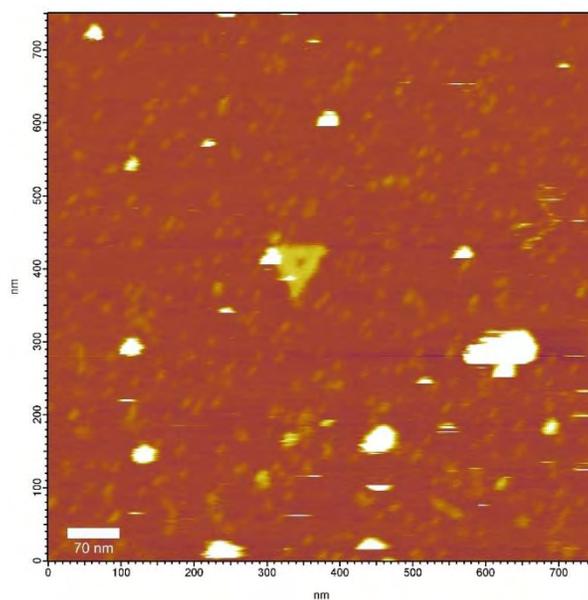


Figura 44. Triángulo de ADN funcionalizado con una AuNP en uno de sus vértices.

Las figuras 45 y 46 exhiben un análisis seccional con dos cortes en diferentes direcciones de la nanoestructura de origami de ADN con dos AuNPs mostrada en la figura 36. Este análisis es similar al realizado en las figuras 37 y 38 para el mismo tipo de nanoestructura de origami de ADN, pero antes de la funcionalización con AuNPs. Esto permite corroborar que las diferentes dimensiones analizadas en las imágenes de las figuras 45 y 46 comparadas con las de las figuras 37 y 38, respectivamente, corresponden entre sí. Es decir, una distancia de 70 nm entre dos de los vértices, un lado, del triángulo y 60 nm entre un vértice y el lado opuesto, mediana. Además, en la figura 10 el corte seccional confirma que las dos AuNPs son homogéneas y su diámetro es de 5 nm con una incertidumbre de ± 5 nm.

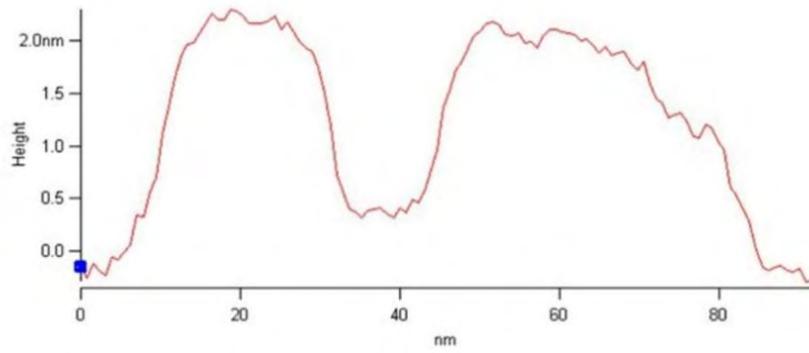
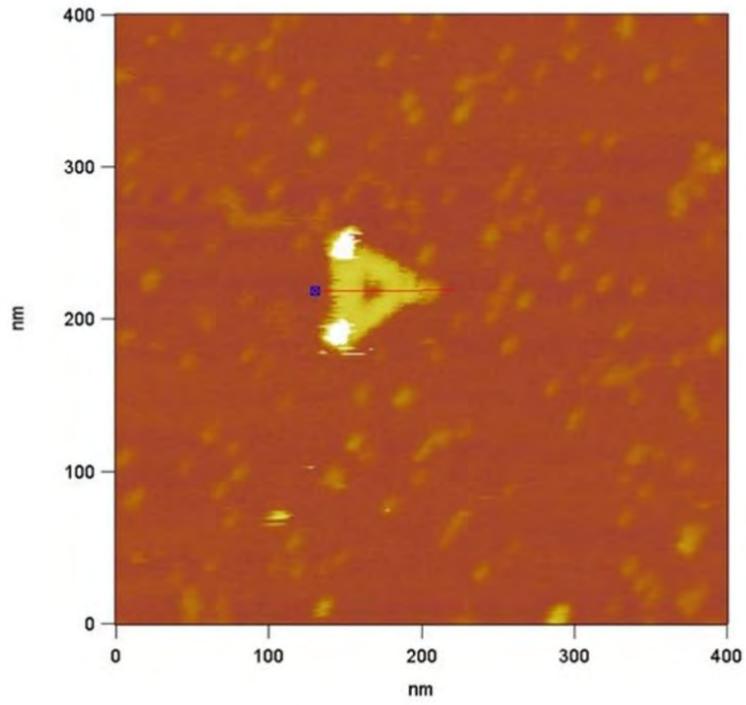


Figura 45. Medición de la longitud de la mediana del triángulo de la figura 34.

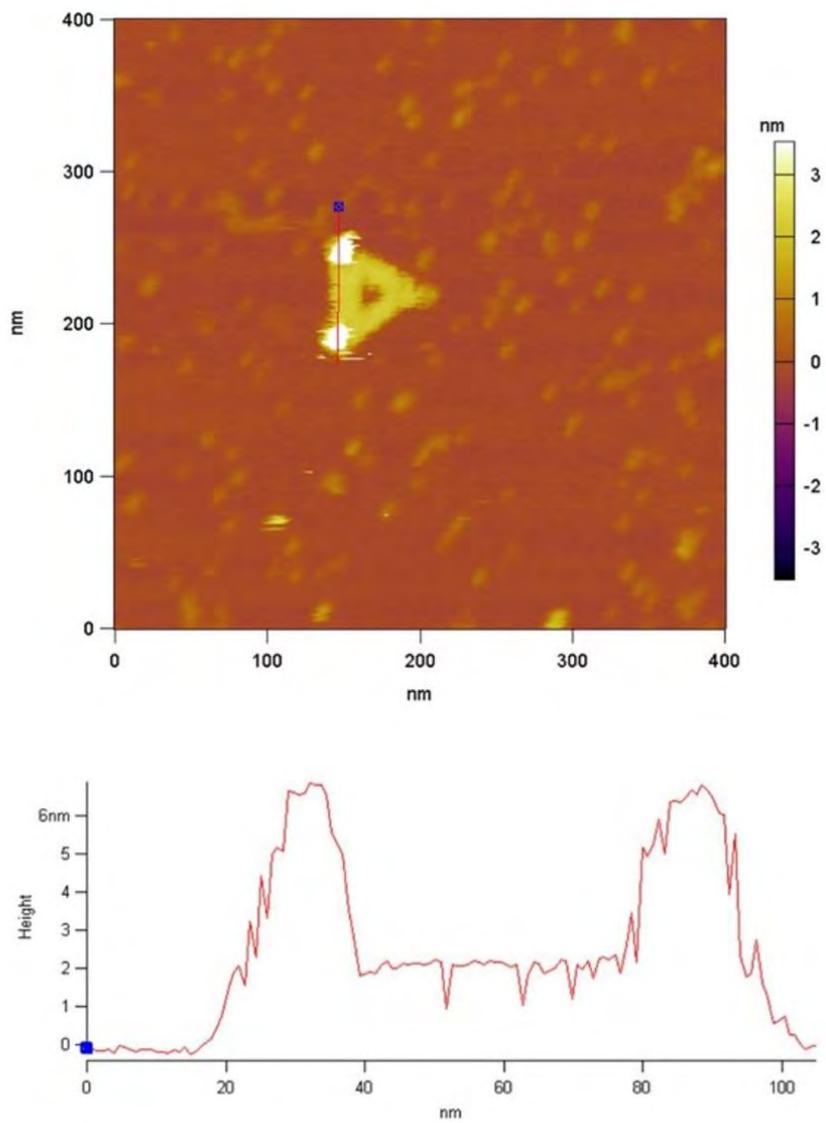


Figura 46. Medición longitudinal de un lado, distancia entre AuNPs.

5.3 COMPROBACIÓN DE FORMACIÓN DE NANOESTRUCTURA POR ELECTROFORESIS

Antes de la invención y desarrollo del AFM, el análisis por electroforesis era la técnica más usada para demostrar la formación de nanoestructuras en nanotecnología de ADN. Por ello, en el presente trabajo de tesis se agrega como un complemento para comprobar la formación del triángulo de ADN. En la imagen de la figura 47 se visualizan dos imágenes de un mismo gel de agarosa al 1.2%, al cual se le hicieron dos tipos de capturas de imagen con diferente longitud de onda: a) iluminada con luz UV, b) iluminada con luz visible. El orden en que se depositaron las muestras, marcadas del 1 al 8, fueron los siguientes: 1) escalera de referencia de 1500 pares de bases, 2) carril vacío, 3) andamio mini-M13mp18, 4) grapas usadas para la formación del triángulo de origami de ADN, 5) triángulo de origami de ADN, y 6) triángulo con grapas extendidas, 7) conjugación nanopartículas-grapas (AuNPs:ssDNA) y 8) triángulo de origami de ADN con AuNPs. Todas las muestras fueron inmersas en colorante GelRed, el cual permite la visualización del ADN en luz UV.

Las distintas bandas de ADN que aparecen en la imagen a) de la figura 47 tienen la siguiente interpretación. La escalera (carril 1) marca varias bandas que sirven como referencia para todas las bandas en los otros pozos que corresponden a diferente número de pares de bases, va de 1500 pb a 100 pb como se observa en la imagen. Así, la banda que aparece en el carril 3, correspondiente a la cadena sencilla del andamio, se encuentra ligeramente por debajo de 1500 pb, que corresponden a 3000 nt. Recordando que el andamio es la tercera parte del plásmido M13mp18 de 2404 nt su posición es consistente con el resultado obtenido. En el caso de las

grapas en el carril 4, se observa una banda difusa en la parte inferior del gel, por debajo de 100 nt esto es algo esperado puesto que la grapa más larga es menor a los 60 nt. Ahora bien, se puede observar una banda en el carril 5, asociada a la nanoestructura de ADN con forma triangular, que se encuentra ligeramente por arriba de la correspondiente a la del carril 3, e incluso por arriba de la banda de 1500 pb de la escalera. Esto se debe a que se trata del origami de ADN con forma de triángulo, el resultado del autoensamble del andamio con las grapas complementarias totalizando aproximadamente 2404 pb, por lo que se espera que la movilidad de éste sea menor ya que ahora el andamio se encuentra enlazada a un complemento formando una estructura de mayor tamaño. Algo similar ocurre con la banda en el carril 6, relacionada con el triángulo con grapas extendidas, mostrando una movilidad aún menor, la banda está por arriba que la del carril 5, debido a la adición de las cadenas extendidas. Para ambas muestras se marcan bandas de intensidad menor, se puede asumir que son nanoestructuras aglomeradas debido a la interacción π - π que se da entre los anillos aromáticos de las diferentes moléculas que conforman el ADN. Aunque cabe resaltar que la banda con mayor intensidad es la que denota la formación completa del triángulo de ADN en cada caso.

Respecto a los dos últimos carriles en el gel, la muestra colocada en el carril 7 es la muestra de conjugados de AuNPs:ssDNA. En la imagen en UV de la figura 47 a), se logra observar una banda difusa de aquellas cadenas sencillas que no lograron enlazarse a las nanopartículas de oro. Entre tanto, en la imagen en luz blanca de la figura 47 b) resalta una banda intensa en color rojizo o marrón que corresponde a la aglomeración de las AuNPs conjugadas. En el caso del carril 8, se colocó la muestra de origami con forma triangular más las AuNPs. Cuando se observa en UV se distingue una banda muy tenue que indica la existencia del triángulo de ADN

funcionalizado con AuNPs. La baja intensidad de la banda puede deberse a que la nanoestructura es pequeña, ya que se utiliza la tercera parte del plásmido y al estar rodeada por nanopartículas de oro no permita la total adición del colorante GelRed. En la imagen en luz blanca, es sencillo distinguir la banda que representa al exceso de AuNPs no enlazadas a la nanoestructura. Como se espera, las bandas en los carriles 7 y 8 en la imagen en luz visible se encuentran a la misma altura. Por último, las bandas azules y lilas que aparecen en la imagen b) de la figura 47 son generadas por el colorante GelRed, cuya función es servir de referencia y corroborar que la muestra se desplaza de manera óptima.

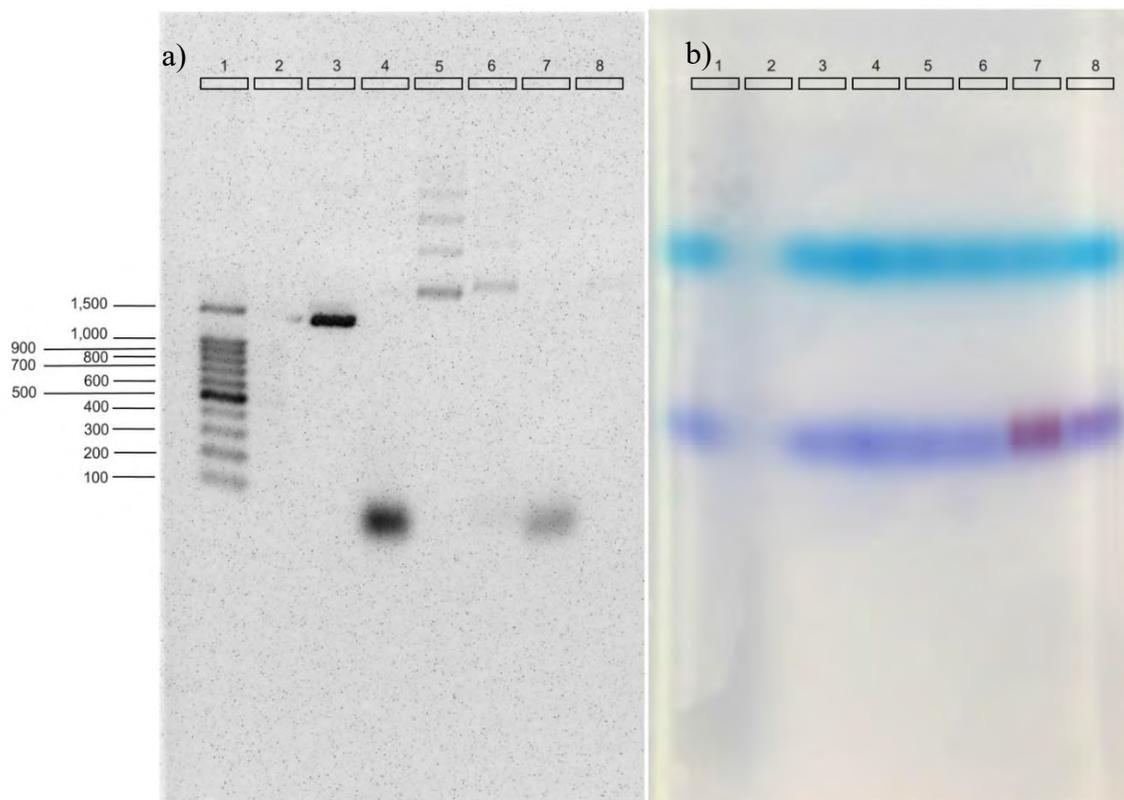


Figura 47. Imágenes de gel de agarosa con las diferentes muestras iluminado usando: a) luz UV y b) luz visible

CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO

- Se planteó y sintetizó una nanoestructura de ADN con forma triangular cuya construcción fue diferente a la reportada por la literatura reciente. Se utilizaron los softwares *ad hoc*, caDNAo y CanDo, para el diseño por la técnica de origami de ADN. El nuevo diseño es más robusto, estable y no está conformado por trapezoides como los anteriores.
- La nanoestructura de ADN con forma triangular fue analizada con la técnica de microscopía de fuerza atómica (AFM) por medio de dos diferentes equipos (Cypher y Nanoscope) en fluido (buffer) y aire, lo que permite concluir que el rendimiento de formación es favorable dado que no se observaron estructuras rasgadas o incompletas.
- Los análisis de las muestras por AFM fueron realizados con seis meses de diferencia, lo que comprueba la estabilidad de la nanoestructura aun si es almacenada bajo condiciones adecuadas por tiempos prolongados.
- Las dimensiones determinadas por AFM a varios triángulos resultaron con una longitud promedio por lado de 72.2 nm y una desviación estándar de 2.1 nm. Esta incertidumbre es razonable ya que se encuentra en el rango de resolución de microscopía de fuerza atómica. El valor promedio es muy parecido a lo predicho por el simulador Autodesk Molecular Viewer.
- La colocación de las nanopartículas de oro en los vértices externos es favorable, dos de los tres sitios elegidos fueron ocupados. Por el contrario, la ocupación de los vértices internos del triángulo por las AuNPs se dificulta por tener una distancia de 20 nm de centro a centro entre ellas, eso sin tomar en cuenta la longitud de las grapas extendidas.

El nuevo diseño permite la variación de la distancia entre nanopartículas y el número de AuNPs que se coloquen.

- La técnica de electroforesis utilizando tanto luz UV como blanca se empleó para comprobar la formación del triángulo de ADN, el triángulo con grapas extendidas y los conjugados origami-AuNPs. Los resultados obtenidos fueron óptimos.

Las propuestas para trabajos futuros son las siguientes:

- Hernández *et al.* han reportado el uso de la proteína C₈-B^{Sso7d} que tiene la propiedad de ligar y recubrir nanoestructuras de origami de ADN con alta afinidad y especificidad. Esta proteína cubre y protege sin condensarse, colapsarse o destruir la disposición espacial del sustrato de ADN. Se caracteriza por tener un dominio de enlace (Sso7d) y un ovrillo de polipéptidos hidrofílicos (C₈) que da mayor solubilidad [76]. Esta macromolécula evitaría la aglomeración π - π que se da entre las nanoestructuras y estudiarlas individualmente.
- Estudios realizados por Esterich *et al.* acerca de la interacción entre AuNPs, la nanoestructura de origami y la proteína antes mencionada, muestran resultados favorables en la colocación de nanopartículas en la estructura. Es decir, se evita la interacción π - π y la deformación de las nanoestructuras en 2D y 3D. Esto se debe a que la proteína neutraliza la carga negativa del ADN, reduciendo la repulsión electrostática que se pueda dar entre las AuNPs y el origami [77]. Esta sería una alternativa prometedora para mejorar el rendimiento de la funcionalización de las nanoestructuras y estudio de nanoestructuras individuales en plasmónica.

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

1. Feynman, R. P. (1959). *There's a Plenty of Room at the Bottom*. Pasadena: Transcription.
2. Eigler , D. M., & Schweizer , E. K. (1990). Positioning Single Atoms with a Scanning Tunnelling Microscope. *Letters to Nature*, 344, 524-526.
3. Whitesides , G. M. (2005). Nanoscience, Nanotechnology, and Chemistry. *Small*, 1(2), 172-179.
4. Fratzl , P., & Winkamer, R. (2007). Nature's Hierarchy of Materials. *Progress in Materials Science*, 52(8), 1263-1334.
5. Dhotel , A., Chen , Z., Delbreih , L., Youssef , B., Saiter , J.-M., & Tan , L. (2013). Molecular Motions in Functional Self-Assembled Nanostructures. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(2), 2303-2333.
6. Zhang , F., Nangreave , J., Liu , Y., & Yan , H. (2014). Structural DNA Nanotechnology: State of the Art and Future Perspective. *Journal of the American Chemical Society*, 136(32), 11198-11211.
7. Editorial. (2011). The Story so Far. *Nature Nanotechnology*, 6, 603.
8. Early , J. M. (2001). Out to Murray Hill to Play: An Early History of Transistors. . *IEEE Transactions on Electron Devices*, 2468-2472.
9. *The history of the Integrated Circuit* . (2017 , mar 29). Retrieved from Nobelprize : http://www.nobelprize.org/educational/physics/integrated_circuit/history/index.html
10. Moore , G. E. (1965). Cramming more Components onto Integrated Circuits. *Proceeding of the IEEE*, 86(1), 82-85.

11. Sneed , A. (2015, Mayo 19). *Moore's Law Keeps Going, Defying Expectations*. Retrieved from Scientific American: <https://www.scientificamerican.com/article/moore-s-law-keeps-going-defying-expectations/>
12. Stewart , M. E., Anderton , C. R., Thompson , L. B., Maria , J., Gray , S. K., ROgers , J. A., & Nuzzo , R. G. (2008). Nanostructured Plasmonic Sensors. *Chemical Reviews*, 108(2), 494-521.
13. Chao , J., Lin , Y., Liu , H., Wang , L., & Fan , C. (2015). DNA-based Plasmonic Nanostructures. *Materialstoday*, 18(6), 326-335.
14. Brown , S., Majikes , J., Martínez , A., Girón , T., Fennell , H., Samano , E., & LaBean , T. (2015). An Easy-to-preepare Mini-scaffold for DNA Origami. *Nanoscale*, 7, 16621-16624.
15. Ralf, Dahm. (2005). Friedrich Miescher and the Discovery of DNA. *Developmental Biology*, 278(2), 274-288.
16. Altmann , R. (1889). Üeber Nucleinsäuren. *Archiv für Anatomie und Physiologie*, 524-536.
17. Kossel , A. (181-186). Üeber die Chemische Zusammensetzung der Zelle. *Archiv für Physiologie*, 4, 1891.
18. Levene , P. A. (1919). The Structure of Yeast Nucleic Acid. *Journal Biological Chemistry*, 40, 415-424.
19. Avery , O. T., MacLeod , C. M., & McCarty , M. (1944). Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types. *The Journal Experimental Medicine*, 79(2), 137-158.
20. Hershey , A. D., & Chase , M. (1952). Independent Functions of Viral Proteins and Nucleic Acid in Growth of Bacteriophage. *Journal of General Physiology*, 36(1), 39-56.

21. Watson , J. D., & Crick , F. H. (1953). Molecular Structure of Nucleic Acids. *Nature*, 171, 737-738.
22. Bryce , C., & Pacini , D. (1991). Isolation and Structure of Nucleic Acids. In C. F. Bryce , *The Structure and Funtion of Nucleci Acids* (pp. 5-17). porstmouth, U. K., portsmouth, U.K.: Biochemical Society.
23. Alberts , B., Johnson , A., Raff , M., Lewis , J., Roberts , K., & Walter , P. (2008). Cells and Genomes. In B. Alberts, *Molecular Biology of the Cell* (pp. 1-5). New York: Garland Science.
24. Woski , S. A., & Schmidt , F. J. (2004). DNA y RNA: Composición y Estructura. In T. M. Devlin , *Bioquímica: Libro de Texto con Aplicaciones Clínicas*. (pp. 27-89). New Jersey: Reverté.
25. Pedersen , R., Machi , A. N., Majikes , J., Nash , J. A., Estrich , N. A., Courson , D. S., . . . LaBean , T. H. (2014). Porperties of DNA. In B. B. a., *Handbook of Nanomaterials Properties* (pp. 1125-1157). New York: Springer.
26. Iqbal , P., Preece , J. A., & Mendes , P. M. (2012). Nanotechnology: the "Top-Down" and "Bottom-Up" Approaches. In P. Iqbal, J. A. Preece, & P. M. Mendes, *Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials* (pp. 1-14). USA: John Wiler & Sons, Lid.
27. Bailey , T., Choi , B. J., Colburn , M., Sreenivasan , S. V., Wilson , C. G., & Ekerd , J. (2004). *US Patent No. US6696220 B2*.
28. Lindsay , S. M. (2010). *Introdution to Nanoscience*. New York: Oxford.
29. Rothmund, P. W. (2006). Design of DNA Origami. *ICCAD '05 Proceedings of the 2005 IEEE/ACM International Conference on Computer-aided Design* (pp. 471-478). San Jose, CA: IEEE Computer Society Washington.

30. Holliday , R. (1964). A Mechanism for Gene Conversion in Fungi. *Genetics Research*, 5(2), 282-304.
31. Welss , P. S. (2008). A Conversation with Prof. Ned Seeman: Founder of DNA Nanotechnology. *American Chemical Society Nano*, 2(6), 1089-1096.
32. Seeman , N. C. (1982). Nucleic Acid Junctions and Lattices. *Journal of Theoretical Biology*, 99(2), 237-247.
33. Cohen , S. N., Chang , A. C., Boyer , H. W., & Helling , R. B. (1973). Construction of Biologically Funtional Bacterial Pasmids In Vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(11), 3240-3244.
34. Wang , X., & Seeman , N. C. (2007). Assembly and Characterization of 8-Arm and 12-Arm DNA Branched Junctions. *Journal American Chemical Society*, 129(26), 8169-8176.
35. Goodman , R., Schaap , I., Tardin , C., Erben , C., Berry , R., Schmidt , C., & Tuberfield , A. (2005). Rapid Chiral Assembly of Rigid DNA Building Block for Molecular Nanofabrication. *Science*, 310(5754), 1661-1665.
36. He , Y., Ye , T., Su , M., Zhang , C., Ribbe , A. E., Jiang , W., & Mao , C. (2008). Hierarchical Self-assembly of DNA Into Symmetric Supramolechular Polyhedra. *Nature Letters*, 452, 198-202.
37. Zhang , C., Su , M., He , Y., Zhao , X., Fang , P.-a., Ribbe , A. E., . . . Mao Chengde . (2008). Conformational Flexibility Facilitates Self-assembly of Complex DNA Nanostructures. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(31), 10665-10669.
38. Seeman, N. C. (1996). The Design and Engineering of Nucleic Acid Nanoscale Assemblies. *Current Opinion in Structural Biology*, 6(4), 519-526.

39. 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-Arm DNA Junctions. *Biopolymers*, 27(9), 1337-1352.
40. Fu , T.-J., & Seeman , N. C. (1993). DNA Double-Crossover Molecules. *Biochemistry*, 32(13), 3211-3220.
41. Shen , Z., Yan , H., Wang , T., & Seeman , N. C. (2004). Paranemic Crossover DNA: a Generalized Holliday Structure with Applications in Nanotechnology. *Journal American Chemical Society*, 126(6), 1666-1674.
42. Seeman , N. C. (2010). Nanomaterials Based on DNA. *Annual Review Biochemistry*, 79, 65-87.
43. Shogo , H., & Murata , S. (2009). Substrate-Assisted Assembly of Interconnected Single-Duplex DNA Nanostructures. *Angewandte Chemie*, 121(37), 6952-6955.
44. Park , S. H., Pistol , C., Ahn , S. J., Reif , J. H., Lebeck , A. R., Lebeck , A. R., . . . LaBean , T. H. (2006). Finite-Size, Fully Addressable DNA Tile Lattices Formed by Hierarchical Assembly Procedures. *Angewandte Chemie*, 118(5), 749-753.
45. Topping , T., Voigt , N. V., Nangreave , J., Yan , H., & Gothelf , K. V. (2011). DNA Origami: a Quantum Leap for Self-assembly of Complex Structures. *Royal Society of Chemistry*, 40, 5636-5646.
46. Rothmund , P. W. (2006). Folding DNA to Create Nanoscale Shapes and Patterns. *Nature*, 440, 297-302.
47. Selnihhin , D., & Andersen , E. S. (2015). Computer-Aided Design of DNA Origami Structures. In M. A. Marchisio , *Computational Methods in Synthetic* (pp. 23-44). Harbin, China: Humana Press.

48. Douglas , S. M., Dietz , H., Liedl , T., Högberg , B., Graf , F., & Shih , W. M. (2009). Self-assembly of DNA Into Nanoscale Three-dimensional Shapes. *Nature*, 459, 414-418.
49. 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), 1-6.
50. Castro , C. E., Kilchherr , F., Kim , D.-N., Shiao , E. L., Wauer , T., Wortmann , P., . . . Dietz , H. (2011). A Primer to Scaffolded DNA Origami. *Nature Methods*, 8(3), 221-229.
51. Stewart , M. E., Anderton , C. R., Thompson , L. B., Maria , J., Gray , S. K., Rogers , J. A., & Nuzzo , R. G. (2008). Nanostructured Plasmonic Sensors. *American Chemical Society*, 108(2), 494-520.
52. Tan , S. J., Campolongo , M. J., Luo , D., & Cheng , W. (2011). Building Plasmonic Nanostructures with DNA. *Nature nanotechnology*, 6, 268-276.
53. Mair, S. A. (2007). *Plasmonics: Fundamentals and Applications*. United Kingdom: Springer Science+Business Media LLC.
54. Kuzyk , A., Schreiber , R., Fan , Z., Pardatscher , G., Roller , E.-M., Högele , A., . . . Liedl , T. (2012, March 12). DNA-based Self-assembly of Chiral Plasmonic Nanostructures with Tailored Optial Response. *Nature Letter*, 483(7389), 311-314.
55. Skoog , D. A., Holler , F. J., & Crouch , S. R. (2008). Electroforesis Capilar, Electrocomatografía Capilar y Fraccionamiento por Flujo y Campo. In D. A. Skoog, F. J. Holler, & S. R. Crouch, *Principios de Análisis Instrumental* (pp. 868-892). México: Cengage Learnin Editores.
56. Tiselius , A. (1937). Electrophoresis of Serum Globulin. *Biochemical Journal*, 31(9), 1464-1477.

57. Whatley , H. (2001). Basic Principles of Capillary Electrophoresis. In J. R. Petersen , & A. A. Mohammad , *Clinical and Forensic Applications of Capillary Electrophoresis* (pp. 21-58). USA: Springer .
58. Dennison , C. (2002). Principles of Electrophoresis. In C. Dennison, *A Guide to Protein Isolation* (pp. 115-149). Netherlands: Springer.
59. López de la Mora , D. A., & Sandoval Rodríguez , A. S. (2013). Electroforesis. In A. S. Montes , A. S. Rodríguez, & J. Armendáriz Borunda , *Biología Molecular: Fundamentos y Aplicaciones en las Ciencias de la Salud*. (pp. 110-120). México: McGraw-Hill Interamericana Editores.
60. Lodish , H., Berk , A., Matsudaira , P., Kaiser , C. A., Krieger , M., Scott , M. P., . . . Danell , J. (2006). Purificación, Detección y Caracterización de las Proteínas. In H. Lodish , A. Berk , P. Matsudaira , C. A. Kaiser , M. Krieger , M. Scott , . . . J. Darnell , *Biología Celular y Molecular* (pp. 86-95). New York: Panamericana.
61. Roberts, G. A., & Dryden , D. T. (2013). DNA Electrophoresis: Historical and Theoretical Perspective. In S. Makovets, *DNA Electrophoresis* (pp. 1-9). New York: Humana Press.
62. Skoog , D. A., West , D. M., Holler, J. D., & Crouch , S. R. (2015). Análisis Espectroquímico. In D. A. Skoog, D. M. West, J. D. Holler, & S. R. Crouch, *Fundamentos de Química Analítica* (pp. 649-802). USA: Cengage Learning Editores.
63. Harris , D. C. (2007). Fundamentals of Spectrophotometry. In D. C. Harris, *Quantitative Chemical Analysis* (pp. 378-401). USA: W. H. Freeman and Company.
64. Olsen , E. D. (1990). *Métodos Ópticos de Análisis*. Spain: Reverté.
65. Krupadanam , D. G., Prasad , V. D., Rao , K. V., Reddy , K., & Sudhakar , C. (2001). Laws of Absorption of Radiation. In D. G. Krupadanam, V. D. Prasad, K. V. Rao, K. L. Reddy,

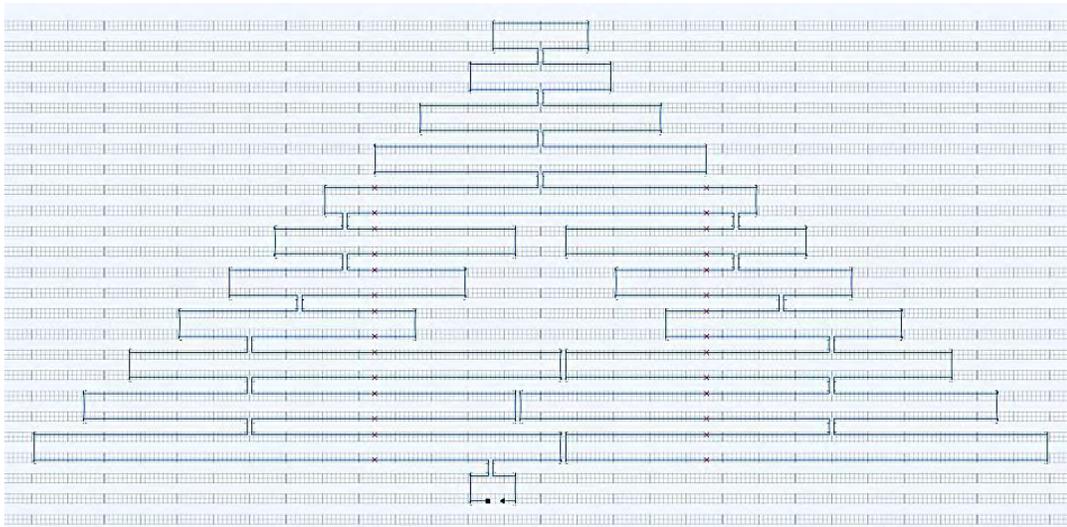
- & C. Sudhakar, *Analytical Chemistry* (pp. 126-130). India: Orient Longman Private Limited.
66. Scientific, T. (2009). NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer User Manual. . Wilmington , DE , USA.
67. Binning , G., & Quate , C. (1986). Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters*, 56(9), 930-934.
68. Ricci , D., & Braga , P. (2004). The Basics of Atomic Force Microscopy. In D. Ricci, & P. C. Braga, *Atomic Force Microscopy* (pp. 1-39). New Jersey: Humana Press.
69. Giessibl , F. J., & Quate , C. F. (2006). Exploring the Nanoworld with Atomic Force Microscopy. *Physics Today*, 59(12), 44-50.
70. Eaton , P., & West , P. (2010). AFM instrumentation. In P. Eaton, & P. West, *Atomic Force Microscopy* (pp. 9-46). New Yotk: Oxford University Press.
71. Haugstad , G. (2012). Overview of AFM. In G. Haugstad, *Atomic Force Microscopy: Understanding Basic Modes and Advanced Applications* (pp. 1-32). USA: John Wiley & Sons, Inc.
72. Johnson , D., Hilal , N., & Bowen , W. R. (2009). Basic Principles of Atomic Force Microscopy. In D. Johnson, N. Hilal, & W. R. Bowen, *Atomic Focce Microscopy in Process Engineering* (pp. 2-24). USA: Elsevier.
73. Putman , C. A., Van der Werf , K. O., De Grooth , B. G., Van Hulst , N. F., & Greve , J. (1994). Tapping Mode Atomic Force Microscopy in Liquid. *Applied Physics Letters*, 64(13), 2454-2457.

74. Ding , B., Deng , Z., Yan , H., Cabrini , S., Zuckermann , R. N., & Bokor , J. (2010). Gold Nanoparticles Self-Similar Chain Structure Organized by DNA origami. *Journal of the American Chemical Society*, *132*(10), 3248-3249.
75. Wang , M., Zyracki , M., Kimoto , A., Tinnus , M., Parker , D., Jones , P., . . . Groban , E. (2017, 6 7). *Autodesk Molecule Viewer*. Retrieved from moleculeviewer.lifesciences.autodesk.com:
<http://moleculeviewer.lifesciences.autodesk.com>.
76. Hernandez- Garcia , A., Esterich , A. N., Werten , M. W., Van Der Maarel , J. R., LaBean , T. H., de Wolf , F. A., . . . de Vries , R. (2016). Precise Coating of a Wide Range of DNA Templates by a Protein Polymer with a DNA Binding Domain . *ACS Nano* , *11*, 144-152.
77. Esterich , N. A., Hernandez-Garcia , A., de Vries , R., & LaBean , T. H. (2017). Engineered Diblock Polypeptides Improve DNA and Gold Solubility during Molecular Assembly. *ACSNano*, *11*, 831-842.

APENDICE

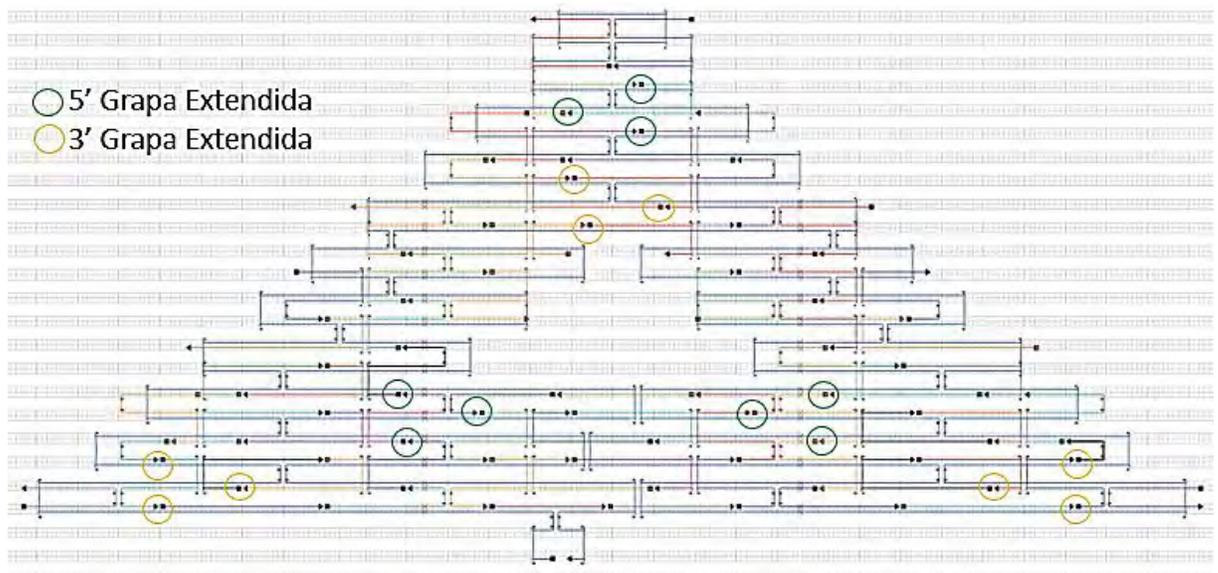
APÉNDICE A: BOSQUEJO DEL ANDAMIO

En la imagen se muestra el “barrido” continuo del andamio (línea azul) para formar el triángulo basado en la tercera parte del plásmido M13mp18 (2,404 nt).



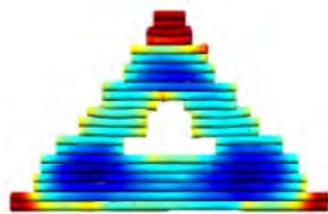
APÉNDICE B: DISEÑO caDNano

Diseño del triángulo en caDNano, en la imagen se muestran todas las grapas complementarias (líneas de colores) y los sitios elegidos para el enlace de las AuNPs funcionalizadas. Los círculos en color verde y amarillo indican las grapas que se extendieron en la dirección 5' y 3', respectivamente.



APÉNDICE C: SIMULACIONES CanDo

Archivo generado por CanDo, en el cual muestra una simulación en 3D de la estructura diseñada en caDNAno, además de una barra de fluctuaciones térmicas que va desde 1.3 a 4.2 nm. El color azul destaca la parte más estable de la nanoestructura, mientras el rojo lugares con más tensión.



CanDo



APÉNDICE D: SECUENCIA DEL MINI-M13MP18

ACGCGCCCTGTAGCGGCGCTTTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTT
GCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCTTTCTCGCCACGTTCCGCCGGCTTTCCCC
GTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAA
AACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGT
TGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCT
ATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAA
AATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGCTTACAATTTCCATTTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTG
TTGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACTCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGT
AATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAA
GGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATC
ACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCC
CCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCTGTTCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTC
CCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCT
CCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTC
TTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGA
GCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAAC
AGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGG
CAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAG
GATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACACTCACGTTAA
GGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTA AAAATGAAGTTT
TAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCAC
CTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGAT
ACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAG
ATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCC
TCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAAC
GTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGT

TCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCC
TCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTC
TCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGA
ATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCA
GAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCGCTG
TTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGC
GTTTCTGGGTGAGCAAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAA
ATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGC
GGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGT
GCCACCTG

APÉNDICE E: LISTADO DE SECUENCIA DE GRAPAS PARA FORMAR EL TRIANGULO DE ADN

Nombre	Secuencia	Longitud	Extinction Coefficient L/(mole·cm)	Abs.	[uMol]
TK_4[135]_6 [128]	TGTGGATAACCTTTTTTTTTGTATTACCGCGAA GAGGC	40	375400	89.178	237.55
TK_5[157]_6 [143]	TATCTTTATAGCTTCCAGGGGAAACGCCGCTCG AG	36	342500	73.547	214.74
TK_16[223]_15 [207]	GTGGCGATTAATACTGGAGCCGGTGCTGGTTT	32	303200	63.673	210.00
TK_21[64]_2 [95]	GGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCA	32	307500	64.824	210.81
TK_21[128]_21 [95]	TAAAGCGCCGCTATTTTCGGGGA	23	220000	50.189	228.13
TK_19[128]_21 [127]	GAGTATTCTTTTCTAAATACATTGCCGCGCT	32	297200	65.41	220.09
TK_17[179]_16 [168]	TTATCGGTATCATTGCAGCAC	21	200000	45.393	226.97
TK_18[111]_16 [111]	TTCCTGTAAAGATGCTGAAGATCGAACGTTT	31	299400	64.085	214.04
TK_17[126]_19 [127]	GTGCACGAGTTCCTTTTTGCGGCAAAGAGTAT	34	321200	67.939	211.52
TK_19[242]_18 [237]	CTAGTGTAGCCACCAC	17	160900	36.974	229.79
TK_16[79]_15 [95]	CAACGTCATCCACTATTAAGAAGTTCTGCTA	32	309000	67.27	217.70
TK_21[37]_20 [37]	TTTTGGAAGGGAAGAAAAGCGCAACGTGGCGAG AAATTTT	40	405300	83.525	206.08
TK_18[159]_17 [143]	GTCAGACCAAGTTGTCGCCCTTATGGGTACA	32	306400	64.178	209.46
TK_20[225]_19 [210]	GGCTTCAGCATTTTGATAATCTCATGTCTAGGTGA AG	37	358200	76.396	213.28

TK_18[191]_20[192]	TAGGTGCTTTAATTTAAAAGGAACCAAAAT	30	308600	65.404	211.94
TK_13[209]_11[213]	GGCGCAGGAACGGGGGGTTCGTGAGCTTGAGC GTTT	37	354400	72.953	205.85
TK_0[167]_2[152]	TTTTTCAGCAACGCGGTGGAAAAACGCTTTT GGGGGCGGAGCCTA	48	461100	97.128	210.64
TK_4[142]_3[156]	CTGATTCCACATGTTCTTTCCTGTTTG	28	244500	54.455	222.72
TK_20[266]_21[266]	TTTTCGGATCAAGAGCTACCGCGGTGGTTT CTTT	40	364600	75.633	207.44
TK_8[202]_10[192]	TTTTATACCTACAGCGTGATTGGGAACCGCTGAG CCGAAGAG	42	409000	82.042	200.59
TK_18[236]_16[232]	TTCAATGCTAATCCTGTTTTTTTTTTTACCAGTGG C	37	332300	71.946	216.51
TK_16[71]_18[66]	AAGGGCGAAAATTTTTTTTACCCTATCAAAT CAA	38	374100	72.722	194.39
TK_20[159]_19[143]	TCACGCGGAACCCCTATTTGTTTAAACATTC	32	296800	63.601	214.29
TK_11[176]_9[175]	GGCAACAAAAGCCATACCAAACGATAACTCGC	32	320700	63.887	199.21
TK_19[176]_17[178]	ACTTCATTCTCACTGATTAAGCATCCGTATCGTAG	35	334000	89.16	266.95
TK_9[128]_11[127]	AAGGAGCTATAACACTGCGGCCAAAGTAAGAG	32	332200	70.748	212.97
TK_17[96]_18[80]	GAAAGTAATTTTGCTCACCCAGAACGTGAACC	32	314400	71.108	226.17
TK_13[168]_11[175]	TAGCTTCCCGCAACAGGCGAACTACTTACTCGT AGCAAT	40	379700	85.066	224.03
TK_12[111]_10[112]	CGGCAAAAATCGGATGGCATGACCTTACTT	30	289700	65.405	225.77
TK_10[143]_9[146]	CATGAGTGAACCGCTTTTT	19	176600	40.669	230.29
TK_14[110]_12[112]	ACTCGGTACTATTCTCAGAATGCATCTTA	29	279200	63.744	228.31
TK_16[167]_16[141]	TGGGGCCAGATCAACAGCGGTAAGATC	27	269800	57.155	211.84
TK_16[140]_17[125]	CTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAAGTTGG	27	253700	57.379	226.17
TK_10[191]_12[192]	CTGAATGCGTTGCGCAAAGCCCCACACT	30	277000	61.476	221.94
TK_16[193]_18[192]	GGGTCTCGCTACACGACGGGGAGTCGCTGAGA	32	309700	64.148	207.13
TK_15[96]_16[80]	TGTGGCGCATGAGCACTTTTAAAGGTGGACTC	32	305400	61.669	201.93
TK_10[111]_8[101]	CTGAGCTCAAATCACAACGATCGGTTAAATTT TGTTTTT	44	395000	82.432	208.69
TK_21[96]_20[112]	CGCTGCGGTAACCACCACCCCCAAATAT	30	278700	61.751	221.57
TK_14[234]_13[208]	TTTTGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGCGG ATGGAGGATAA	45	450600	100.137	222.23
TK_17[144]_18[160]	TCGAACTGGATCTGGTAAGCCCTCTGGTAACT	32	300900	61.924	205.80
TK_21[151]_21[175]	AATGTGGACCCGTAGAAAAGATCA	25	260200	57.76	221.98
TK_9[176]_6[176]	CTTGATCGGCTATGAGAAGCGCCACCGGTAAGCG GCAGGGAGAGCGCA	48	469800	100.61	214.15
TK_20[111]_18[112]	GTATCCGCTAATATTGAAAAAGTTTTGCC	30	293700	57.713	196.50
TK_21[208]_21[241]	CGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCCCG	34	328600	71.342	217.11

TK_21[176]_19[175]	AAGGATCTCGTGAGTTTTTCGTTCCGATTTAAA	32	312500	69.759	223.23
TK_19[64]_21[63]	ACTAAATCTGACGGGAAAGCCGGAAAGGAGC	32	329200	72.849	221.29
TK_11[90]_13[95]	TTTTAATAGCCGAATCCCTTATAAATCAAAGAG ATAGG	43	398200	75.372	189.28
TK_19[211]_20[226]	ATCCTGAGCGCAGATACCAAAGTAACT	27	270100	58.219	215.55
TK_3[157]_4[143]	TGATGCTCGTCTGACTTGAGCGTCGATCGTTATCC C	36	328600	67.744	206.16
TK_20[191]_21[207]	CCCTTAATCTTGAGATCCTTTTTTCTGCG	30	263300	55.258	209.87
TK_13[96]_14[69]	G TTCATACCGCCGGAGTGTTGTTCCAGTTTGAA CAAGAGTTTT	44	420900	82.882	196.92
TK_21[242]_19[241]	CTACCAAACCTTTTTCCGAAGTACTGTTCTT	32	289700	68.805	237.50
TK_6[127]_9[127]	CCGCACCGCCAACAGTTGCGCAGCATTTTGTTAA AATTCGGAGGACCG	48	453700	103.206	227.48
TK_12[191]_14[194]	ATTA ACTATTAATAGACTGGATAAAGTT	28	293500	62.601	213.29
TK_19[144]_20[160]	CGTTACTCATATATACTTTAGATTACTGAGCG	32	312400	66.979	214.40
TK_16[110]_14[111]	TCCAATGGGTATTATCCCGTATCAAGAGCA	30	297100	58.912	198.29
TK_8[161]_7[143]	CCGAAGGGAGAATTGTAAGCGTTAATCTGAATGG	34	346800	74.218	214.01
TK_18[225]_17[210]	TGTAGCACCGAACGAAATAGACAGATCAGGCAA CTAT	37	379400	80.715	212.74
TK_6[175]_4[168]	CGAGGGAGTCCTGTCGGGTTTTTTTTTTTTTCGCC ACCTC	40	352100	73.601	209.03
TK_9[147]_10[162]	TGCACAACATGGGGATCATGCGAGCG	27	265000	57.534	217.11
TK_17[211]_18[226]	GGATGCCTACATACCTCGCTCGAACTC	27	248200	57.107	230.08
TK_7[144]_8[162]	CGAATGGAAAAGCGGACAGGTATCGCTTC	30	298900	63.414	212.16
TK_18[65]_19[63]	GTTTTTTGGGCGTAAAGC	18	170600	39.087	229.11
TK_18[79]_17[95]	ATCACCTGGGCGATGGCCCACTAACGCTGGT	32	294600	69.037	234.34
TK_11[128]_13[135]	AATTATGCACCAGTCACAGAAAAGACTTGGTTGA GTACTC	40	400200	83.503	208.65
TK_14[193]_16[194]	GCAGGACCACGGCCCTCCGGCTGGAGCGT	30	272700	59.85	219.47
TK_2[151]_0[136]	TTGCTGGCCTTTTGCTTTTTTTTCCTGGCCTTCCTT TTTACGGTTTTT	48	396800	84.306	212.46
TK_6[142]_5[156]	TAATAGCTTTGAGTGAGCTGATACCTGG	28	274100	58.192	212.30
TK_19[96]_20[80]	TGCTTCAATCATGAGACAATAACCCCCCGAT	32	304100	65.035	213.86
TK_15[208]_16[224]	ATTGCTGAAAGTCGTGTCTTACCGTGTGCCA	32	298400	66.776	223.78
TK_20[79]_19[95]	TTAGAGCTGGAACCCTAAAGGGAGCTGATAAA	32	328200	70.917	216.08

APÉNDICE F: LISTADO DE GRAPAS EXTENDIDAS

Grapa Exte Nombre	Secuencia	Longitud	Extinction Coefficient L/(mole·cm)	Abs.	[uMol]
TKext_5[157]_ 6[143]	AATAATAATAATAATTTTTATCTTTA TAGCTTCCAGGGGGAAACGCCGCTC GAG	55	545500	67.932	124.53
TKext_4[142]_ 3[156]	AATAATAATAATAATTTTTCTGATTC CACATGTTCTTTCTGTTTTG	47	448200	54.447	121.48
TKext_3[157]_ 4[143]	AATAATAATAATAATTTTTGATGCT CGTCTGACTTGAGCGTCGATCGTTAT CCC	55	531600	64.468	121.27
TKext_10[143]_ 9[146]	CATGAGTGAACCGCTTTTTTTTTAAA AAAAAAAAAAAAA	40	391700	47.805	122.04
TKext_9[147]_ 10[162]	TGCACAACATGGGGGATCATGCGAG CGTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAA	46	480500	59.661	124.16
TKext_7[144]_ 8[162]	CGAATGGAAAAGGCGGACAGGTATC GCTTCTTTAAAAAAAAAAAAAAAAA	49	513700	61.674	120.06
TKext_17[179]_ 16[168]	AATAATAATAATAATTTTTTATCGG TATCATTGCAGCAC	40	403000	51.948	128.90
TKext_16[193]_ 18[192]	AATAATAATAATAATTTTTGGGTCTC GCTACACGACGGGGAGTCGCTGAGA	51	512100	60.649	118.43
TKext_14[193]_ 16[194]	AATAATAATAATAATTTTTGCAGGAC CACGGCCCTCCGGCTGGAGCGT	49	475100	55.749	117.34
TKext_17[126]_ 19[127]	AATAATAATAATAATTTTTGTGCACG AGTTCCTTTTTGCGGCAAAGAGTA T	53	523600	63.185	120.67
TKext_14[110]_ 12[112]	AATAATAATAATAATTTTTACTCGGT ACTATTCTCAGAATGCATCTTA	48	482100	60.805	126.13
TKext_16[110]_ 14[111]	AATAATAATAATAATTTTTCCAATG GGTATTATCCCGTATCAAGAGCA	49	500100	62.969	125.91
TKext_21[208]_ 21[241]	CGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAA AACCACCGTTTTAAAAAAAAAAAAA AA	53	544100	67.058	123.25
TKext_19[211]_ 20[226]	ATCCTGAGCGCAGATACCAAAGTAA CTTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAA	46	485200	60.707	125.12
TKext_21[242]_ 19[241]	CTACCAAACCTTTTTCCGAAGTACT GTTCTTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAA	51	504800	62.079	122.98

TKext_19[64]_ 21[63]	ACTAAATCTGACGGGGAAAGCCGGA AAGGAGCTTTTAAAAAAAAAAAAAAAA A	51	544000	66.306	121.89
TKext_18[65]_ 19[63]	GTTTTTTGGGCGTAAAGCTTTTAAAA AAAAAAAAAAAA	37	385400	48.72	126.41
TKext_19[96]_ 20[80]	TGCTTCAATCATGAGACAATAACCCC CCCGATTTTAAAAAAAAAAAAAAAA	51	519200	64.318	123.88

APÉNDICE G: SUGERENCIAS DE DISEÑO

- a) El fenómeno químico “ π - π stacking” en inglés o “apilamiento π ” se da por la interacción atractiva no covalente entre los anillos aromáticos del azúcar y las bases que componen el ADN; por tanto, es conveniente que en la periferia se extiendan las grapas por lo menos 5 nucleótidos, timinas de preferencia. Otra alternativa es evitar que las grapas queden al límite del andamio, es decir, reducir su longitud 4 o 5 nucleótidos antes del límite.
- b) Las grapas seleccionadas para enlazar a las nanopartículas de oro deben de estar orientados hacia la misma dirección, es decir, que la distancia entre cada sitio sea un número entero de vuelta. Se puede utilizar Maya o algún otro programa que simule la doble hélice del diseño.
- c) En la sección 2.4.3.1, se describe la costura que crea el andamio (donde cambia de dirección). La costura debe ser sujeta por las grapas para conferir más estabilidad a la nanoestructura.
- d) Cuando se realice la orden de oligonucleótidos a IDT u otra compañía’, es recomendable solicitarlos hidratados a la concentración que se desee.
- e) Las grapas que cubren a la nanopartícula de oro se ordenan tioladas (-SH) y las grapas que se extendieron se les agregan cinco timinas entre la secuencia de la grapa y la secuencia de enlace. Esto se realiza con el fin de reducir la repulsión entre las AuNPs y la nanoestructura de ADN, debido a las cargas negativas que ambos presentan.

APÉNDICE H: HIDRATACIÓN DE GRAPAS

A continuación, se mencionan algunos puntos adicionales que se recomienda tomar en cuenta:

- Cuando se realice el cálculo de volumen necesario para alcanzar cierta concentración molar que esta concentración sea mayor a la deseada; es decir, si se requieren 100 nM el cálculo sería para 150 nM. Así, será más fácil agregar solvente que soluto en caso que las concentraciones sean diferentes.
- Si se utilizan oligonucleótidos que han estado almacenados por un período de más de 6 meses; es común que la concentración aumente considerablemente. Esto se debe a la pérdida de solvente por diferentes fenómenos físicos. En caso que la molaridad de alguna grapa de ADN es baja en comparación con el resto; esta última se utiliza de referencia para asemejar la concentración molar de todas las grapas.
- Ante de realizar mediciones en Nanodrop es importante mezclar bien la muestra para tomar una alícuota representativa y limpiar el Nanodrop después de cada medición, ya que esto puede alterar el resultado.
- El coeficiente de extinción correspondiente a cada oligonucleótido lo proporciona la empresa IDT que realizó la síntesis.