



POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE
MATERIALES

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES

**“Síntesis de nanoalambres utilizando
ADN como mediador”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIA
E INGENIERÍA DE MATERIALES**

P R E S E N T A

**FIS. MARIANA JEANNETE OVIEDO
BANDERA**

Tutor: Dr. Enrique Cuauhtemoc Samano Tirado.

Ensenada, B.C., México.

2007





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.

AGRADECIMIENTOS

Principalmente agradezco a Dios por haberme permitido vivir, desarrollarme y formarme durante este tiempo de estudio.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por el apoyo, las oportunidades, las actividades y los espacios que ofrece. Es para mi un honor haberme formado en el Centro de Ciencias de la Materia Condensada. Gracias también al Consejo Nacional para la Ciencia y la Tecnología CONACYT, por el apoyo económico que me brindó durante mis estudios de maestría (2005-2007), haciendo posible la elaboración de este trabajo.

Estoy profundamente agradecida con mis padres. Por su amor, por la vida, por su trabajo y apoyo constante para brindarme la mejor educación. Con mi hermano Edi en particular estoy agradecida por la forma en que siempre me demuestra su apoyo y su amor incondicional, con Júnior mi hermano por su respaldo y amor a pesar de la distancia y mi abuela por su gran amor y constancia en recordarme el “ya mero terminas”. Familia desde lo más profundo de mi corazón les digo gracias, los amo. A mis hermosas sobrinas y sobrino gracias por inspirarme para querer luchar cada día más. A mi cuñada Ericka por escucharme.

Al Dr. Enrique Sámano Tirado le agradezco su amistad, constancia, compromiso y su cuidadosa lectura de mi tesis. Al Dr. Leonel Cota Araiza por su dedicación y las múltiples aportaciones que hizo a este trabajo. Al Dr. Facundo Márquez Rocha. A los miembros de mi jurado: Drs. Manuel Herrera, Maria del Pilar Sánchez Saavedra, Maria de la Paz Cruz Jáuregui y Gilberto Jerónimo Moreno por su minuciosa lectura e importantes contribuciones.

A mis profesores de la maestría en general por una formación que me deja más que satisfecha.

A mis compañeros, en especial a Fátima, Gisel, Vikky, Jorge, René, Anita, por el apoyo que me dieron a lo largo de toda la maestría.

A Isidro por siempre apoyarme y acompañarme en esta etapa de mi vida como lo ha hecho en todas desde que lo conozco.

A Laura y Fer por ser mis grandes amigas, por su compañía y por estar conmigo desde el primer día en que nos conocimos. Anais por su amistad y apoyo.

A mis compañeros y profesores de la licenciatura en especial al Dr. Machorro a quien admiro profundamente.

A Griselda Pablo por todo su apoyo administrativo durante mi maestría y por contagiarme siempre con su especial y único carácter de sencillez, felicidad y disponibilidad para los demás.

A todos los investigadores que acudí para emprender esta nueva etapa de mi vida.



















A Mariscos “La Guerrerense” por darme de comer y trabajo todos estos años de mi bella vida.

Gracias a la Física, a la vida, a Dios.

La pregunta clásica: “¿Qué fue primero, el huevo o la gallina?” tiene una clara respuesta y nos da claves para decidir cuándo algo está vivo o no. El huevo fue primero no sólo porque los antepasados reptiles de todas las aves ponían huevos, sino sobre todo porque lo único que realmente define a un ser vivo es que tiene capacidad de replicarse y de crear orden. La pregunta posgenómica sería: ¿Qué fue primero, el ARN o el ADN?

Carlos Chimal en *Genómica, ¿Un salto al vacío?*, 2001.

ÍNDICE

	Agradecimientos.....	v
	Resumen.....	x
	Abstract.....	xi
	Capítulo I: INTRODUCCIÓN.....	1
	Introducción.....	1
	Hipótesis y objetivos.....	6
	Capítulo II: ANTECEDENTES.....	7
	II.1 CONCEPTOS FÍSICOS.....	7
	II.1.1 Conductividad eléctrica.....	7
	II.1.2 Teoría de bandas.....	11
	II.1.3 Semiconductores.....	15
	II.1.4 De válvulas a transistores.....	24
	II.1.5 Fotolitografía.....	26
	II.1.6 Litografía molecular.....	28
	II.2 CONCEPTOS BIOMOLECULARES.....	32
	II.2.1 Molécula de ADN.....	33
	II.2.2 Bacteriófago lambda.....	37
	II.2.3 Proteína <i>RecA</i>	38



**Capítulo III:
TECNICAS EXPERIMENTALES..... 40**



III.1 Electroforesis..... 41



III.2 Observación de geles en UV..... 45



III.3 Microscopía electrónica de barrido y Microscopía de Fuerza Atómica..... 46



III.4 Caracterización elemental..... 55



**Capítulo IV:
PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS..... 58**



IV.1 Polimerización y recombinación homóloga..... 59



IV.2 Tinción de gel con bromuro de etidio..... 65



IV.3 Morfología..... 68



**Capítulo V:
DISCUSIONES..... 81**



**Capítulo VI:
CONCLUSIONES..... 88**



LITERATURA CITADA..... 89

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Gráfica de la ley de Moore.....	2
Figura 2. Esquema de un alambre conductor.....	10
Figura 3. Niveles ocupados y nivel de Fermi a 0 K.....	13
Figura 4. Diagrama de bandas de conductores, semiconductores y aislantes.....	14
Figura 5. Diagrama de la red y esquema de bandas del Ge al que se le ha agregado impurezas de As (\ominus) para doparlo.....	17
Figura 6. Diagrama de la red y esquema de bandas del Ge al que se le ha agregado impurezas de B (\oplus) para doparlo.....	18
Figura 7. Brecha de energía del Si, Ge y GaAs como función de la temperatura.....	19
Figura 8. Niveles de energía de una unión p-n sin voltaje aplicado.....	20
Figura 9. Representación de una unión p-n de semiconductores. (A) antes del contacto entre semiconductores. (B) después del contacto y la formación de la zona neutra.....	21
Figura 10. Representación esquemático de una unión p-n. A) voltaje con polarización invertida y B) cambio de polarización.....	22
Figura 11. Gráfica de V vs I de un rectificador.....	22
Figura 12. Válvula de vacío.....	25
Figura 13. Mecanismo propuesto para la reducción por aldehídos.....	30
Figura 14. Recombinación homóloga de csADN con una proteína.....	30
Figura 15. Litografía molecular con plata a lo largo del ADN recombinado.....	30
Figura 16. Estructura de una doble cadena de ADN.....	34
Figura 17. Estructura helicoidal del ADN.....	35
Figura 18. Micrografía electrónica del bacteriófago lambda.....	37
Figura 19. Proteína <i>RecA</i> recombinada con una doble cadena de ADN.....	39
Figura 20. Esquema de un aparato para electroforesis vertical de poliacrilamida.....	43
Figura 21. Montaje experimental para la electroforesis de un gel de agarosa.....	44
Figura 22. Partes que componen el Microscopio de Fuerza Atómica.....	47
Figura 23. Piezoeléctrico.....	48
Figura 24. Esquematización del movimiento del piezoeléctrico.....	49
Figura 25. Láser (1), prisma (2), portacantilever (3), espejo inclinado (4), fotodetector (5), cantilever (6).....	50
Figura 26. Cantilever comercial.....	50
Figura 27. Diagrama esquemático mostrando la interacción de la punta con la superficie de la muestra en el modo “tapping”(a) y amplificación en “resolución atómica” de esta interacción (b).....	52
Figura 28. Componentes de una celda para fluidos.....	53
Figura 29. Corte seccional esquemático de la celda de fluidos.....	54
Figura 30. Ionización de un átomo y emisión de un fotón.....	56
Figura 31. Relación entre energía y el número atómico.....	57
Figura 32. Esquema de la reacción de recombinación homóloga y litografía molecular.....	59
Figura 33. ADN- λ digerido con <i>HindIII</i> en un gel de agarosa al 1%.....	60
Figura 34. Resultados de electroforesis de poliacrilamida al 7% teñido con bromuro de etidio.....	66

Figura 35. Detalle de la región de interés de la figura 34.....	66
Figura 36. Resultados del gel de agarosa al 1%.....	67
Figura 37. Diagrama esquemático mostrando el montaje de una muestra para ser observada por AFM en fluido.....	68
Figura 38. Imagen de nucleótidos formados por ADN-lambda digerido con HindIII a una escala de 1 μm	69
Figura 39. Imagen de nucleótidos formados por 2027pb a una escala de 500 nm....	69
Figura 40. Imagen de buffer de depósito sin ADN-lambda.....	70
Figura 41. Imagen de la unión “Holliday” debido a la recombinación entre la nucleoproteína y la doble cadena de ADN-lambda.....	72
Figura 42. Acercamiento a la unión “Holliday” mostrada en la figura 41.....	72
Figura 43. Imagen de AFM a una escala horizontal de 5 μm de una fibra de ADN-lambda antes de ser metalizada.....	73
Figura 44. Imagen por AFM a escala horizontal de 5 μm de una metalización de ADN-lambda recombinado con <i>RecA</i> a una concentración de 5 ng/ μl	73
Figura 45. Imagen de SEM de islas de plata a lo largo de una doble cadena de ADN con una barra de escala de 4 μm	74
Figura 46. Nanoalambre de plata con una barra de escala de 4 μm	74
Figura 47. Nanoalambre continuo observado por AFM a una escala de 5 μm	75
Figura 48. Acercamiento a los nanoalambres de la Figura 46, la escala de la barra es de 800nm.....	76
Figura 49. Imagen por AFM de diferentes nanoalambres continuos de plata.....	76
Figura 50. Composición química de los nanoalambres observados en la figura 46..	77
Figura 51. Nanoalambre continuo de plata con una barra de escala de 4 μm	78
Figura 52. Análisis por EDS del nanoalambre observado en la figura 51.....	79
Figura 53. Imagen de ADN metalizado con una barra de escala de 1 μm	79
Figura 54. Análisis de composición química de la figura 53.....	80
Figura 55. Fibra de ADN obtenida por Keren <i>et al.</i> La barra de escala es de 500nm	83
Figura 56. Imagen de SEM de las islas de Ag a lo larga del ADN a una escala de barra de 200nm.....	84
Figura 57. Nanoalambre observado por SEM.....	85
Figura 58. Análisis de sección transversal de un nanoalambre de plata. La imagen mostrada en la parte inferior izquierda tiene una escala de 2 μm x 2 μm	87
Figura 59. Análisis de sección transversal de un nanoalambre. La imagen mostrada en la parte inferior izquierda tiene dimensiones de 5 μm x 5 μm	87

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resistividad ρ y brecha de energía de algunos materiales comunes a 20°C.....	8
Tabla 2. Concentraciones atómicas relativas de los cuatro elementos detectados por EDS.....	80

RESUMEN

Síntesis de nanoalambres usando ADN como mediador.

La construcción de dispositivos electrónicos a escala de micrómetros (μm) o nanómetros (nm) usando el ADN (ácido desoxirribonucleico) como intermediario puede tener un impacto sorprendente en nanotecnología. Estos dispositivos pueden tener aplicaciones en sistemas nanoelectromecánicos (NEMS) y biosensores. De aquí que la industria electrónica está muy interesada en explorar nuevos métodos de nanofabricación para así continuar su evolución de microelectrónica a nanoelectrónica, dispositivos electrónicos de dimensiones moleculares. Una alternativa muy interesante sería el ensamble de componentes electrónicas mediadas por biomoléculas, llamada litografía molecular. Esta tecnología no es novedosa ya que la Naturaleza ha estado llevando a cabo la manipulación y ensamble de biomoléculas, tales como ADN y proteínas, con alta eficiencia y exactitud de una manera muy específica desde hace varios miles de millones de años.

Nuestro objetivo es utilizar al ADN como andamio para la síntesis de nanoalambres. A grandes rasgos, litografía molecular se basa en las siguientes etapas. Primeramente, se polimerizó una cadena sencilla de ADN-lambda formando un filamento de nucleoproteína con la proteína *RecA*, después se recombinó el filamento sobre una cadena doble de ADN previamente derivada con aldehído, en una secuencia homóloga específica. Para después metalizar el ADN recombinado usando una solución de AgNO_3 para formar nanoalambres continuos de Ag a lo largo de la doble cadena de ADN-lambda recombinado.

ABSTRACT

Synthesis of nanowires using DNA as a scaffold

The construction of electronic devices at micrometer or nanometer scale using DNA as a scaffold might have a surprising impact in nanotechnology. These devices could have applications in nanoelectromechanical systems and biosensors. The, electronic industry is interested in exploring new nanofabrication methods to continue its evolution from micro to nano-electronics, i.e, electronic devices of molecular dimensions. One interesting approach would be the integration of electronic components using biomolecules as mediators, named molecular lithography. This technology is not a novelty because mother nature has been manipulating and joining biomolecules, such as DNA and proteins, with high efficiency and accuracy in a very specific way for billions of years.

The object of this work is the synthesis of nanowires using DNA as scaffold by means of molecular lithography. Molecular lithography is based in the next steps. Firstly, a ssDNA is polymerized by the *RecA* protein to form a nucleoprotein filament. Then, the filament is recombined on a specific site of the dsDNA in an homologous specific sequence. Finally, the recombined DNA is fixed and stretched on a substrate and placed in a AgNO_3 solution to produce continuous Ag nanowires along the DNA's.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

Desde la invención del transistor y el posterior desarrollo de circuitos integrados, se ha vuelto necesario fabricar objetos de uso diario más pequeños, más portátiles, fáciles de manipular y maniobrar. En este ímpetu de elaboración de productos, se genera una tendencia hacia la miniaturización. Esta tendencia ha tomado una nueva dimensión en los últimos años, materiales con características estructurales de tamaño entre 1-100 nanómetros, un nanómetro es igual a 10^{-9} m y es 80, 000 veces más pequeño que el grosor de un cabello humano, conocidos como nanomateriales. Un enfoque moderno en la fabricación de nanomateriales es una aproximación con tendencia hacia la amplificación, iniciando con bloques de construcción a escala atómica y ensamblados de manera controlada. Se ha desarrollado una técnica para crear productos compuestos por nanomateriales, por lo que se le ha llamado Nanotecnología. La nanotecnología es la fabricación de materiales funcionales, dispositivos y sistemas controlando la materia a escala nanométrica y explorando fenómenos novedosos que conduzcan a una diversidad de propiedades físicas, químicas y biológicas a esa escala. Cuando se manipula o sintetiza la materia a escala atómica y molecular, surgen fenómenos y propiedades totalmente nuevas, tales como la cuantización de la conductividad, el autoensamble molecular, la corriente de espín polarizado entre otras. El control de la síntesis y propiedades deseables de materiales nanométricos es primordial para el desarrollo de prototipos con gran mercado potencial, como la electrónica.

La innovación en la industria electrónica ocurrirá cuando se logre la transformación de componentes a escala micrométrica, tales como transistores, diodos, relevadores (relays), etc, hacia dispositivos nanométricos. Así mismo, los dispositivos

electrónicos continuamente han incrementado su rapidez de procesamiento y complejidad. La ley de Moore, véase Figura 1, que predice un incremento de dos veces en la densidad de transistores en circuitos integrados cada 18 meses, se ha mantenido hasta nuestros días [Moore, G.E., 1965].

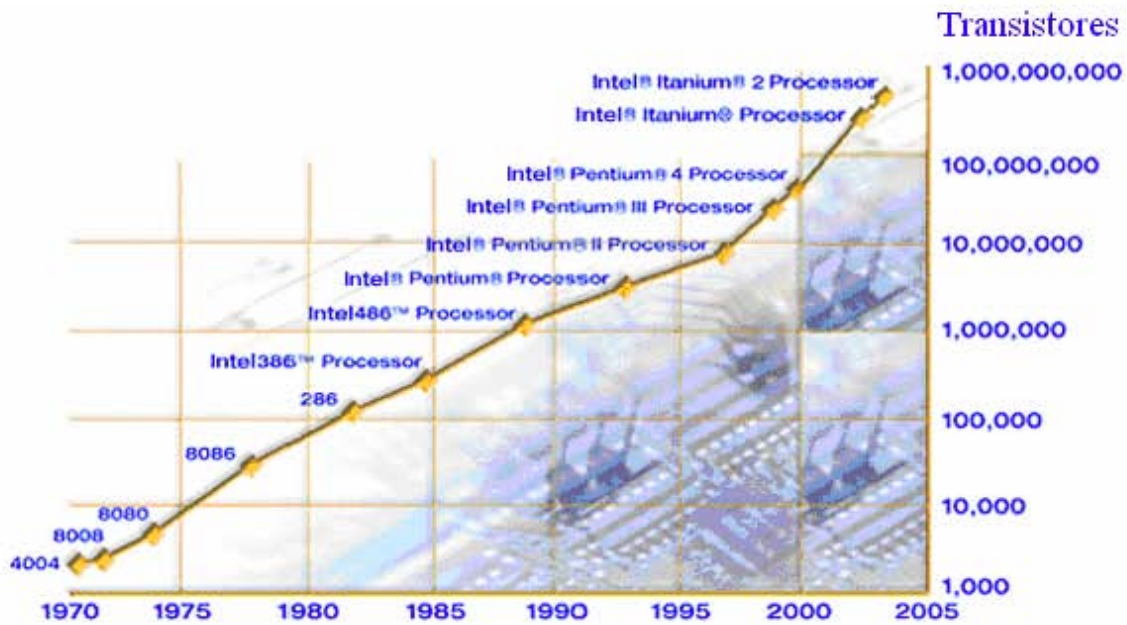


Figura 1. Gráfica de la ley de Moore

Sin embargo, se sabe que una posterior reducción en el tamaño de componentes y conexiones difícilmente se puede llevar a cabo por las técnicas convencionales de miniaturización (top-down techniques), tal como fotolitografía. Uno de los retos de la nanotecnología es encontrar formas de unir con nanoalambres a estas diminutas componentes, así como utilizarlos para la construcción de nanodispositivos. La microelectrónica y nanoelectrónica siempre requieren de transistores más pequeños y más poderosos [Ohring, M., 1995].

La fotolitografía es una técnica de fabricación de circuitos integrados y está basada en el uso de luz ultravioleta. La ley de Moore predice que el circuito integrado

más pequeño tendrá dimensiones de la mitad de la longitud de onda que se esté aplicando, por lo que no es posible manufacturar componentes menores a 100 nm. La fabricación de dispositivos electrónicos basados en silicio ha sido implementada con éxito por estrategias de manufactura en las que pequeñas estructuras son "impresas" sobre materiales semiconductores por medio de fotolitografía [Duan, X., *et al.*, 2003]. Actualmente, se buscan alternativas a la microelectrónica convencional del silicio ya que la miniaturización de circuitos integrados basados en silicio será obsoleta en aproximadamente una década [Moore, G.E., 1965], pues se habrán alcanzado los límites físicos en su manufactura.

Recientemente, se han desarrollado técnicas de manufactura alternativas para la fabricación de dispositivos electrónicos [Heath J. R., *et al.*, 2003]. Entre estas están las técnicas de escalamiento (bottom-up techniques) que se basan en el auto-ensamblaje de "bloques" o unidades de tamaño molecular para formar elementos funcionales más grandes. Por esta razón también se les ha llamado de litografía molecular, y exploran la posibilidad de fabricar dispositivos de tamaño nanométrico [Duan, X. *et al.*, 2003].

Los componentes electrónicos se pueden crear a partir de semiconductores inorgánicos, nanotubos de carbón, moléculas orgánicas o, inclusive, órgano-biológicas. Los transistores pueden estar formados por compuestos inorgánicos de tamaño nanométrico (películas delgadas) o moléculas orgánicas (pentaceno). Los alambres que unen los transistores deben tener alta conductividad eléctrica y grosor del orden de unos cuantos nanómetros. Los nanocomponentes inorgánicos tradicionalmente se sintetizan con técnicas de alto costo económico y de difícil control; por ejemplo, ablación láser, erosión iónica y depósito por vapor químico. Todas ellas técnicas que requieren vacío o

ultra-alto vacío. La uniformidad en sus dimensiones, ausencia de contaminantes y alto costo son algunos de los inconvenientes en estas técnicas.

Como se mencionó, una alternativa es fabricar las componentes por litografía molecular usando moléculas biológicas como mediador o andamio [Braun, E., *et al*, 1998]. Las biomoléculas son buenas candidatas por los procesos de auto-ensamblaje que poseen debido a su capacidad de enlazarse químicamente, perfeccionados por la Naturaleza durante 3, 500 millones de años de evolución [Bashir, R., *et al*, 2000]. Por ejemplo, los oligonucleótidos de ADN tienen capacidades de reconocimiento únicas y predecibles debido a la unión específica de sus cuatro bases, adenina (A) con timina (T) y citosina (C) con guanina (G). El ADN es el portador de la información genética en organismos vivos. La macromolécula de la vida también puede almacenar grandes cantidades de datos en su secuencia de cuatro bases (A, T, G, C). Dos grandes propiedades del ADN son el excelente reconocimiento molecular y su auto ensamblaje. Además, los ácidos nucleicos se pueden sintetizar con exactitud de Angstrom por medio de enzimas, tales como nucleasas y polimerasas [Bolivar, F., *et al*, 2000]. De aquí que el ADN es considerado un material de construcción prometedor para crecer nanoestructuras bien definidas.

El ADN ya se ha usado para fabricar nanobioestructuras complejas [Mao, C., *et al*, 1999]. Noguez *et al* (2004) y Porath *et al* (2000), han llevado a cabo mediciones de conductividad eléctrica directamente sobre la doble cadena encontrando que es un pobre conductor eléctrico. Una manera de incrementar la conductividad eléctrica en un oligonucleótido de ADN es agregando algún ión metálico, tomando así ventaja del exceso de carga negativa en los fosfatos del ADN para que guíen el depósito. Braun *et al*

(1998) han usado el ADN para crecer directamente, sobre una doble cadena suspendida por microelectrodos, "islas" de plata que forman "alambroides" pero desafortunadamente resultaron poseer baja conductividad eléctrica. Sin embargo, esto mostraba la posibilidad del uso de técnicas de auto-ensamblaje para sintetizar nanoalambres vía biomoléculas.

El método propuesto en este proyecto es de litografía molecular basado en un proceso de recombinación homóloga, que juega un importante papel en reparar y mezclar genomas en células de secuencia específica sobre sustratos de ADN [Bolívar, F., *et al*, 2000]. La recombinación homóloga es una reacción mediada por una proteína para que dos moléculas de ADN, teniendo alguna homología en la secuencia, se entrecrucen en sitios equivalentes. Por ejemplo, *RecA* es la principal proteína responsable de este proceso en el parásito *Escherichia Coli* [Bolívar, F., *et al*, 2000]. La idea básica es utilizar recombinación homóloga para que un filamento de cadena sencilla de ADN, previamente polimerizado por una proteína, se ligue químicamente a la secuencia complementaria presente en una doble cadena de ADN. Posteriormente, el sustrato ADN-proteína se trata con una solución de AgNO_3 , que se reducen por grupos aldehído previamente generados en la doble cadena de ADN, para formar iones metálicos y así un nanoalambre. En los últimos años se ha establecido que el ADN puede actuar como aislante, semiconductor, conductor o un superconductor dependiendo de las condiciones en que se encuentre [Heath, J.R., *et al*, 2003]. La plata, que posee las más altas conductividades térmica y eléctrica de todos los metales. Tiene la propiedad de que al estar en contacto con ácidos oxidantes (ácido nítrico o ácido sulfúrico concentrado) se disuelve para formar el ión positivo de plata, Ag^+ . Este material conductor es un importante candidato para formar nanolambres de plata.

HIPÓTESIS

Es posible sintetizar nanoalambres de plata usando el ADN del bacteriófago lambda y proteínas que muestran la posibilidad de usar la Nanobiotecnología en la fabricación de nanodispositivos.

OBJETIVO GENERAL

Optimizar los métodos y obtener las condiciones propicias para sintetizar nanolambres usando el ADN del bacteriófago lambda como mediador. Abrir la posibilidad de fabricar nanodispositivos electrónicos por medio de litografía molecular.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Polimerización de una cadena doble de ADN con la proteína *RecA* para formar un filamento de nucleoproteína. Recombinación homóloga de la nucleoproteína.
- 2.- Derivación con glutaraldehído de la recombinación del filamento con la doble cadena de ADN.
- 3.- Incubación de la nucleoproteína con la doble cadena de ADN en una solución que contenga algún ión metálico (e.g. AgNO_3). Metalización de las cadenas derivadas con Ag.
- 4.- Determinación de las condiciones adecuadas para el estudio morfológico de cadenas de ADN por Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) en un medio fluido y en aire.

CAPÍTULO II. ANTECEDENTES

II.1 CONCEPTOS FÍSICOS

II.1.1 Conductividad eléctrica

Existen varias maneras de producir el movimiento de cargas incluyendo lo que podríamos llamar “transporte real” de los portadores de carga, q . El agente más común del transporte de cargas es la fuerza ejercida por un campo eléctrico, \vec{E} , sobre un portador de carga. El campo eléctrico que rodea a un portador de carga y conforma un espacio vectorial es de tal manera que todo punto perteneciente a dicha región se caracteriza por un vector llamado intensidad de campo eléctrico, entonces se cumple que: $\vec{F} = q\vec{E}$. Un campo eléctrico tiende a mover a los portadores de carga positiva en un sentido y a los de carga negativa en sentido contrario. Si cada uno o ambos se mueven al aplicar el campo eléctrico, el resultado es una corriente eléctrica que se encuentra en la misma dirección que la de \vec{E} . En la mayoría de materiales, y en un amplio intervalo de intensidades de campo eléctrico, encontramos que la densidad de corriente es proporcional a la intensidad del campo eléctrico que la causa. A esto se le llama materiales óhmicos [Reitz y Milford, 1972]. La relación lineal entre la densidad de corriente y el campo eléctrico se expresa por

$$\vec{J} = \sigma \vec{E} \quad (1)$$

Al factor σ se le conoce como conductividad eléctrica del material, al recíproco de la conductividad se le llama resistividad ρ ; así pues

$$\rho = \frac{1}{\sigma} \quad (2)$$

Si sustituimos la conductividad por su recíproco, se obtiene la siguiente relación

$$J = \left(\frac{1}{\rho}\right)E \quad (3)$$

En la tabla 1 se muestran los valores de resistividad para varios materiales comunes [Reitz y Milford, 1972], sólo los metales y sus aleaciones son materiales realmente óhmicos. De acuerdo al valor de la resistividad que tengan, los materiales se definen como conductores, aislantes y semiconductores. Así si $\rho \leq 10^{-7}$ ohm-metro, se les llama conductores metálicos; en el otro extremo se encuentran los aislantes que se definen como aquellos materiales en los que $\rho \geq 10^{10}$ ohm-metro. En una primera y vaga definición, la que se aclarará en la sección II.1.2, se definirán como semiconductores a aquellos materiales con resistividades intermedias a los valores anteriormente dados, ver Tabla 1. En general, la conductividad también puede depender del estado físico del material y de su temperatura. Por ejemplo, a diferencia de los semiconductores, los conductores óhmicos a altas temperaturas poseen baja conductividad.

Material	ρ (ohm-m)	E_g (eV)
Cu	1.69×10^{-8}	
Au	2.44×10^{-8}	
Ni	7.24×10^{-8}	
Ag (0° C)	1.47×10^{-8}	
Ge (puro)	0.45	0.782
Ge (5 x 10 ⁻⁶ % As)	0.011	
Si (puro)	640	1.205
GaAs	200	1.420
Si (10 ⁻⁴ % As)	0.003	
Vidrio	10^{10} - 10^{14}	
Mica	10^{11} - 10^{15}	
Cuarzo (fundido)	7.5×10^{17}	

Tabla 1. Resistividad y brecha de energía de algunos materiales comunes a 20°C.

Consideremos una muestra conductora que obedece la ley de Ohm, en forma de un alambre de longitud L , sección transversal A cuyos extremos se mantienen a una diferencia de potencial constante, V , como se muestra en la Figura 2.

La densidad de corriente dentro del alambre se define como

$$\vec{J} = \frac{I}{A} \hat{i} ,$$

(4)

donde I es la corriente eléctrica, A la sección transversal e \hat{i} es el vector unitario en la dirección x . Por otro lado el campo eléctrico se define como

$$\vec{E} = -\nabla V ,$$

(5)

donde V es el potencial eléctrico. Considerando variaciones sólo en una dirección, sin pérdida de generalidad sea ésta x , se obtiene la siguiente expresión

$$\vec{E} = -\nabla V = \frac{dV}{dx} \hat{i} \approx \frac{V}{L} \hat{i}$$

(6)

Sustituyendo (4) y (6) en (3) se tiene que

$$\frac{I}{A} = \left(\frac{1}{\rho} \right) \left(\frac{V}{L} \right)$$

(7)

Despejando el potencial, V

$$V = \left(\frac{L\rho}{A} \right) I \equiv RI ,$$

(8)

donde la resistencia R se define en términos de la resistividad, que es una propiedad intrínseca de la materia, y las dimensiones del conductor. A la expresión dada en (8) es lo que se conoce como ley de Ohm.

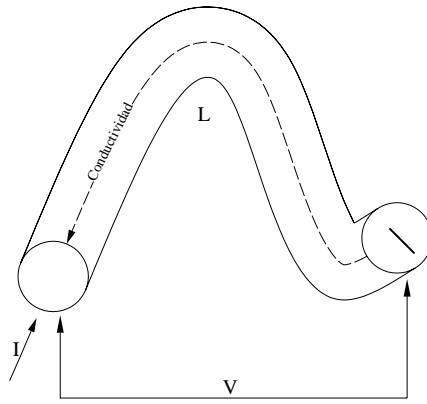


Figura 2. Esquema de un alambre conductor.

II.1.2 Teoría de bandas

Como se observa en la Tabla 1, la conductividad σ varía enormemente en un amplio rango de valores entre aislantes y conductores. Las resistividades de los mejores conductores (como el cobre a bajas temperaturas) y los mejores aislantes representan el rango de valores más amplio para una propiedad física de los sólidos, $\sigma_{Cu} / \sigma_{aislante} \approx 10^{25}$. La amplitud de este rango constituye un fuerte indicio de que las propiedades de transporte de carga no son susceptibles de una explicación basada en un modelo clásico. Como veremos a continuación, una adecuada explicación para este fenómeno es por medio de teoría de bandas.

Considérese, por ejemplo, el magnesio metálico como un material con alta conductividad eléctrica. La configuración electrónica del Mg es $[\text{Ne}]3s^2$, donde $[\text{Ne}]$ se refiere a la configuración electrónica cerrada del neón, de modo que cada átomo tiene dos electrones de valencia en el orbital 3s. En un metal, los átomos se encuentran empaquetados muy cerca unos de otros de tal forma que los niveles energéticos de cada átomo de magnesio se ven afectados por los de los átomos vecinos, lo cual da lugar a un traslape de orbitales electrónicos [Serway, R.A., 2000]. La interacción entre dos orbitales atómicos conduce a la formación de un orbital molecular de enlace y otro de antienlace.

Como el número de átomos existente, incluso en un pequeño trozo de sodio metálico, es demasiado grande, el correspondiente número de orbitales moleculares que se forman es también grande. Estos orbitales moleculares, debido a todos los átomos, tienen energías tan parecidas que se describen en forma más adecuada como una "banda" [Chang, R., 2002]. Este conjunto de niveles electrónicos externos tan cercanos en energía se conoce como banda. En particular si los electrones en cuestión corresponden a los de

valencia, a esta se le llama banda de valencia. A la parte superior de los niveles energéticos de los orbitales moleculares vacíos conformada por electrones libres de valencia se le llama banda de conducción.

Se puede imaginar a un metal, como magnesio metálico, como un conjunto de iones positivos inmerso en un mar de electrones de valencia deslocalizados. La intensa fuerza de cohesión resultante de la deslocalización electrónica es en parte responsable de la rigidez evidente en la mayoría de los metales [Whitten, K.W., *et al*, 1985]. En virtud de que las bandas de valencia y de conducción en los metales son adyacentes, se requiere sólo una cantidad despreciable de energía para promover un electrón de valencia a la banda de conducción, donde adquiere libertad para moverse a través de todo el metal. Puesto que la banda de conducción carece de electrones, la energía necesaria para promover un electrón de la banda de valencia a la banda de conducción se le llama brecha de energía, E_g . Esta libertad de movimiento explica el hecho de que los metales sean capaces de conducir corriente eléctrica; esto es, que sean buenos conductores. Lo que da lugar a la propiedad macroscópica de conductividad eléctrica definida en la sección anterior.

¿Por qué las sustancias como la madera o el vidrio no conducen la electricidad? La Figura 3 da una respuesta a esta pregunta. Básicamente, la conductividad eléctrica de un sólido depende del valor de la brecha de energía, E_g , y el estado de ocupación de las bandas de energía. En el caso particular de los metales, las bandas de valencia son adyacentes a la banda de conducción, o inclusive se traslapan, por lo que estos actúan como conductores. En un aislante la brecha E_g entre las bandas de conducción y de valencia es considerablemente mayor que en un metal; en consecuencia, se requiere una

mayor energía para excitar un electrón a la banda de conducción. Esta cantidad de energía no es disponible en condiciones normales y/o ambientales.

Sin embargo, la banda correspondiente a la capa atómica más externa, ocupada por los electrones de valencia, es la más interesante en lo que se refiere a las propiedades de los sólidos. Por ejemplo, si cada átomo de Mg contribuye con 2 electrones del nivel 3s original a la banda de valencia a $T = 0$ K, la mitad de los orbitales que forman la banda ($1/2 N$) estarán ocupados [Kittel, C., *et al*, 2004]. El orbital molecular de mayor energía que se encuentra ocupado se conoce como el nivel de Fermi y, en este caso estará situado en el centro de la banda, como se muestra en la Figura 3.

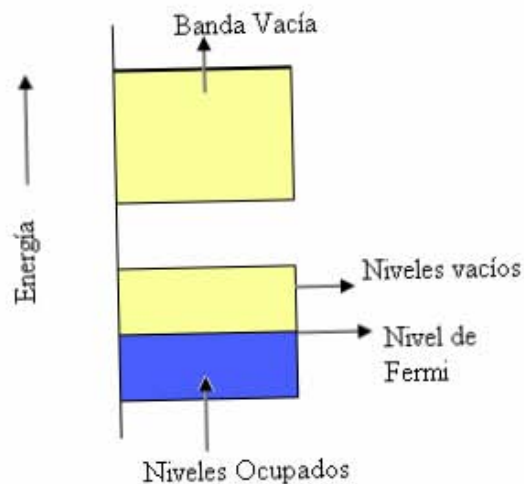


Figura 3. Niveles ocupados y nivel de Fermi a 0 K.

Estamos ahora en condiciones de definir los distintos tipos de materiales de acuerdo a sus propiedades de transporte de conductividad eléctrica:

- *Conductor* es aquel material en que la energía del primer estado electrónico vacío se encuentra inmediatamente adyacente a la energía del último estado electrónico ocupado. En otros términos, un conductor es un material en el cual la última

banda ocupada no está completamente llena. Los valores de E_g son menores o iguales a 0.2 eV.

- *Aislante* es aquel material en que la energía del primer estado electrónico vacío se encuentra separada por una brecha finita y grande de la energía del último estado electrónico ocupado. Los valores de E_g son mayores a 4 eV
- *Semiconductor* es aquel material que no es exactamente un conductor eléctrico pero tampoco es un aislante. En un conductor la corriente se debe al movimiento de las cargas negativas (electrones). En los semiconductores se producen corrientes tanto por el movimiento de electrones como por la ausencia de estos en un sólido, a los que se les llama huecos (cargas positivas). Los semiconductores puros son aquellos elementos pertenecientes al grupo IV de la tabla periódica (silicio, germanio, etc.). La separación entre bandas, E_g , es de valores cercanos a 1.5 eV [Sze, S.M., 1981]

La Figura 4 muestra esquemáticamente las diferencias existentes entre las tres clases de sólidos de acuerdo a sus propiedades de transporte de carga.

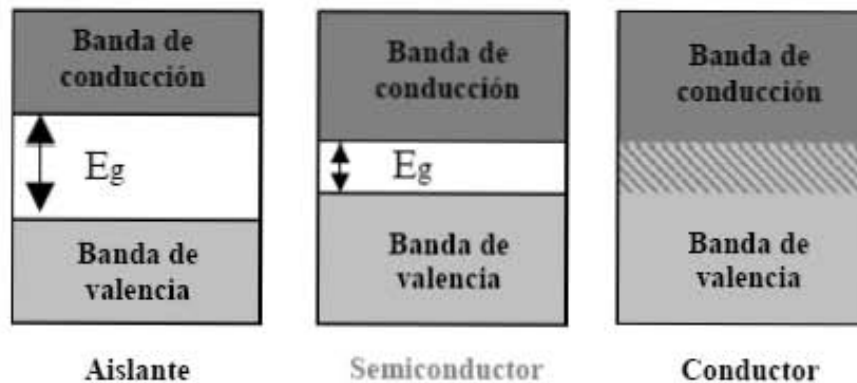


Figura 4. Diagrama de bandas de conductores, semiconductores y aislantes.

II.1.3 Semiconductores

Algunos elementos del grupo IV, en especial Si y Ge, tienen propiedades eléctricas intermedias entre aquellas de los metales y aislantes, por lo que se denominan materiales semiconductores. Se observa en la Tabla 1 que la brecha de energía u óptica, E_g , entre las bandas llenas y vacías en estos sólidos es mucho menor que en el caso de los aislantes. Si se suministra la energía necesaria para excitar electrones de la banda de valencia a la de conducción, el sólido se convierte en un conductor. Nótese que este comportamiento es opuesto al de los conductores óhmicos, como los metales. La capacidad de un metal para conducir electricidad disminuye al aumentar la temperatura, ya que la frecuencia de vibración de los átomos aumenta, tendiendo a disminuir el flujo de electrones [Kittel, C., *et al*, 1990].

Admitiendo como principio que los estados posibles de un sistema tienden a tomar el de mayor estabilidad, es por esto que tanto Ge como Si, con cuatro electrones en la orbita externa, adquieren una estructura cristalina tal que cada átomo se asocia a otros cuatro a su alrededor y compartiendo con ellos un electrón para formar así una configuración electrónica completa [Hall, H.E., 1999]. En consecuencia, el germanio tiene todos sus electrones con baja energía dentro de las bandas de valencia y se convierte en un aislante cerca del cero absoluto (0 °K), ver Tabla 1 [Kittel, C., *et al*, 1990]. En cambio a temperatura ambiente, los electrones adquieren la energía necesaria para pasar a la banda de conducción y el germanio se comporta como un conductor, ver Tabla 1. En un átomo, el electrón que se independiza de la atracción del núcleo se convierte en electrón libre y origina, en la covalencia que destruye, la ausencia de una carga negativa

(electrón) que se denomina hueco. La conductividad que presenta un semiconductor a temperatura ambiente se denomina conductividad intrínseca y aumenta con la temperatura [Kittel, C., *et al*, 1990]. Si a un trozo de Ge se le aplica una diferencia de potencial, éste logrará orientar a los electrones de manera tal que recorran el circuito dirigiéndose hacia el polo positivo mientras que los huecos se orientan recorriendo el circuito hacia el polo negativo. Un electrón que se dirige al polo positivo saliendo del semiconductor y creando un nuevo hueco se compensará con otro electrón que entra por el polo negativo, manteniendo constante el número de electrones y huecos que se tenían en un principio. Los huecos y los electrones en estado libre en un semiconductor son los llamados portadores de carga. En otras palabras, podríamos decir que la corriente eléctrica es la acción conjunta del desplazamiento de electrones en un sentido y de huecos en sentido contrario. Conviene aquí citar las experiencias de Rowland quien demostró que se lograban los mismos efectos electromagnéticos haciendo girar a gran velocidad cargas eléctricas positivas o negativas en sentido contrario [Ibach, H., 1998].

Además de los semiconductores puros ya descritos, existen también diferentes tipos de semiconductores dopados; es decir, impurezas que se le agregan a los semiconductores puros, o a compuestos formados por dos elementos o más, ver tabla 1. La impurificación consiste en agregar al semiconductor átomos de otros elementos, usualmente en una proporción menor a $1:10^6$ átomos. Considérese el caso del germanio, Ge, dopado con As. Los átomos de germanio tienen una valencia atómica de cuatro. Si un átomo del grupo V con cinco electrones de valencia, tal como el arsénico, se incorpora a la red cristalina en lugar de un átomo de germanio. Entonces el sólido resultante al añadir la impureza de As en el cristal del Ge tendrá un electrón no enlazado o libre. Este

electrón libre en condiciones adecuadas de presión y temperatura se puede excitar fácilmente hacia la banda de conducción, como se representa esquemáticamente en la Figura 5 [Chang, R., 2002].

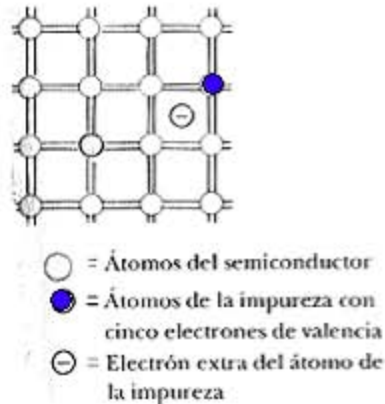


Figura 5. Diagrama de la red y esquema de bandas del Ge al que se le ha agregado impurezas de As (Θ) para doparlo.

A este nuevo semiconductor se le llama semiconductor de tipo n. La impureza que lo originó se llama donadora porque dona un electrón a la red, ya que aumenta el número de electrones libres en el semiconductor.

El Ge también se puede contaminar con impurezas de átomos del grupo III, como boro o indio. Estos elementos tienen 3 electrones de valencia en la última capa. En condiciones adecuadas de presión y temperatura, estos elementos pueden sustituir un átomo de Ge de la red. En contraste al caso anterior, se genera un hueco; es decir, la ausencia de un electrón [Ohring, M., 1995]. Contrariamente a lo que ocurre con el As, la impureza deja huecos libres forzando a los electrones del Ge a ocuparlos y haciendo que estos queden en minoría. Por lo tanto, los portadores de carga mayoritarios resultan ser

los huecos, como se observa en la Figura 6. Este nuevo semiconductor se denomina del tipo p y a la impureza, aceptora.

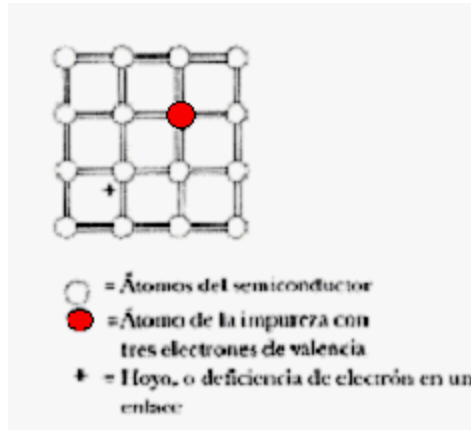


Figura 6. Diagrama de la red y esquema de bandas del Ge al que se le ha agregado impurezas de B (\oplus) para doparlo.

Consideremos como último caso, la formación de un semiconductor compuesto por un elemento del grupo III con otro del V; por ejemplo, GaAs. Este compuesto estructuralmente tendería a una configuración cristalográfica semejante a la del Si o Ge. El Ge y Si puros poseen estructuras tipo diamante y el GaAs tipo zincblenda, donde la estructura tipo diamante se puede considerar como un caso particular de la zincblenda [Sze, S.M., 1981]. El semiconductor GaAs juega un papel importante en la optoelectrónica ya que se usa en el diseño y fabricación de láseres [Ohring, M.,1995].

El cambio de la conductividad para semiconductores puros y compuestos se puede observar al relacionar la variación de E_g en función de la temperatura. La Figura 7 muestra que a temperaturas cercanas al cero absoluto, el Ge, Si y GaAs son totalmente aislantes pero conforme aumenta la temperatura el valor de E_g disminuye convirtiéndolos

en conductores [Sze, S.M., 1981]. En condiciones ambientales, los valores de E_g son 0.66 eV para Ge, 1.12 eV para Si y 1.42 eV para GaAs.

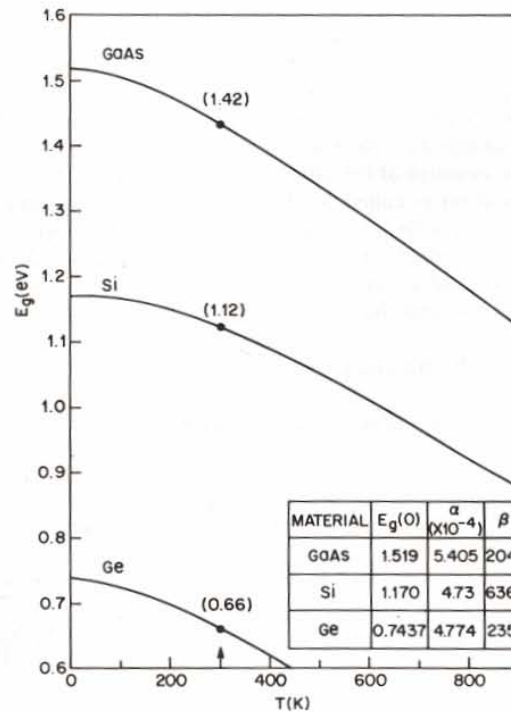


Figura 7. Brecha de energía del Si, Ge y GaAs como función de la temperatura.

Por último, analicemos lo que resultaría al poner en contacto físico un semiconductor del tipo p con otro del tipo n, a lo que se le llama unión p-n. La Figura 8 muestra esquemáticamente las distintas regiones en una unión p-n de dos semiconductores y cómo se modifica el nivel de Fermi debido a esta unión. La región “n” del semiconductor tipo n consiste principalmente de electrones libres, mientras que la región “p” de huecos.

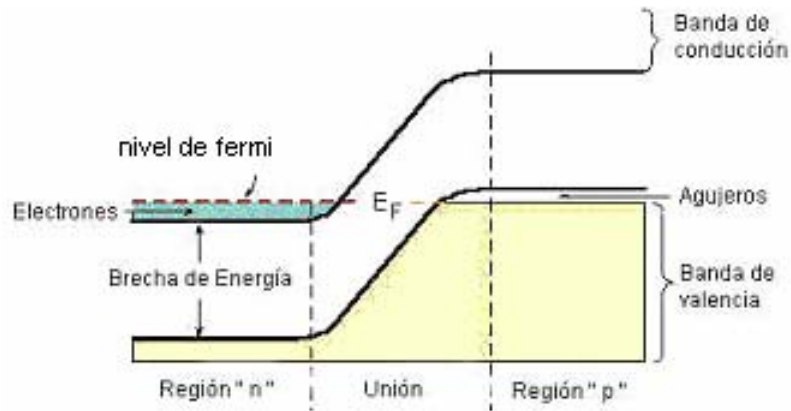


Figura 8. Niveles de energía de una unión p-n sin voltaje aplicado.

La Figura 9A muestra la redistribución de cargas y huecos tanto en el semiconductor tipo n como en el tipo p, respectivamente, antes de llevarse a cabo una unión. Posteriormente, justo en el instante en que ocurre el contacto, se genera un flujo de corriente que hace que los electrones del semiconductor tipo n se difundan hacia el tipo p y los huecos del semiconductor del tipo p hacia el tipo n, como se muestra en la Figura 9B. Esto da lugar a una recombinación entre ambos portadores de carga, lo que crea una zona sin carga, llamada zona neutra, en la región aledaña a la unión de ambos semiconductores [Ohring, M., 1995].

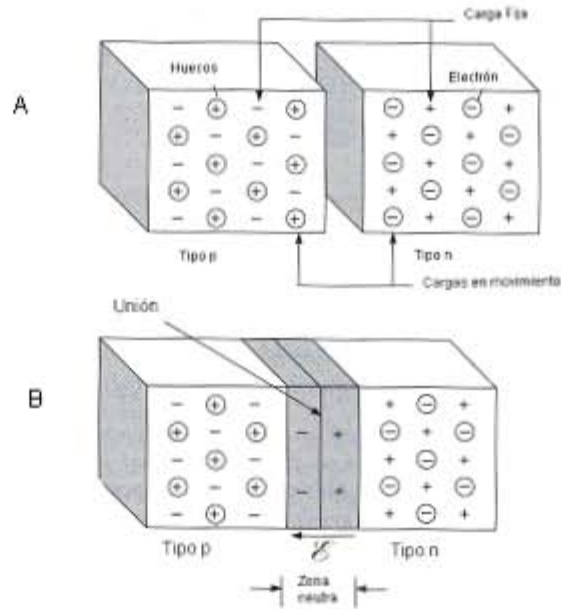


Figura 9. Representación de una unión p-n de semiconductores. (A) antes del contacto entre semiconductores y (B) después del contacto y la formación de la zona neutra.

Se define un voltaje con polarización invertida como aquel en el que la terminal negativa de una fuente de poder se conecta al semiconductor tipo p y la terminal positiva al tipo n, como se muestra en la Figura 10A. El potencial eléctrico aplicado a esta configuración hará que los portadores mayoritarios respectivos en cada semiconductor se alejen entre sí de la unión p-n, haciendo más grande la zona neutra [Ohring, M., 1995]. Si se invierte la polarización del voltaje aplicado a la unión p-n, como se muestra en la Figura 10B, la anchura de la zona neutra disminuye debido a que tanto los huecos como los electrones ahora se aproximan entre sí. Por lo tanto, en este caso ocurre recombinación de los portadores de carga, reduciéndose la zona neutra, y, por lo consiguiente, se genera una corriente eléctrica a través de la unión, véase Figura 11 [Ohring, M., 1995].

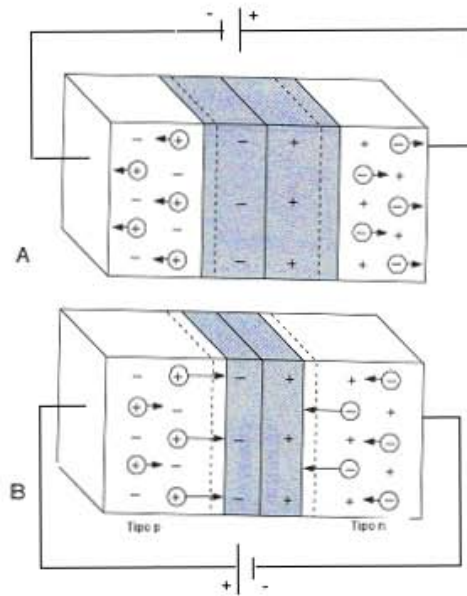


Figura 10. Representación esquemático de una unión p-n. A) Voltaje con polarización invertida y B) cambio de polarización.

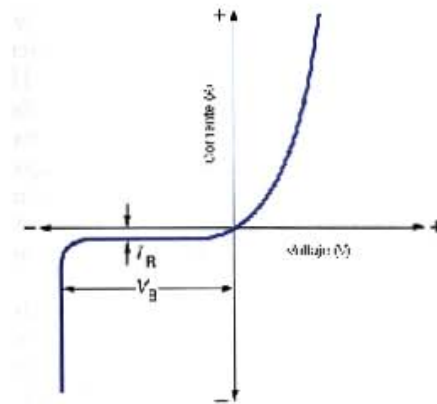


Figura 11. Gráfica de I vs V de un rectificador.

El comportamiento descrito anteriormente nos muestra que la unión p-n se comporta, eléctricamente hablando, como un rectificador. Prácticamente todos los dispositivos electrónicos se construyen al unir semiconductores entre sí, o

semiconductores con metales y aislantes. Precisamente, este comportamiento eléctrico entre la unión de dos semiconductores da lugar al más elemental y sencillo de los dispositivos electrónicos que es el diodo semiconductor o rectificador. Este dispositivo marcó el inicio de la electrónica moderna, ya que a partir de la década de 1950 los dispositivos semiconductores empezaron a reemplazar a los tubos de vacío tradicionales o bulbos de la industria electrónica. Por la enorme reducción de tamaño, consumo de energía y costo, acompañada de una mayor durabilidad y confiabilidad, los dispositivos semiconductores de estado sólido significaron un cambio revolucionario en las telecomunicaciones, la computación, el almacenamiento de información, etc. En la sección II.1.4, describiremos la transformación sorprendente que ocurrió en la electrónica moderna, lo que a su vez impulsó nuevas tecnologías, tales como la nanotecnología.

II.1.4 De válvulas de vacío a transistores

Los diodos de estado sólido han mostrado ventajas con respecto a las válvulas de vacío, pues permitieron construir dispositivos más pequeños, eficientes, confiables, fáciles de producir, de conectar y con un consumo mínimo de energía.

La válvula de vacío con 3 filamentos fue inventada en 1906 por Lee De Forest, quien a su vez se apoyó en la válvula de dos filamentos. Esta válvula se basa en el efecto Edison, el efecto Edison consiste en un flujo de corriente a través del vacío entre dos cables de metal, siendo uno de ellos incandescente. La corriente fluye sólo cuando el filamento incandescente libera electrones por emisión termiónica [Purcell, E., 1994]. El investigador Lee De Forest descubrió que una rejilla de alambre electrificada origina un flujo de electrones cuando se le coloca dentro de un tubo o una válvula de vacío, véase Figura 12. Este flujo podría ser controlado de distintas maneras: se podía interrumpir, reducir, incluso detener, o amplificar [Stern, D., *et al*, 2000]. En particular, se utiliza para incrementar la corriente o señal de voltaje. Esta fue la razón por lo que este dispositivo se utilizó en televisores, radios y cualquier otro equipo electrónico que requiera aumentar el nivel de una señal de entrada [Rodenhuis, E., *et al*, 1999]. Este dispositivo electrónico tenía dos grandes desventajas, una de ellas era su tamaño, tiempo de vida corto y, por otro lado, un tiempo prolongado para iniciar su funcionamiento. De aquí que los dispositivos electrónicos de estado sólido resultaron ser una gran opción al reemplazo de los tubos de vacío. Además de tener la facilidad de fabricarse a menor tamaño, dando lugar a la microelectrónica.



Figura 12. Válvula de vacío.

Fue entonces cuando Shockley, Bardeen y Brattain, quienes trabajaban en los laboratorios Bell, en 1947 construyeron por primera vez un dispositivo mucho más pequeño que una válvula de vacío y teniendo el mismo funcionamiento, el transistor [Filardo, J.M., et al, 1997]. El transistor fue elaborado sobre una base plástica en la que se montaron fragmentos de germanio sostenidas por un resorte y un clip para sujetarlo. Con este dispositivo tan rudimentario pudieron amplificar señales de igual forma como lo hubieran hecho con una válvula de vacío, sin necesidad de vacío ni filamentos incandescentes ni elevados voltajes de operación.

En efecto, el transistor, llamado así debido a que transfiere la señal eléctrica a través de un resistor, puede realizar las mismas funciones que una válvula de vacío, pero con notorias ventajas. No sólo sustituyó al complejo y delicado tubo por un sencillo montaje que consiste básicamente en un conjunto de finos alambres acoplados a un semiconductor. Además, no requiere de calentamiento previo para empezar a funcionar ni ser encapsulado y el consumo de energía es insignificante. El transistor es un dispositivo electrónico semiconductor que cumple funciones de amplificador, oscilador, conmutador o rectificador, es la base de los circuitos integrados siendo fotolitografía la técnica común de fabricación de los chips o circuitos integrados, como se verá en la sección II.1.5.

II.1.5 Fotolitografía

La técnica que se utiliza actualmente para la fabricación de circuitos integrados es la fotolitografía. Dependiendo de su funcionamiento, un circuito integrado se conforma por dispositivos electrónicos, transistores entre otros, que pueden ser tantos como miles de millones. La fotolitografía, también llamada microlitografía o nanolitografía, funciona de manera análoga a la litografía tradicionalmente empleada en trabajos de impresión y comparte algunos principios fundamentales con los procesos fotográficos [wikipedia.com]. La litografía es el método para imprimir en superficies lisas y se usa para imprimir textos. La fotolitografía también se aplica en la fabricación de sistemas micro electro-mecánicos (MEMS).

El proceso de fabricación por fotolitografía de un circuito integrado consiste de dos elementos claves: el resistor (en inglés resist o photoresist) y la mascarilla (en inglés mask). Primeramente, la mascarilla se construye a escala macroscópica y contiene el circuito integrado a detalle. Después, la mascarilla se proyecta directamente sobre la superficie de una oblea, que funge como sustrato del circuito, mediante una máquina denominada escáner (en inglés scanner). La función del escáner es similar a la de un proyector. Se hace incidir luz ultravioleta proveniente de una lámpara de mercurio o de un láser de excímero que se enfoca a través de un complejo sistema de lentes sobre la mascarilla. Cuando la imagen de la mascarilla se proyecta sobre el sustrato con el resistor, se grabará sobre material fotoresistente (resistor) aquellas regiones sensibles a ciertas longitudes de onda. Ya que es ultravioleta la luz utilizada para este proceso, hay un límite físico para la fabricación de las componentes en el circuito, aproximadamente la

mitad de su longitud de onda. Por lo tanto, el tamaño mínimo de las componentes es de aproximadamente 100 nm. De aquí que surge la necesidad de innovar tecnologías para fabricar dispositivos a escalas menores a 100 nm. La litografía molecular es una técnica novedosa que permite sintetizar moléculas para crear dispositivos a escala nanométrica.

II.1.6 Litografía molecular

La industria electrónica ha aumentado continuamente la velocidad y complejidad de los dispositivos. De acuerdo a la ley de Moore, existe un límite físico para la mínima componente en la fabricación de circuitos integrados (CI) [Moore, G.E., 1965]. Este límite se toma aproximadamente como la mitad de la longitud de onda que se utilice en fotolitografía, luz UV, lo que se ha mantenido en el orden de 100 nm hasta nuestros días. Esta ley es aplicable en los métodos convencionales de miniaturización de fabricación de componentes electrónicos, tal como fotolitografía. Estos métodos de miniaturización actuales tenderán a ser obsoletos cuando se desee incrementar la densidad de componentes electrónicos en un CI, puesto que están limitados. Es decir, se necesitará de dispositivos más pequeños a 100 nm, menores a la mitad de la longitud de onda de UV. Es por ello que se requerirá de nuevas técnicas. Una excelente opción es la tecnología conocida como “bottom-up” o amplificación, basada en el autoensamblaje de bloques moleculares para formar elementos funcionales más grandes y rápidos. Este tipo de tecnología está siendo explorada como una forma potencial de fabricación de dispositivos de tamaño nanométrico y/o micrométrico [Burns, J.A., *et al*, 1991].

Especialmente, las biomoléculas son componentes prometedoras para la fabricación de dispositivos por su exclusivo y específico proceso de autoensamblaje, la madre naturaleza ha demostrado a la perfección este autoensamblaje durante miles de millones de años de evolución [Niemeyer, C.M., 2001]. En particular, los oligonucleótidos que componen al ADN tienen capacidades de reconocimiento únicas y predecibles debido a la especificación de pares de bases del tipo Watson-Crick, haciendo

al ADN un material de construcción prometedor para el diseño de nanoestructuras. Keren *et al* han descrito un novedoso método de litografía molecular donde utilizan al ADN como andamio para el crecimiento de dispositivos electrónicos básicos [Keren, K., *et al*, 2002]. En trabajos previos, el ADN había sido utilizado para crecer elementos conductores semejantes a un alambre [Braun, E., *et al*, 1998]. Keren *et al* aumentan la complejidad de tales dispositivos usando otra biomolécula, la proteína *RecA* la cual juega un papel importante en el proceso central de la litografía molecular que es la recombinación homóloga. Como se menciona anteriormente el método de litografía molecular permite construir dispositivos a partir del ADN [Keren K., *et al*, 2004].

El proceso esencial de construcción consiste en lo siguiente: la proteína *RecA* polimeriza a una cadena simple de ADN (csADN), formando así un filamento de nucleoproteína por recombinación homóloga. El filamento reconoce y se enlaza a la secuencia específica complementaria de una doble cadena de ADN (dcADN) para formar un ADN recombinado, que funciona como un resistor de secuencia específica, como se observa en la Figura 13. Por último, se trata a la molécula de ADN recombinado en una solución con iones de plata, los cuales son reducidos por grupos aldehídos generados previamente en la dcADN sin recombinar, como se observa en la Figura 14. De esta manera se forman cúmulos de plata a lo largo de la dcADN recombinada, véase Figura 15.

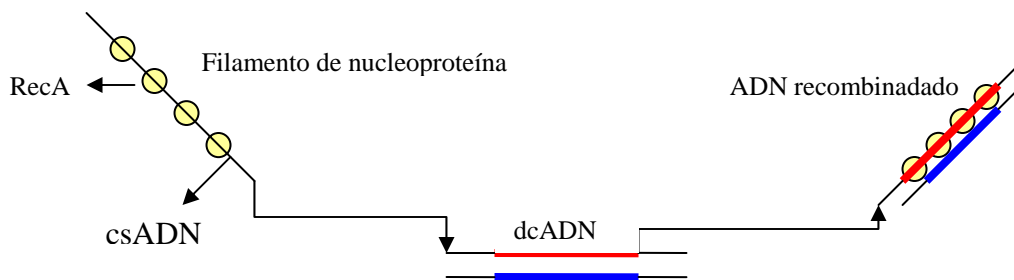


Figura 13. Recombinación homóloga de csADN con una proteína.

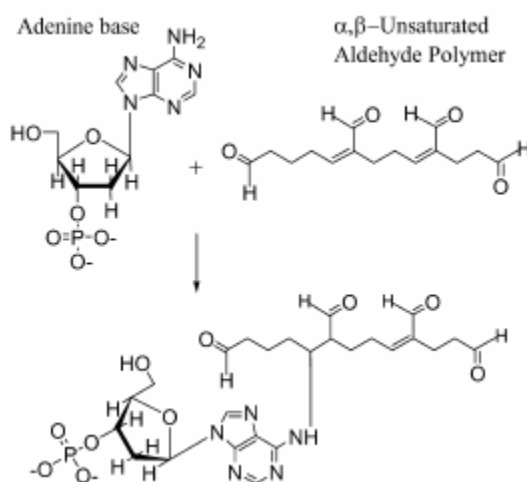


Figura 14. Mecanismo propuesto para la reducción por aldehídos.

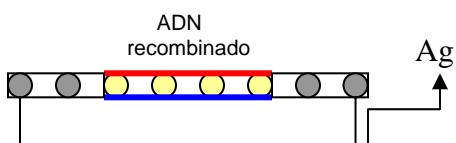


Figura 15. Litografía molecular con plata a lo largo del ADN recombinado.

De acuerdo a las dimensiones de la doble hélice de ADN, aproximadamente 2nm de diámetro y una distancia de 3.4 nm entre hilos consecutivos, este proceso da como resultado que se lleve a cabo la formación de un nanoalambre. La información codificada

en la molécula de ADN reemplaza las mascarillas utilizadas en litografía convencional, mientras que la proteína *RecA* sirve como resistor. Este proceso en principio debiera trabajar con alta resolución sobre un extenso intervalo a escala molecular, longitud de micras, y debiera servir como base o templete para la fabricación de dispositivos electrónicos complejos.

La gran eficiencia y especificidad en una reacción de recombinación dada por procesos biológicos hace a la litografía molecular más deseable y potencialmente aplicable [Alberts, B., *et al*, 2004]. El proceso de recombinación homóloga se puede utilizar para formar uniones entre cadenas de ADN, debido a que la proteína *RecA* puede generar *in-vitro* de tres a cuatro uniones entre cualesquier de las dos cadenas dobles de ADN siempre y cuando tengan regiones homólogas [Muller, B., *et al*, 1992]. Este método nos proporciona una opción con amplias ventajas para continuar con la fabricación de dispositivos electrónicos cada vez más pequeños, dando así un enorme avance y contribución a la nanotecnología. Debido a las ventajas de este método y a las grandes aplicaciones que se le puede encontrar tanto en la industria electrónica como en la biomédica, los nanoalambres son el elemento base de un dispositivo electrónico, tal como diodo, transistor, entre otros.

II.2 CONCEPTOS BIOMOLECULARES

La ingeniería genética o ADN recombinante es un conjunto de métodos y herramientas que permiten la manipulación *in vitro* a escala molecular del material genético de organismos vivos [Alberts, et al., 2002]. Esto se lleva a cabo por varias rutas: enzimas, clonación de ADN (por ejemplo PCR) o determinación de la secuencia nucleotídica del ADN.

En este capítulo analizaremos los distintos conceptos relacionados con nuestro trabajo y ADN recombinante o recombinación genética. Así, ya que el ADN se usa como andamio para llevar a cabo la metalización, se expondrán las nociones básicas acerca de esta biomolécula en la sección II.2.1. Para que así en la sección II.2.2, se exhiban los elementos necesarios del bacteriófago lambda, ya que de este virus se usa su ADN por ser un organismo con un genoma relativamente pequeño (48 502 pares de bases). Por último, nos enfocaremos en el uso de enzimas (proteínas que catalizan una reacción específica); en particular, enzimas de restricción para el proceso de metalización del ADN. Como se explicará en la sección II.2.3, la enzima empleada en este trabajo es la proteína RecA.

II.2.1 Molécula de ADN

Para llevar a cabo la síntesis de nanoalambres utilizando ADN como mediador es necesario y de gran importancia conocer las características, propiedades y funcionamiento de la macromolécula. El ácido desoxirribonucleico (ADN) es el principal componente del material genético en organismos vivos y es un polímero lineal formado principalmente por unidades menores denominados nucleótidos. El ADN es una molécula de alto peso molecular que está constituida por tres sustancias distintas: radicales fosfato, un monosacárido aldehídico del tipo pentosa (la desoxirribosa), y una base nitrogenada cíclica que puede ser purínica (adenina o citosina) o pirimidínica (timina o guanina).

La estructura de la doble hélice del ADN fue propuesta por Watson y Crick en 1953 [Watson, J. D., *et al*, 1953], y consiste en una doble hélice con las bases dirigidas hacia el centro unidas por puentes de hidrogeno, véase Figura 16. A partir de su descubrimiento, el ADN ha sido pieza clave en el avance de la genética moderna y biotecnología, tal como el desciframiento del genoma humano. La unión de la base nitrogenada (citosina, adenina, guanina o timina) con la pentosa (desoxirribosa) y un radical fosfato forman lo que se le llama un nucleótido [Alberts, *et al*, 2002].

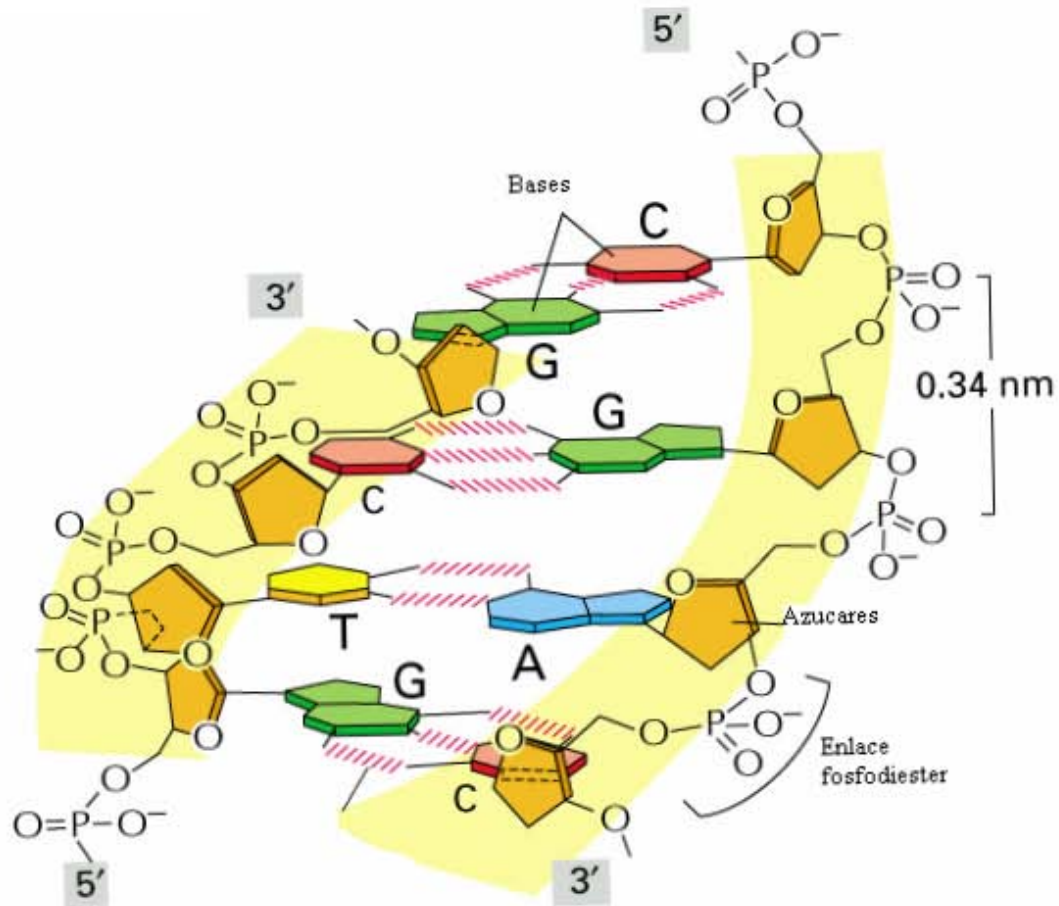


Figura 16. Estructura de una doble cadena de ADN.

La unión de nucleótidos forma un enlace fosfodiéster que da como resultado un polinucleótido, en este caso el ácido desoxirribonucleico. Las bases nitrogenadas siempre se encuentran en relación molecular 1:1; es decir, la relación es una purina por una pirimidina: adenina:timina y/o guanina:citosina. Estructuralmente, la molécula de ADN está formada por dos cadenas helicoidales enrolladas alrededor de un mismo eje imaginario con centro en los puentes de hidrógeno. Sus dimensiones son: diámetro ~20 Å, una distancia de 34 Å entre hilos consecutivos y 3.4 Å entre bases consecutivas [Alberts, B., *et al.* 2002], como se observa en la Figura 17.

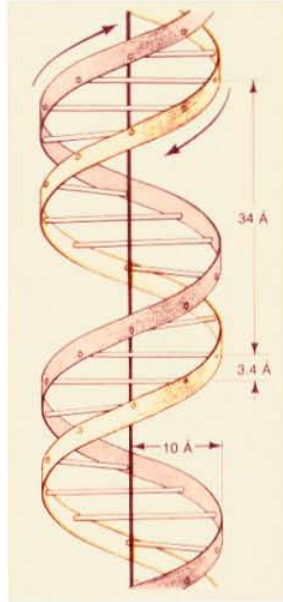


Figura 17. Estructura helicoidal del ADN.

El ADN tiene una carga eléctrica negativa debido a que está compuesto de muchas moléculas polares. La carga negativa en el ADN se atribuye a la ausencia de hidrógenos en el radical fosfato, ver Figura 16.

Es posible predecir las interacciones entre cadenas de ADN examinando las secuencias entre ellas. Por tanto es posible programar propiedades de reconocimiento de ADN simplemente conociendo sus secuencias de bases. La biología molecular nos provee de herramientas para manipular y reproducir el ADN. Existen enzimas que cortan, copian, ligan y modifican secuencias específicas del ADN [Watson, J. D. *et al*, 1992, Alberts, B., *et al*, 2002]. Estos grandes avances en biología molecular hacen posible la manipulación y operación *in vitro* del ADN a través de enzimas. Prácticamente una secuencia de ADN puede ser sintetizada y reproducida con gran eficiencia. En particular, en nuestro estudio usamos la enzima *HindIII* para extraer 2027 pares de bases del ADN- λ y llevar a cabo la recombinación homóloga como parte básica de la litografía molecular.

La amplificación de moléculas largas de ADN se facilita utilizando la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR) [Watson, J.D., *et al*, 1992, Alberts, B., *et al*, 2002]. La reacción en cadena de polimerasa es un método *in vitro* para la síntesis enzimática de secuencias definidas de ADN. La reacción utiliza oligonucleótidos, secuencia corta de pares de bases, como iniciadores, conocidos como “primers”, que hibridan en las cadenas opuestas complementarias donde se inicia la amplificación del ADN molde. Los pasos esenciales incluyen la desnaturalización térmica de la doble hélice del ADN, alineamientos de los iniciadores en una secuencia complementaria y la extensión de los iniciadores por síntesis enzimática por medio de ATP (trifosfato de adenosina). Esta reacción nos permite amplificar una secuencia facilitando su manipulación y estudio. Es muy importante enfatizar en las ventajas de los grandes avances que han tenido técnicas de biología molecular, como PCR, para ser utilizadas en grandes aplicaciones tecnológicas tales como circuitos electrónicos, biomedicina, biochips, etc.

Una técnica de fabricación de dispositivos electrónicos basada en biomoléculas es litografía molecular, explicada en la sección II.1.6, que básicamente consta de utilizar al ADN como andamio para formar alambres a escala nanométrica y que estos, a su vez, sean la base de circuitos.

II.2.2 Bacteriófago lambda

La Figura 18 muestra una micrografía electrónica del virus lambda [Alberts, B., et al, 2002]. Este, en particular, infecta a la bacteria *e. coli*, por lo que se le llama bacteriófago. El extremo de la cola del virus se une específicamente a una determinada proteína de la superficie de una célula bacteriana, y después un ADN densamente empaquetado, situado en la cabeza del virus, puede ser inyectado a la célula a través de la cola.

En este estudio se utilizó el ADN del bacteriófago lambda debido a su simplicidad. El ADN del bacteriófago lambda es uno de los más estudiados y consiste de una molécula lineal con 48,502 pares de bases de doble cadena con pequeñas regiones de cadena sencilla. Estas cadenas sencillas de los extremos son complementarias de manera que pueden aparearse y producir un ADN circular. La recombinación homóloga de sitio específico catalizado por una enzima codificada por lambda ocurre entre un sitio particular en el ADN del círculo cerrado de lambda y un sitio particular en el cromosoma del huésped o sustrato. Esto da como resultado la integración del ADN de λ en el cromosoma del huésped, etapa principal en un proceso de litografía molecular.

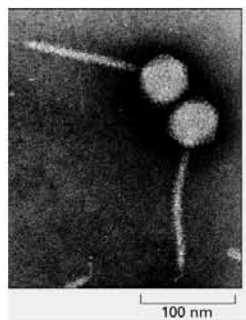


Figura 18. Micrografía electrónica del bacteriófago lambda.

II.2.3 Proteína RecA

Gran parte de lo que se conoce de la bioquímica del ADN recombinante o recombinación genética originalmente surgió del estudio de bacterias, especialmente de *e. coli* y sus virus [Alberts, B., *et al*, 2002]. Este avance se logró al aislar un amplio conjunto de mutantes en procesos de recombinación para *e. coli* y sus virus ya que tienen periodos de generación cortos y genomas relativamente pequeños [Muller, N., *et al*, 1992]. Esto fue posible debido a que las enzimas permiten cortar las unidades covalentes fosfodiéster en las cadenas de ADN. A estas enzimas se les conoce como nucleasas, y entre ellas destacan las endonucleasas de restricción.

Las endonucleasas de restricción son un tipo de enzimas que se encuentran en diferentes especies microbianas y son herramientas esenciales para la disección *in vitro* del ADN. Pueden hidrolizar o romper algunos de los enlaces covalentes o cortar moléculas circulares de ADN, reconocen y segmentan pequeñas secuencias específicas de ácidos nucleicos (oligonucleotidos). Así, es posible digerir o romper uniones internas fosfodiéster en el ácido nucleico de manera reproducible, usando enzimas de restricción para producir oligonucleotidos de tamaño variable.

En los procesos de ADN recombinante se requiere el uso de diversos tipos de enzimas de restricción. En particular la proteína *RecA* de *e. coli* tiene un papel central en la recombinación entre cromosomas. Ésta y sus homólogas en otros organismos (como humanos) hacen posible la sinapsis (formación inicial de pares de bases entre cadenas de ADN complementarias en diferentes moléculas de ADN que ocurre en un punto de cruce entre cromosomas). En nuestro trabajo, *RecA* se une fuertemente a una cadena sencilla de

ADN (csADN) del bacteriófago lambda, formando agregados altamente cooperativos o filamentos nucleoproteicos [Alberts, B., *et al*, 2002]. Estos filamentos tienen algunas propiedades características. Por ejemplo, tienen más de un lugar de unión al ADN, por lo que puede unirse o aparearse simultáneamente y mantener juntas a una cadena sencilla y a una doble hélice de ADN. Estos lugares permiten a la proteína *RecA* catalizar una reacción de varias etapas entre una doble hélice de ADN y una región homóloga de una cadena de ADN. La migración de la cadena catalizada por la proteína *RecA* por una de las que conforman la cadena doble de ADN (dcADN) complementaria ocurre después de producirse el proceso de sinapsis [Reebek J., 1994], véase Figura 19. Una región no apareada en una de las cadenas sencillas de ADN desplazará a otra cadena sencilla que se haya apareado, de forma tal que el punto de bifurcación se desplazará sin que varíe el número total de pares de bases del ADN.

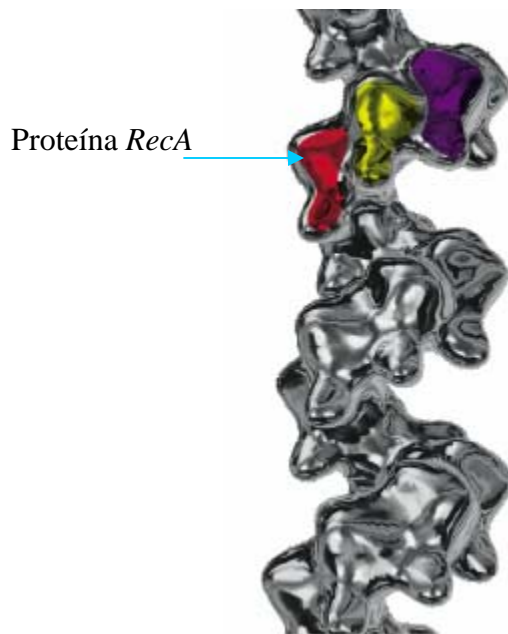


Figura 19. Proteína *RecA* recombina con una doble cadena de ADN.

CAPÍTULO III. TÉCNICAS EXPERIMENTALES

La Bioquímica es la rama de la Química que estudia a los seres vivos, especialmente la estructura y función de sus componentes químicos específicos, como son las proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos [wikipedia.com]. El estudio de la biología molecular concierne principalmente al entendimiento de las interacciones de los diferentes sistemas de la célula.

A finales del siglo XIX, los científicos comprendieron que se podría trascender mediante el estudio de las células con ayuda de la bioquímica y biología molecular. Probablemente la mejora más significativa en las técnicas químicas fue el desarrollo y empleo de trazadores; ello incrementó ampliamente la sensibilidad de detección y el número de clases de moléculas biológicas que podían ser identificadas; por ejemplo, ADN, ARN, proteínas, nucleótidos, lípidos y otros compuestos. A medida que se requerían métodos más sensibles para la separación de macromoléculas y/o separación de diversos componentes en una reacción bioquímica, se hizo especial e indispensable el empleo de la electroforesis, técnica descrita en la sección III.1. Existen diferentes técnicas de tinción para observar los resultados de una electroforesis, pero la más utilizada por ser una técnica fácil de realizar y muy confiable es la tinción por medio de bromuro de etidio técnica explicada en la sección III.2 de este capítulo. En tiempos remotos, el único método de estudio de sistemas biológicos *in vitro* era la observación directa. Hoy en día pueden llevarse a cabo observaciones mucho más específicas, detalladas y complicadas mediante la microscopía electrónica o mejor aún por microscopía de fuerza atómica como la que se describe en este capítulo en la sección III.3.

III.1 Electroforesis

La mayoría de los polímeros biológicos poseen carga eléctrica y, por lo tanto, son capaces de migrar bajo la influencia de un campo eléctrico. Esta es la propiedad de las biomoléculas que lleva a cabo el transporte y separación de partículas de acuerdo a su masa a través de un solvente mediante un campo eléctrico. Este proceso recibe el nombre de electroforesis.

Una forma usual de caracterizar una macromolécula es la determinación de la velocidad con que se mueve al someterla a un campo eléctrico. Esta propiedad puede ser utilizada para calcular el peso molecular de una proteína, para distinguir moléculas por su carga neta o su forma, para detectar cambios de aminoácidos y para separar cuantitativamente distintas especies moleculares [Efron M., 1960].

Para entender el proceso de electroforesis, consideremos un primer modelo sencillo del movimiento de un cuerpo sólido en un fluido en el que existe una fuerza de arrastre semejante a la fuerza de fricción en dinámica de sólidos. Un objeto de masa m que se encuentra inmerso en un fluido tal que experimenta una fuerza de arrastre D que aumenta linealmente con la velocidad v y que actúa siempre en dirección opuesta al desplazamiento del objeto

$$D = bv$$

(9)

La constante b depende de las propiedades del objeto (tamaño) y de las propiedades del fluido (densidad y viscosidad). De aquí que a partir de la segunda ley de Newton,

$$\sum F = F_{ext} - bv = ma = m \frac{dv}{dt}, \quad (10)$$

donde F_{ext} es alguna fuerza externa que experimenta el objeto. De esta expresión podemos ver que cuando la velocidad del objeto aumenta, habrá un momento en el cual la fuerza de arrastre será igual a la fuerza externa que se ejerce sobre el cuerpo. Por lo tanto, llegará un momento en que la aceleración sea cero. Cuando esto ocurre se dice que el objeto ha alcanzado una velocidad terminal; es decir, una velocidad constante. Si se resuelve la ecuación diferencial dada en (10) se llega a la siguiente expresión:

$$v(t) = \frac{F_{ext}}{b} (1 - e^{-bt/m}), \quad (11)$$

donde se supone que la F_{ext} no es una función explícita del tiempo y el medio no cambia. Ahora bien, si t es grande y/o el medio es lo suficientemente viscoso o denso, la velocidad terminal, v_t , será:

$$v_t = \frac{F_{ext}}{b} \quad (12)$$

Como se dijo al principio de la sección la fuerza externa aplicada en el caso de electroforesis se debe a un campo eléctrico. Por lo tanto,

$$F_{ext} = qE \quad (13)$$

sustituyendo (13) en (12) se tiene,

$$v_t = \frac{qE}{b} \quad (14)$$

donde v_t depende de las propiedades del fluido para una biomolécula dada a un campo eléctrico fijo. De aquí que la velocidad terminal en una electroforesis nos da información sobre el tamaño de la partícula [Zwaan, J., 1967].

La electroforesis se puede llevar a cabo en diferentes tipos de solvente o geles, tales como almidón, poliacrilamida y agarosa. Por la utilidad en este trabajo, nos hemos

enfocado sólo a estos dos últimos. Los geles como medio de soporte proporcionan una inestimable resolución, particularmente para proteínas y ácidos nucleicos. Las razones se deben a que combinan una reducción de la difusión por la malla del gel y la acción separadora de la cromatografía en gel, tamiz molecular. Estas dos características se relacionan con la constante b en (14) y que a su vez determina la velocidad de transporte de esa biomolécula en cuestión.

Los geles de poliacrilamida tienen un mayor efecto como tamiz molecular y por proporcionar el control del tamaño de sus poros utilizando distintas concentraciones de monómeros, además de presentar una adsorción despreciable del material proteico [Raymond, S., 1964]. La poliacrilamida es el medio de soporte más efectivo para la electroforesis de proteínas y pequeñas moléculas de ARN. Para la separación de ácidos nucleicos de mayor tamaño, es mejor utilizar geles de agarosa. El gel de poliacrilamida se prepara mediante la polimerización de acrilamida con N,N'-metilen-bis-acrilamida. El arreglo experimental para la electroforesis de poliacrilamida se muestra en la Figura 20.

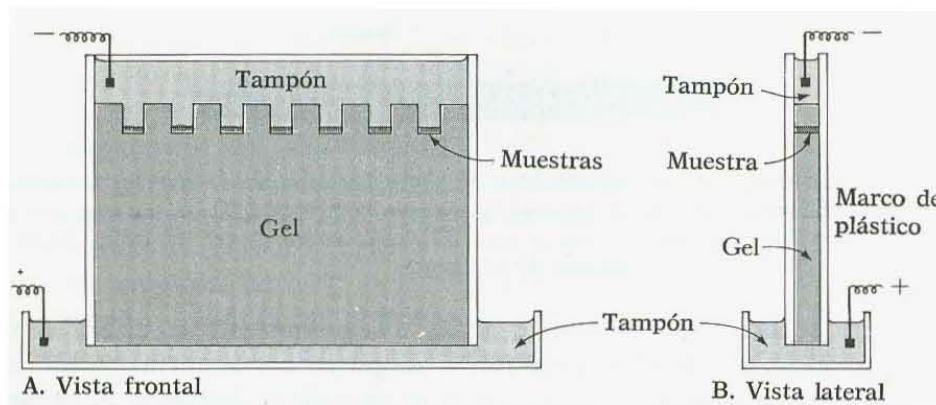


Figura 20. Esquema de un aparato para electroforesis vertical de poliacrilamida.

La electroforesis en geles de poliacrilamida es probablemente la técnica electroforética más versátil y útil para el análisis y separación de macromoléculas. En la electroforesis de ácidos nucleicos, el efecto de tamiz molecular del gel también es el

principal factor de la separación puesto que la relación carga/masa es prácticamente la misma para todos los polinucleótidos [Weber, K., *et al*, 1969]. De este modo, las moléculas de menor tamaño avanzan más rápidamente a través del gel que las de mayor tamaño. Como las moléculas de ácido nucleico que se encuentran en la naturaleza son de gran tamaño, los poros del gel deberán ser igualmente grandes; es decir, el gel deberá estar diluido. Para la solidificación de los geles, especialmente cuando se trata de separar grandes moléculas ($M > 5 \times 10^6$ gm/mol, siendo M el peso molecular), se les añade un polisacárido altamente poroso, la agarosa [Freifelder, D., 1981]. La agarosa que se obtiene de ciertas algas marinas es un polímero lineal de D-galactosa y 3,6-anhidro-1-galactosa y forma un gel que se mantiene compacto sin necesidad de entrecruzamientos por medio de puentes de hidrógeno [Freifelder, D., 1981]. Se disuelve en agua hirviendo y forma un gel cuando se enfría. La concentración del material en el gel determina el tamaño de los poros. Debido a ello, es útil para el análisis o la separación de grandes proteínas globulares o grandes moléculas lineales como el ADN. La electroforesis por agarosa se realiza con geles en placa como se muestra en la Figura 21.

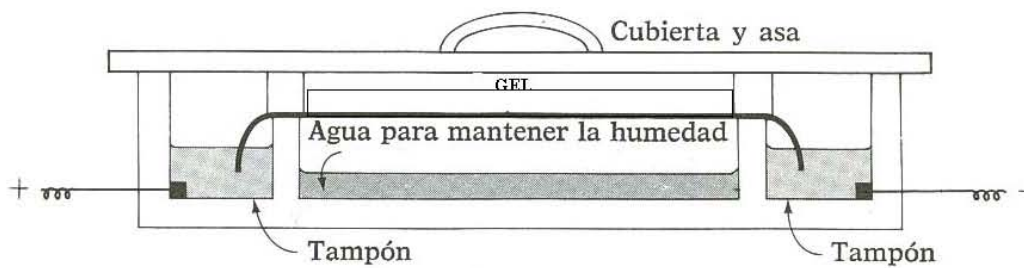


Figura 21. Montaje experimental para la electroforesis de un gel de agarosa.

III.2 Observación de geles en UV

Después de realizar una electroforesis, el siguiente paso es observar los resultados y para ello la técnica más utilizada es la observación de geles en luz ultravioleta (UV). En muchos casos los resultados de una electroforesis no son observables a simple vista, de aquí que es necesario introducir un compuesto fluorescente por enlace químico o simple acoplamiento a las biomoléculas ya separadas para su observación. En espectroscopía de fluorescencia, la utilización de compuestos fluorescentes o marcadores se denomina método de fluorescencia extrínseca [Pesce, A., *et al*, 1971]. Para un mejor resultado, el marcador a utilizar debe cumplir con las siguientes propiedades: (1) el compuesto fluorescente debe enlazarse fuertemente en un solo lugar de la molécula; (2) su fluorescencia debe ser sensible a las condiciones ambientales; y (3) no debe afectar a las características de la macromolécula a estudiar.

Para los ácidos nucleicos se utilizan varios compuestos fluorescentes tales como anaranjado de acridina, proflavina y bromuro de etidio, $C_{21}H_{20}BrN_3$, como en este trabajo se utilizó el bromuro de etidio nos enfocaremos en su descripción y técnica. El bromuro de etidio (EtBr) es un agente intercalante usado comúnmente como marcador de ácidos nucleicos en laboratorios de biología molecular para procesos como electroforesis en gel de agarosa. Cuando se expone esta sustancia a luz ultravioleta, emite una luz roja-anaranjada que se intensifica unas 20 veces después de haberse unido a una cadena de ADN. Este efecto se debe al aumento de la hidrofobia del medio. Como el bromuro de etidio se intercala en el ADN, esta sustancia tiene un poderoso efecto mutágeno y, posiblemente puede ser cancerígeno o teratógeno, alto riesgo biológico (☠), por lo que hay que tener las debidas precauciones en su manejo en el laboratorio [Zwaan, J., 1967].

III.3 Microscopía electrónica de barrido y microscopía de fuerza atómica

La visualización de objetos materiales a escalas más allá de las anatómicas ha sido una necesidad y una preocupación del ser humano desde la antigüedad. En el caso particular de la amplificación de objetos no visibles a simple vista, o difícilmente observables, los primeros instrumentos desarrollados para visualizar detalles finos fueron los microscopios ópticos, que van desde una lupa hasta un microscopio compuesto, tal que el ojo humano no es capaz de resolver. En el transcurso de la historia de la ciencia se llegó a la conclusión que era necesario un instrumento que pudiera resolver imágenes de objetos menores que la parte inferior de la región visible del espectro electromagnético ($\sim 0.4\mu\text{m}$).

Con el desarrollo de la física cuántica a inicios del siglo XX, De Broglie propuso que las partículas materiales tienen comportamiento ondulatorio, y viceversa. Esto fue demostrado experimentalmente por Davisson y Germer al observar la dispersión e interferencia de electrones por un sólido cristalino, fenómenos puramente ondulatorios. Esto provocó el desarrollo de la microscopía electrónica, siendo el microscopio electrónico de barrido (SEM, scanning electron microscope) su herramienta fundamental.

El funcionamiento del SEM *Jeol 5300* consiste en acelerar electrones por medio de un campo eléctrico, aprovechando su comportamiento ondulatorio, con una diferencia potencial de 1 000 a 30 000 volts. Los electrones acelerados por un voltaje pequeño son utilizados para la observación de muestras muy sensibles, como podrían ser muestras biológicas o muestras aislantes, a diferencia de altos voltajes para muestras conductoras. Los electrones acelerados son enfocados por diversas lentes electrostáticas y magnéticas, cuya función es reducir la imagen del filamento de manera que incida en la muestra un

haz de electrones lo más pequeño posible para así tener una mejor resolución en la imagen. Otra herramienta importante para observar detalles más finos que los que se pudieran observar por SEM es la microscopía de fuerza atómica, que será descrita a continuación.

El microscopio de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés) cuenta con una técnica examinadora que produce alta resolución de imágenes tridimensionales de la superficie de una muestra. El AFM aplica una fuerza menor a 1 nN entre la punta del AFM y la superficie de la muestra al momento de examinarla. Esta pequeña fuerza se mide por medio del movimiento del cantilever o ménsula, teniendo una punta con masa muy pequeña y forma piramidal en su ápice, que es sumamente flexible. El AFM es capaz de examinar la superficie de conductores y aislantes a escala atómica con una apropiada técnica de medición del movimiento del cantilever. El AFM consiste en siete importantes componentes: el microscopio donde se encuentra la cabeza con el cantilever, el controlador, la computadora, el teclado, el ratón y los monitores de control y monitoreo de imagen, ver Figura 22.



Figura 22. Partes que componen el Microscopio de Fuerza Atómica.

Estos instrumentos son ampliamente usados por ser compactos y fácil de maniobrar, véase Figura 22. El principio de operación del AFM consiste en colocar una muestra sobre un cilindro (piezoeléctrico) para hacer el barrido sobre la superficie de la muestra (plano X-Y), y aproximar la muestra a la punta en dirección vertical (eje Z). Para ello sólo es necesario aplicar un voltaje alterno a los electrodos del piezoeléctrico en cierta dirección para controlar su dirección perpendicular a ésta. Las características topográficas de la superficie de la muestra hacen que el cantilever se deflece en la dirección vertical puesto que la muestra se desplaza bajo la punta manteniendo constante la fuerza de interacción entre la punta y la muestra por medio del piezoeléctrico.

Es esencial el desplazamiento en tres direcciones del piezoeléctrico sí se desea obtener el detalle morfológico tridimensional de la superficie de una muestra. Un cilindro piezoeléctrico convencional se muestra en la Figura 23. La piezoelectricidad es la propiedad que tienen ciertos materiales dieléctricos para polarizarse bajo la influencia de una deformación mecánica o, inversamente, para deformarse mecánicamente bajo la influencia de un campo eléctrico aplicado. Al aplicar un voltaje de corriente alterna en cierta dirección al piezoeléctrico, se produce un movimiento de “barrido” como se observa en la Figura 24.



Figura 23. Piezoeléctrico.

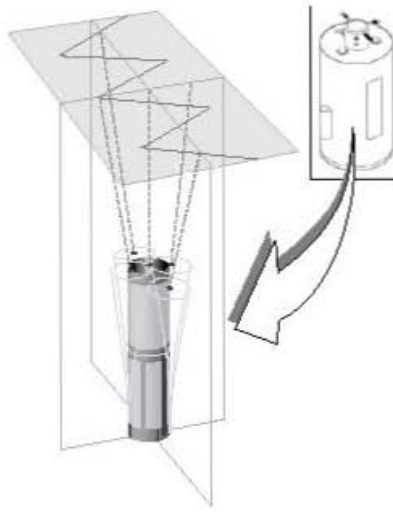


Figura 24. Esquematación del movimiento del piezoeléctrico.

Esto permite observar la imagen en el monitor de la computadora al momento de ser barrida la superficie de la muestra. El intervalo de la escala de “barrido” varía dependiendo del tipo de piezoeléctrico que tenga el AFM. Si se desea un mayor o menor rango de escala de “barrido” se tendrá que remover y colocar el piezoeléctrico adecuado [Manual AFM, Veeco].

La punta convencional es de nitruro de silicio con un radio de curvatura, r , de 30 a 50nm, lo que la hace muy puntiaguda. Un haz láser generado por un diodo es desviado por un prisma que se encuentra en la parte superior de la cabeza del microscopio, como se observa en la Figura 25. De aquí el haz se dirige a la parte posterior del punto donde se encuentra la punta en el cantilever, determinándose la posición de la punta respecto a la superficie de la muestra, ver Figura 25. La luz reflejada por el vértice del cantilever incide sobre un espejo que dirige el haz hacia un fotodetector (el fotodetector está dividido en cuatro cuadrantes comúnmente llamados detectores sensibles de posición).

Las diferentes señales que detecta el fotodetector en los cuadrantes superiores e inferiores le indican al AFM cuál es la deflexión vertical del cantilever, y el resto de los cuadrantes le indican la deflexión horizontal [Manual AFM, Digital Instruments].

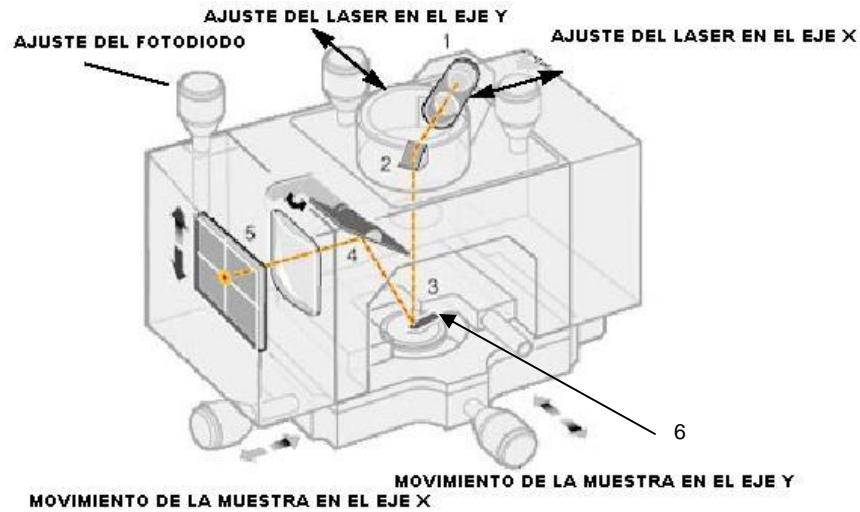


Figura 25. Láser (1), prisma (2), portacantilever (3), espejo inclinado (4), fotodetector (5), cantilever (6).

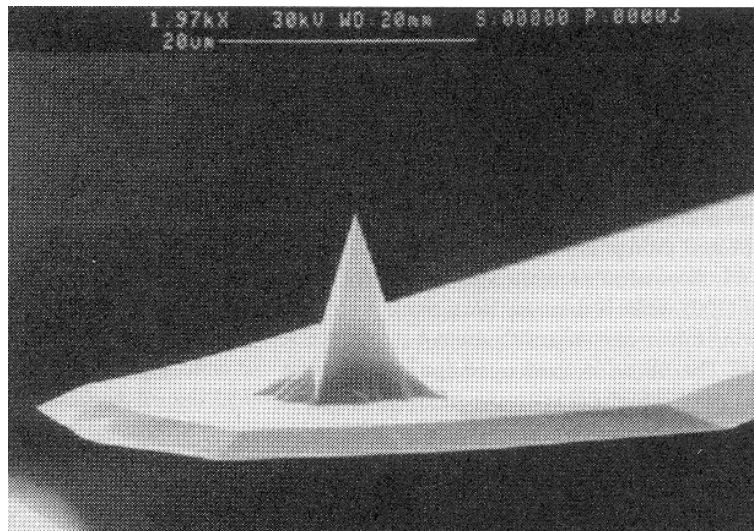


Figura 26. Cantilever comercial.

La clave para una operación exitosa de un AFM es la medida de la fuerza de interacción entre la punta y la superficie de la muestra. La punta ideal consiste en un solo átomo, la cual hace contacto con la superficie de la muestra [Manual AFM, Veeco]. La punta del cantilever se fabrica con un radio de curvatura lo más pequeño posible, idealmente $r \rightarrow 0$. Sin embargo, limitado por el proceso de manufactura de debastamiento por un haz de electrones, las puntas reales tienen radios de curvatura del orden de decenas de nanómetros como se indicó anteriormente. Las imperfecciones cristalinas y desbaste de las puntas limitan su agudez, véase figura 24. Estos cantilevers con puntas de nitruro de silicio son los menos costosos que se encuentran en el mercado.

Aunque no se ha dicho explícitamente hasta ahora, el modo de operación detallado con anterioridad se conoce como modo de contacto. En general, existen dos modos posibles de interacción de una punta en el AFM: “contact mode” (contacto permanente) y “tapping mode” (contacto intermitente o de resonancia). Una punta de SiN se utiliza en el modo de contacto y de Si en el modo intermitente. A diferencia del funcionamiento del modo de contacto, el modo de resonancia como su nombre lo indica consiste en que la punta del cantilever haga contacto con la superficie de la muestra de manera instantánea e intermitente, véase figura 27 (a). Para ello es necesario poner a oscilar automáticamente el cantilever hasta encontrar su frecuencia de resonancia para una amplitud dada antes de que haga contacto con la superficie de la muestra. Al igual que en el modo de contacto en aire, bajo condiciones óptimas es posible lograr imágenes en resolución atómica, ver figura 27 (b). El modo de contacto, que es el que tiene mayor resolución, se utiliza para muestras sólidas o recubrimientos delgados con una buena adherencia sobre superficies sólidas. Por otro lado, el modo intermitente es el más

utilizado para muestras que se dañan con facilidad o que no están bien adheridas al sustrato y, actualmente, también se emplea en fluidos para obtener imágenes de muestras biológicas que sólo son estables en soluciones acuosas.

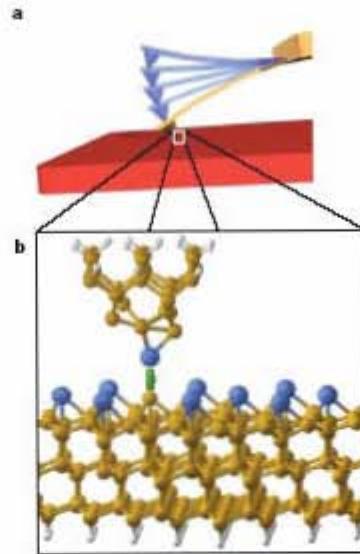


Figura 27. Diagrama esquemático mostrando la interacción de la punta con la superficie de la muestra en el modo “tapping” (a), y ampliación en “resolución atómica” de esta interacción (b).

Una notable aplicación del AFM es obtener imágenes de muestras en fluido. Esta técnica nos da la posibilidad de analizar muestras biológicas en su ambiente natural; es decir, en soluciones donde las muestras se mantengan estables en condiciones ambientales [Guidelines for fluid operation, Veeco]. Las muestras a observar son aquellas en las que se tenga control de temperatura, pH, presión, etc., y/o si es necesario observar cambios que se presenten mientras se lleva a cabo una reacción. Una ventaja de obtener imágenes en fluido, respecto a aire en condiciones ambientales, es que elimina la fuerza de atracción debido a la tensión superficial presente en una muestra con una capa de vapor condensada (grado de humedad). Esto permite que la imagen sea obtenida con una

mínima fuerza de contacto entre la punta y la muestra dando la posibilidad de observar material biológico, en especial genético, o muestras sumamente delicadas en su entorno natural.

Esencialmente el procedimiento para observar muestras en fluido es el mismo que para modo de contacto o “tapping” en aire. La modificación principal radica en la manera en que se prepara e inyecta la muestra en el portamuestra, y el arreglo de este para que el fluido no se escape o derrame. Para este fin se usa una celda para fluidos como aditamento especial. La celda de fluidos consiste en un pequeño compartimento de cristal con un alambre en forma de clip que sujeta la punta de SiN, como se muestra en la Figura 28. Este ensamble hace la función del portacantilever en el modo de aire, ver (3) en la Figura 25. La superficie de cristal funciona como un plano transparente. La celda de fluidos tiene un círculo en bajo relieve sobre una de sus caras donde se coloca un anillo de plástico (O-ring) que al hacer contacto con el porta muestra sella y aísla el fluido permitiendo que no se contamine ni se disperse sobre el piezoeléctrico, ver figura 28.

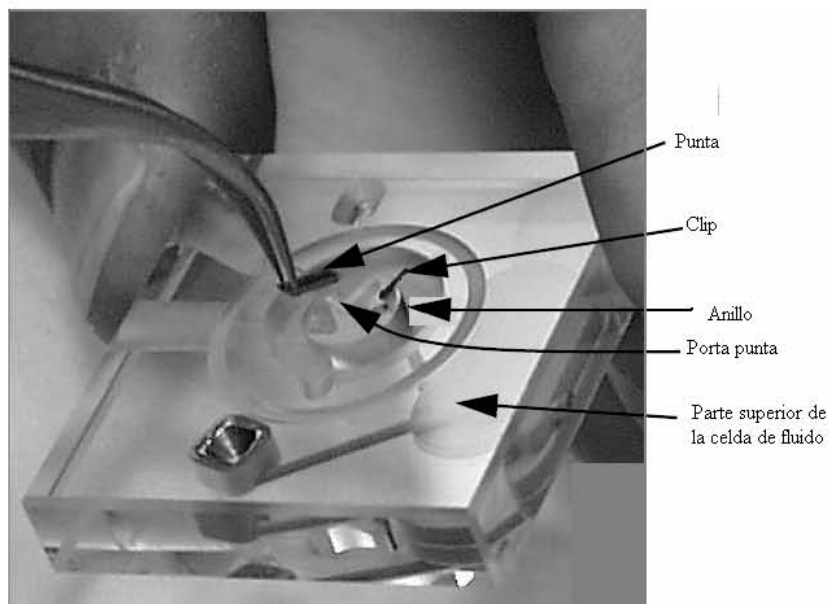


Figura 28. Componentes de una celda para fluidos.

Como se muestra en la figura 29, el portamuestra se prepara previamente colocando una superficie hidrofóbica (una capa de mica sobre una de teflón) sobre una de sus caras para que la muestra se concentre en una sola gota sobre la superficie y evitar que se derrame.

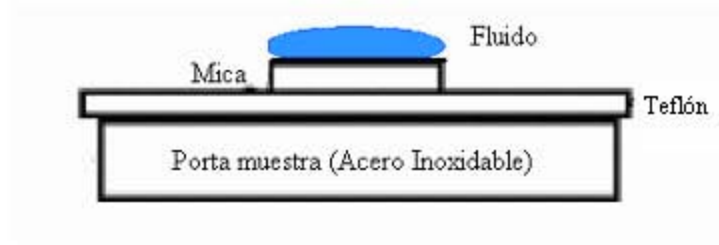


Figura 29. Corte seccional esquemático de la celda de fluidos.

Esta fue la manera en que se prepararon por AFM las muestras de ADN lambda digerida con la enzima Hind III y el fragmento correspondiente a 2027 pares de bases. Para las muestras de recombinación y metalizadas se utilizó el modo intermitente en aire.

III.4 Caracterización elemental

Como se mencionó al inicio de la sección III.3, se hace incidir un haz de electrones primarios para visualizar una muestra en SEM. Algunos de estos electrones primarios colisionarán y expulsarán electrones de los átomos de la muestra, llamados electrones secundarios. Estos electrones secundarios son característicos de los elementos que conforman la muestra y son utilizados para determinar su composición química o elemental. Dado que la estructura electrónica de cada elemento químico es distinta, es de esperarse que, si es estimulada adecuadamente, entonces cada elemento emitirá un patrón característico. La energía que pierden los electrones al “chocar” contra la muestra puede hacer que otros electrones secundarios salgan despedidos y así dejar al átomo ionizado; es decir, inestable por lo que buscará su estado de mínima energía mediante la emisión de electrones Auger o fluorescencia de rayos X [Energy Dispersive X-ray Microanalysis].

La fluorescencia de rayos X y los electrones Auger a nivel atómico se pueden entender en una primera aproximación considerando un modelo atómico simple. Cuando un electrón incidente golpea y desprende un electrón secundario de una órbita cercana al núcleo se produce un hueco el cual será llenado por un electrón de una órbita superior, este electrón que sustituye el hueco tendrá que perder energía para bajar a un nivel de energía menor, tal que este “exceso” en energía se emite como un fotón de rayos X, véase figura 30 [Ávalos, M., *et al*, 1991]. Puesto que los niveles de energía están muy bien definidos para cada uno de los átomos, la energía del fotón emitido es característica y específica del átomo excitado.

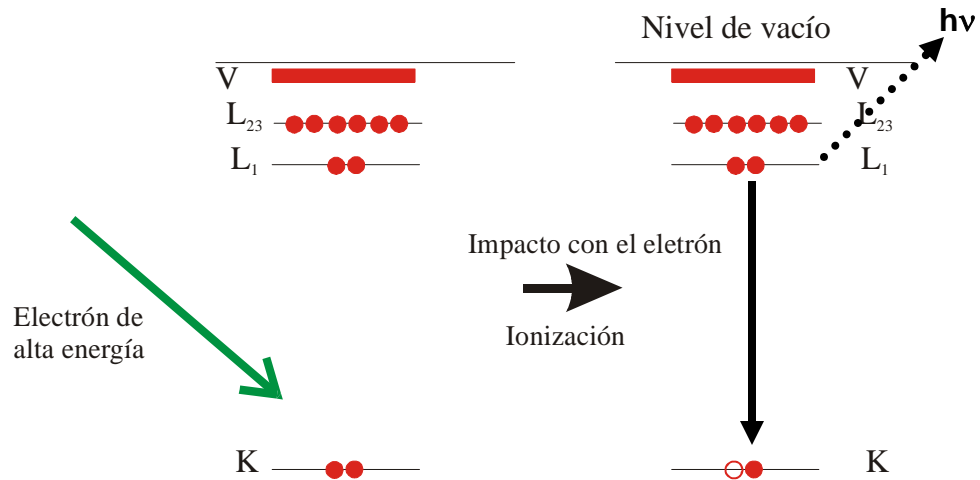


Figura 30. Ionización de un átomo y emisión de un fotón.

Una manera de relacionar la energía del fotón expulsado con el tipo de átomo que lo emite es la ley de Mosley [Ávalos M. et al, 1991]. Esta relaciona la energía del fotón y el número atómico del elemento correspondiente,

$$E = c_1(Z - c_2)^2 \quad (15)$$

donde E es la energía del fotón característico, Z es el número atómico y c_1 y c_2 son parámetros ajustables para diferentes tipos de línea de emisión; por ejemplo, K_1 . La Figura 31 muestra la dependencia entre la energía del fotón y el número atómico, para diferentes líneas. Esta relación es la que hace factible el análisis elemental por medio de SEM. Por ejemplo, si se tiene sodio con número atómico 11, entonces sólo producirá una línea K en $E = 1.04 \text{ keV}$.

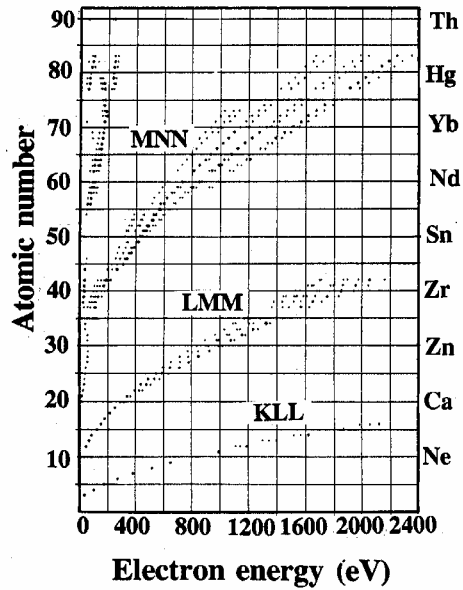


Figura 31. Relación entre energía y el número atómico.

En los años 1960's, el laboratorio de Lawrence Berkeley desarrolló un detector a base de Si que puede separar un haz de fotones de rayos X de acuerdo a la energía; esta técnica se llama espectroscopía de rayos X por dispersión de energía (conocida como EDS por sus siglas en inglés, Energy Dispersive Spectroscopy). En la técnica EDS la muestra es estimulada por un haz de electrones con una energía de 1 keV hasta 30 keV, que es el mismo rango de energía usado en SEM para visualizar una muestra.

La detección de fotones de rayos X se lleva a cabo en el SEM *Jeol 5300* mediante un detector de Si contaminado con Li. Este material tiene la característica de que produce pares de electrón-hueco cuando un fotón de rayos X pasa por el material. De esta manera y con la ayuda de la electrónica asociada es como se obtuvieron los espectros de EDS mostrados en este trabajo.

CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos en la síntesis y caracterización de nanoalambres usando ADN como mediador. En la sección IV.1 se explica el método utilizado para la polimerización, formación del filamento de nucleoproteína al polimerizar la proteína *RecA* sobre la cadena sencilla de ADN-lambda, seguido de una recombinación homóloga con la doble cadena de ADN-lambda y por último la metalización del ADN recombinado. En esta sección también se describe el método experimental para fijar y estirar el ADN.

En la sección IV.2 se describe la técnica de electroforesis que fue utilizada para verificar la polimerización y recombinación del filamento con la doble cadena, los geles obtenidos de la electroforesis se tiñeron con bromuro de etidio para ser observados con luz UV. Después de haber verificado los resultados por luz ultravioleta se procedió a determinar su morfología por microscopía de fuerza atómica y microscopía electrónica de barrido, sección IV.3. Esta etapa es muy importante tanto para la observación por AFM en aire como para el proceso de metalización del ADN. La composición química por EDS de los nanoalambres resultantes se muestra al final en la sección IV.3.

IV.1 Polimerización, recombinación homóloga y metalización

Nuestro procedimiento se basa en la polimerización de la proteína *RecA* sobre una cadena sencilla de ADN lambda formando un filamento nucleoprotéico, el cual es conducido a una reacción de recombinación homóloga con la doble cadena de ADN del bacteriófago lambda seguido de una metalización con una solución de nitrato de plata (AgNO_3), como se muestra en la Figura 32.

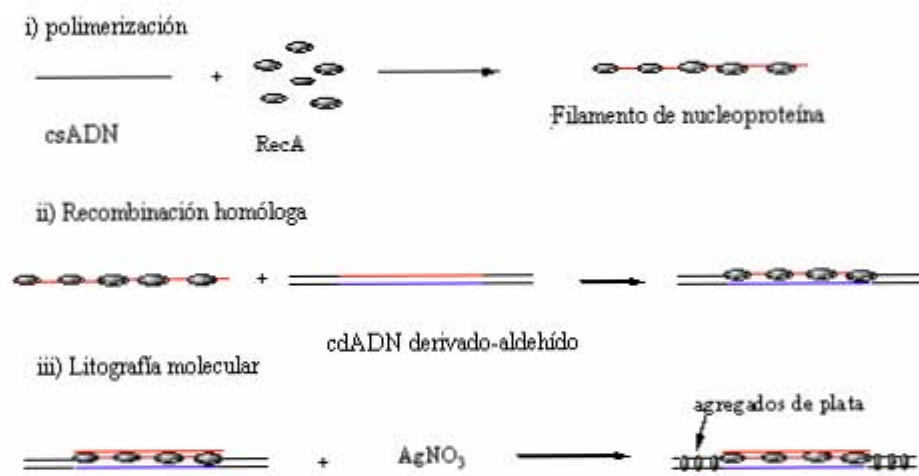


Figura 32. Esquema de la reacción de recombinación homóloga y litografía molecular.

A continuación se describen las etapas del procedimiento experimental. Para llevar a cabo el proceso de recombinación homóloga previamente se depositó ADN-lambda digerido con la enzima de restricción *HindIII* (Sigma Aldrich, D9780) en un gel de agarosa al 1%. La enzima *HindIII* reconoce el sitio específico de nucleótidos en el ADN lambda y luego procede al rompimiento de algunas de las uniones covalentes fosfodiéster en estas secuencias. El sitio donde hace el corte la enzima es la secuencia específica: A↓AGCTT. La Figura 33 muestra el resultado obtenido después de la

electroforesis donde se observan los diferentes cortes de la enzima *HindIII* sobre el ADN-lambda. Esto da lugar a la presencia de varias bandas que corresponden a diferentes pares de bases de ADN (pbADN). En particular se desea extraer la banda correspondiente a 2027 pares de bases ya que posee una sección homóloga en el centro de las 48,502 pares de bases que caracteriza al ADN del bacteriófago lambda, ver sección II.2.2.

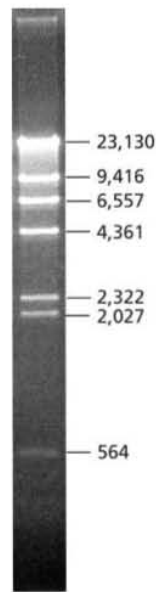


Figura 33. ADN- λ digerido con *HindIII* en un gel de agarosa al 1%.

Después de haber hecho la extracción del fragmento de 2027 pares de bases, se purifica con el kit de Invitrogen “pure link, quick gel extraction” (No. Cat. K2100-12). Esta depuración debe llevarse a cabo para eliminar todo residuo de agarosa y cualquier otro agente desfavorable que altere una adecuada litografía molecular, esto es la síntesis de un nanoalambre de plata.

Una vez obtenido y purificado el fragmento deseado, se desnaturalizó para obtener la cadena sencilla de ADN. Para este efecto, una cantidad de 3 μ l del fragmento

de 2027 pares de bases del ADN-lambda se diluyó en agua destilada, desionizada y estéril. Posteriormente se incubó a 95° C durante 5 minutos, seguido de 5 minutos en hielo para asegurar la desnaturalización. Después, como etapa previa a la polimerización, a los fragmentos desnaturalizados se les agregó 25 mM de Hepes (4.16 µl), 1 mM de acetato de magnesio, AcMg, (1 µl), 1 mM de ATP (0.76 µl). Para que se lleve a cabo el proceso de polimerización de la nucleoproteína, se añaden 6 µl de proteína *RecA* a la solución anterior incubándola a 37°C por 15 minutos. De acuerdo con este paso, se obtiene una relación estequiométrica de 6.25 µg de *RecA* por cada 0.165 µg de cadena sencilla de ADN al polimerizar la proteína *RecA* sobre la cadena sencilla de ADN. Posteriormente, se le agregó a este sistema 10u/ml de creatina fosfoquinasa (6.25 µl) y 10 mM de fosfocreatina (2.5 µl). Inmediatamente se vierte un sistema regenerativo de ATP (1.22 µl) que es esencial para completar las reacciones de intercambio entre cadenas. Una vez obtenidos los filamentos de nucleoproteína, se realizó la recombinación homóloga de estos con la doble cadena de ADN-lambda digerida con *HindIII* al agregar 16 mM de AcMg (4.26 µl), Hepes (6.66 µl) y ADN-lambda digerido con *HindIII* (4 µl) a la solución ya mencionada para luego incubarla a 37°C por 1 hora. Como un método alternativo, se puede sustituir el ADN-lambda digerido con *HindIII* por ADN-lambda puro. Esto se llevó a cabo pero no considero necesario mostrar los resultados en este trabajo.

Para completar el proceso de síntesis del nanoalambre por litografía molecular, es necesario tener en las moléculas de ADN un agente reductor que esté localizado sobre el sustrato de ADN. Para este fin se efectuó la derivación con glutaraldehído en la macromolécula de ADN. Específicamente se adicionó glutaraldehído al 0.2% (0.8 µl) por 10 minutos a temperatura ambiente seguido de 10 minutos en hielo para que identifique y

reaccione con el AgNO_3 . Este tratamiento de derivación deja intacto al ADN preservándose con sus características de reconocimiento molecular. Por último, se eliminó el exceso de proteína agregando $1.3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteinasa K ($6.25 \mu\text{l}$) y 32 mM de EDTA ($3.2 \mu\text{l}$), ácido etilendiaminotetraacético ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$), por 20 minutos a 37°C .

Simultáneamente al proceso de metalización, se separa una cierta cantidad de segmentos de ADN recombinado para verificar por electroforesis el proceso de recombinación homóloga. Para esto se elaboraron geles de agarosa al 1% y de poliacrilamida al 7%. El gel de agarosa se preparó disolviendo 0.250 gr de agarosa en 25 ml de buffer o solución amortiguadora TBE 0.5 X. El buffer TBE se obtiene mezclando 5.4 gr de Trizma Base (Sigma Aldrich T1503), 2.75 gr de ácido bórico (Sigma Aldrich, B7901) y 2 ml de EDTA. Posteriormente, se colocaron $5 \mu\text{l}$ de muestra con $2 \mu\text{l}$ de colorante (loading dye D9780, Sigma Aldrich) en el gel que se encuentra dentro de la cámara electroforética llenada al ras con el buffer TBE 0.5X, como se muestra en la Figura 21 del Capítulo III. La electroforesis se hizo con un potencial eléctrico de 75 V entre electrodos por 1 hora.

Para los geles de poliacrilamida, se preparó una solución que contenía 9.70 ml de agua destilada y desionizada, 1.50 ml de buffer TBE 10 X, 3.75 ml de acrilamida, $70 \mu\text{l}$ de persulfato de amonio y $40 \mu\text{l}$ de TEMED (N,N,N,N'-tetrametilnediamina). Se vertió la solución en la cámara de preparación hasta el borde y se coloca con cuidado el separador, aguardando 15 minutos hasta que polimerice la solución. Una vez polimerizado, se satura la cámara de corrimiento con el gel de un buffer TBE 1 X, como se muestra en la Figura 20 del Capítulo III. Previo al análisis de la muestra, se depositó un $1 \mu\text{l}$ de colorante (loading dye D9780, Sigma Aldrich) en $5 \mu\text{l}$ de muestra. Por último, esta mezcla se

colocó en la cámara electroforética y se analizó aplicando un voltaje de 110 V por 4 horas. Los resultados se muestran en la siguiente sección.

Después de haber verificado el proceso de recombinación homóloga mediante electroforesis, se procedió a la fijación y estiramiento de las cadenas de ADN sobre sustratos de SiO₂. Allemand y colaboradores [Allemand, J.F., *et al*, 1997] presentan una serie de técnicas para estirar y “peinar” la molécula de ADN para formar fibras de ADN y analizarlas en aire donde utilizan sustratos de silicio previamente tratados con silano y ozono para su limpieza. Después de haber sido limpiados los sustratos se les deposita una solución a base de poliestireno y tolueno. Una variación al método desarrollado por Allemand se utilizó en este trabajo y se describe a continuación. Para la observación de muestras por AFM en aire, y sobre todo para el estiramiento, hay que llevar a cabo un tratamiento especial previo al análisis [Henegariu *et al*, 2002]. Este consiste en formar fibras rectas de ADN que se mantengan estables en aire a condiciones ambientales. Primeramente se prepara una alícuota con una concentración de 2-5 ng/μl de ADN en 10 mM de buffer aminometil propanediol a un pH de entre 8.2 y 8.5. Después de haber hecho la disolución se pipetea de 7 a 8 μl de ADN sobre un sustrato de Si (previamente limpiado con solventes en una cuba de ultrasonido por una hora), se coloca sobre el borde del sustrato con el ADN otro sustrato de Si inclinándolo lentamente hasta quedar uno sobre el otro. Por último, se presionan con fuerza por aproximadamente 20 segundos dejándolos secar por 10 min a temperatura ambiente.

Para llevar a cabo la metalización de los fragmentos de ADN recombinados, se incubó el ADN en la ausencia de luz “blanca” (región visible) en una solución de 0.1 M de AgNO₃ (pureza del 99.7%, Productos Naturales) disuelta en un buffer de amoníaco al

25% con un pH de 10.5 (tratado con 70% de HNO₃) a temperatura ambiente durante toda una noche. En esta etapa, se obtienen agregados de plata a lo largo del sustrato o “andamio” de ADN en aquellas regiones no protegidas por la proteína *RecA*. Estos agregados son los que generan el nanoalambre que se observa y caracteriza morfológicamente por microscopía de fuerza atómica (AFM) y microscopía electrónica de barrido (SEM).

IV.2 Tinción de gel con bromuro de etidio

Una de las técnicas más utilizadas para visualizar los resultados de electroforesis es la observación del gel en la región UV del espectro, descrita en la sección III.2. Para aplicar ésta técnica, se retiró momentáneamente el gel de agarosa de la cámara de electroforesis, como se describe en la sección anterior, después de quince minutos de haber iniciado el experimento. Se coloca en un recipiente, se tiñe el gel con bromuro de etidio por 15 minutos en ausencia de luz “blanca” y, posteriormente, se regresa a la cámara para continuar la electroforesis. La diferencia principal entre la tinción por bromuro de etidio de un gel de poliacrilamida con respecto a la tinción de uno de agarosa, es que el primero se realiza una hora después de haber finalizado la electroforesis.

Después de haberlos teñido y terminado el proceso de electroforesis, se procedió a observarlas con luz ultravioleta en el transluminador (cámara donde se encuentra la lámpara ultravioleta). Como se observa en la Figura 34, las bandas en la parte superior, correspondientes a 4361, 6557 y 9416 pares de bases de ADN-lambda, son ligeramente cóncavas (curvas) y aglomeradas. Esto se debió a que el tiempo de la “corrida experimental” del gel de poliacrilamida, 4 horas, no fue lo suficientemente largo para permitir que se separaran bases con un peso molecular grande. Por el contrario, esto no ocurrió con las bandas correspondientes a 2027 y 2322 pb, que se observan planas y bien definidas después de 4 horas de electroforesis. La Figura 35 muestra un acercamiento y ampliación de la Figura 34 de la zona de interés de las columnas correspondientes a 2027 pares de bases. Se observan tres diferentes columnas electroforéticas de un gel de poliacrilamida ya teñidas. La primera de estas columnas, de izquierda a derecha, corresponde a la muestra control, muestra que se le dio el mismo tratamiento descrito en

la sección IV.1 pero no se le añadió la proteína *RecA* en el proceso de polimerización. La segunda columna concierne al ADN-lambda digerido con la enzima *HindIII* y la tercera corresponde a la muestra de ADN-lambda digerido con *HindIII* recombinado con la proteína *RecA*. En la columna marcada *RecA* en la Figura 35, se observa un corrimiento de la banda correspondiente a 2027 pares de bases, línea sesgada, con respecto a la muestra control. Esto se debe al incremento en el peso molecular del ADN-lambda. Este es un indicio de que la proteína *RecA* se adhirió sobre los pares de bases del ADN-lambda, lo que implica que la proteína *RecA* se recombinó con ADN-lambda como se esperaba.

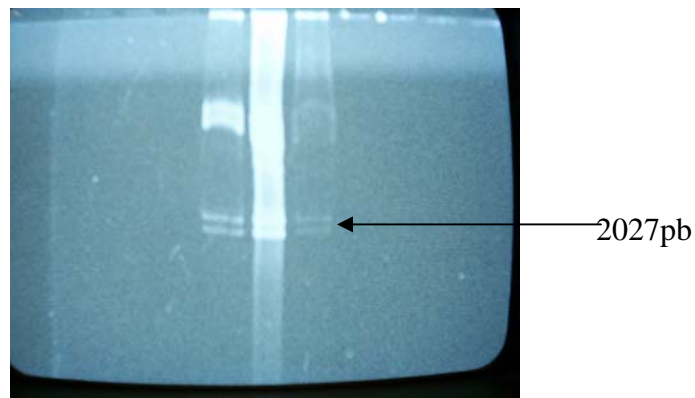


Figura 34. Resultados de electroforesis de poliacrilamida al 7% teñido con bromuro de etidio.

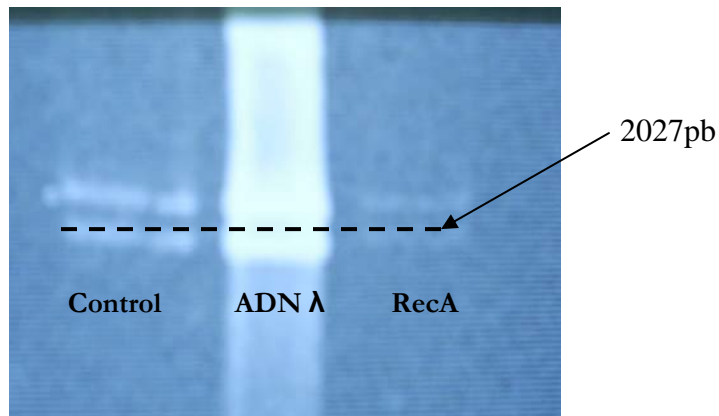


Figura 35. Detalle de la región de interés de la figura 34.

Los resultados derivados de la recombinación homóloga en geles de agarosa no son concluyentes por su falta de claridad, como se observa en la Figura 36, por lo que no se han incluido en este trabajo. Recordemos de la sección III.1 que la velocidad de migración electroforética, separación de bandas debido a la diferencia en peso molecular, depende de la densidad de carga de la molécula (relación carga/peso), del voltaje aplicado y de la porosidad del gel de electroforesis. Ahora bien, sabemos que la agarosa posee una matriz (conjunto de poros) de mayor tamaño que la poliacrilamida. Debido a esta diferencia, los resultados de recombinación no fueron lo suficientemente nítidos en geles de agarosa y esto hizo que se consideraran sólo los geles de poliacrilamida al 7% en nuestro análisis para tener resultados más precisos y confiables.

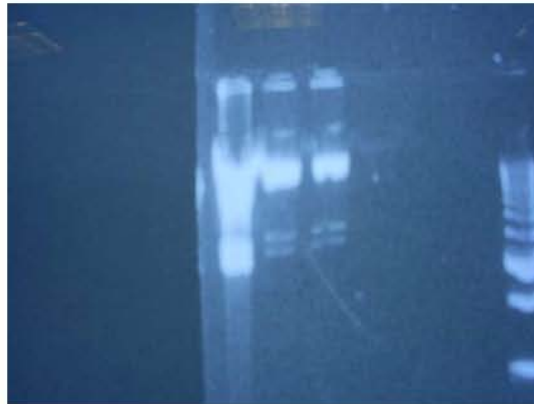


Figura 36. Resultados del gel de agarosa al 1%.

IV.3 Morfología

El estudio de la morfología de las muestras se llevó a cabo por microscopía de fuerza atómica (AFM) y microscopía electrónica de barrido (SEM). La observación por AFM de los resultados de polimerización, recombinación homóloga y metalización se realizaron en modo “tapping” o contacto intermitente. En este trabajo se analizaron muestras en aire y en fluido. Para obtener imágenes de ADN por AFM en fluido, se preparó un buffer de depósito con concentraciones de 4 mM Hepes, 1 mM KCl, 1 mM MgCl₂ a un pH 7.0. Además de la adecuada preparación del buffer, las condiciones necesarias para una buena observación por AFM de la cadena de ADN son: tener una frecuencia de barrido (sweep frequency) dentro del rango de 7 – 10 kHz y una amplitud de oscilación (drive amplitud) de 200 mV a 500 mV. Las muestras se colocan en el orden que se muestra en la Figura 37.

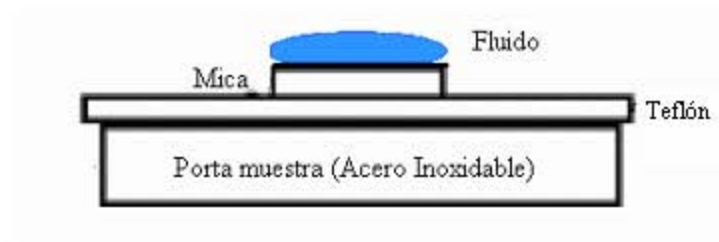


Figura 37. Diagrama esquemático mostrando el montaje de una muestra para ser observada por AFM en fluido.

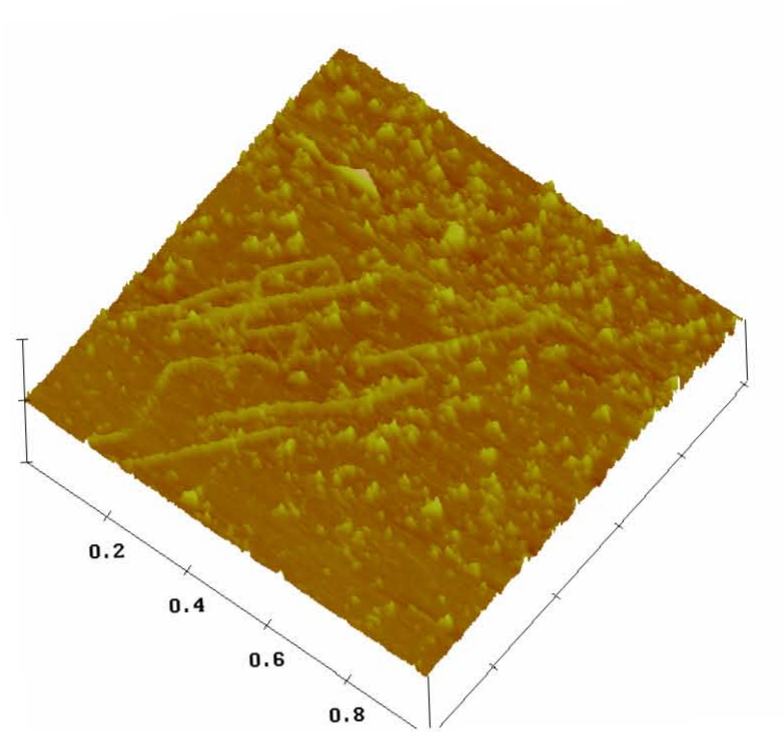


Figura 38. Imagen de nucleótidos formados por ADN-lambda digerido con HindIII a una escala de 1 μm .

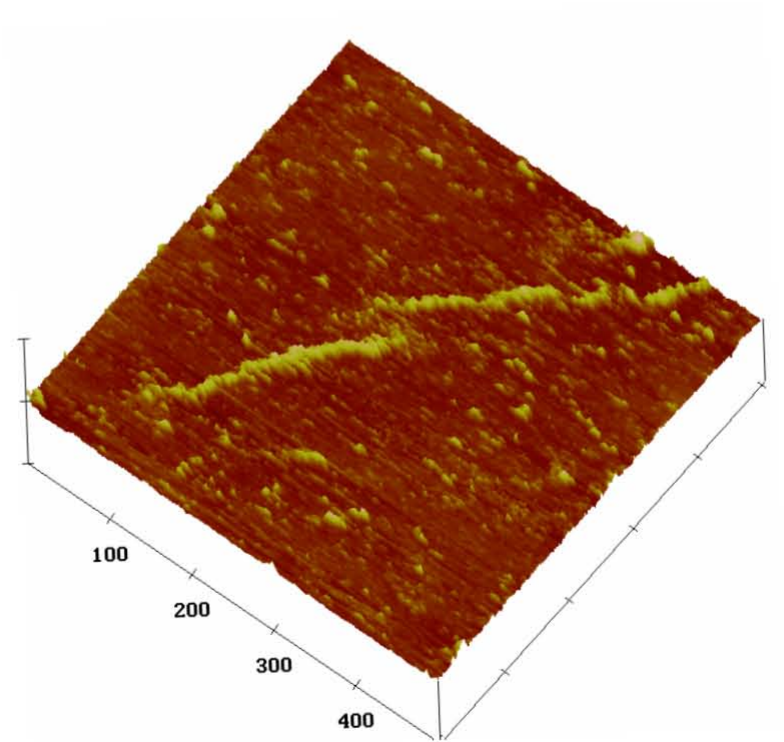


Figura 39. Imagen de nucleótidos formados por 2027pb a una escala de 500 nm.

Las Figuras 38 y 39 exhiben imágenes de cadenas de ADN digeridas con *HindIII* a tamaño de barrido de 1 μm y 500 nm, respectivamente, en medio fluido (solución amortiguadora). En la Figura 38, se muestran con claridad diferentes cadenas de ADN-lambda, mientras que en la Figura 39 se observa el detalle de una sola cadena. En ambas, también se perciben pequeños fragmentos dispersos en el sustrato. Estos fragmentos son nucleótidos de ADN-lambda que al ser expuestos a condiciones ambientales se activan las ADN-asas comenzando su degradación [Alberts, B., *et al*, 2002]. Esta degradación se observa claramente en la Figura 39, donde una doble cadena se ha segmentado en dos. Así mismo, podría pensarse que los pequeños fragmentos observados en las dos imágenes anteriores podrían ser el buffer de depósito. Para refutar esta posibilidad, se analizaron muestras donde sólo se depositaba el buffer sin ADN-lambda, véase Figura 40, no observándose nucleótidos como los mostrados en las figuras 38 y 39. Las imágenes no tenían contraste, eran llanas y planas.

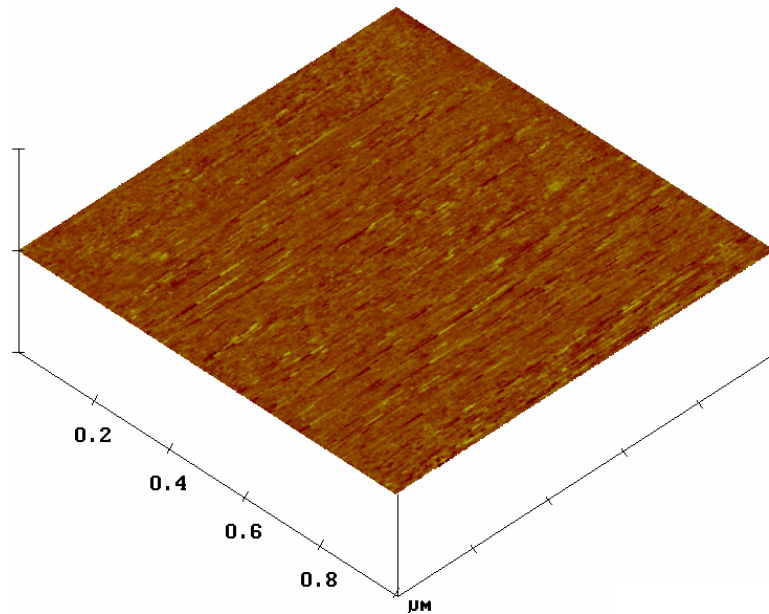


Figura 40. Imagen de buffer de depósito sin ADN-lambda.

El propósito de esta primera etapa de estudio morfológico del trabajo es observar el ADN-lambda en su ambiente fluido para que mantenga sus propiedades de reconocimiento molecular y evite su degradación. Además, como se muestra en la Figura 38, algunas de las cadenas de ADN continúan en su forma natural, ovillo, lo que no es conveniente para el proceso de metalización del ADN. Para este fin, es necesario que las moléculas de ADN se encuentren totalmente rectas para que los iones de Ag se adhieran y formen un nanoalambre. Por lo que se buscó una técnica alternativa para fijar en el sustrato y estirar los ovillos de ADN en línea recta. Esta técnica fue la desarrollada por Henegariu y colaboradores [Henegariu, O., *et al*, 2002] y se describe en la sección IV.1.

Al término de este procedimiento se está en condiciones de analizar las muestras de ADN por AFM en aire y metalizarlas. Las Figuras 41 y 42 muestran los resultados que se obtuvieron al haber hecho la recombinación homóloga de ADN-lambda con la proteína *RecA*. En estas se pueden observar uniones del tipo “Holliday”, la unión tipo “Holliday” inserta la nucleoproteína en la doble cadena de ADN desplazando una de las cadenas preexistentes y formando la unión Holliday heteroduplex [Lodish H., *et al*, 2000], este tipo de uniones son típicas y exclusivas para el proceso de recombinación homóloga de una proteína con ADN.

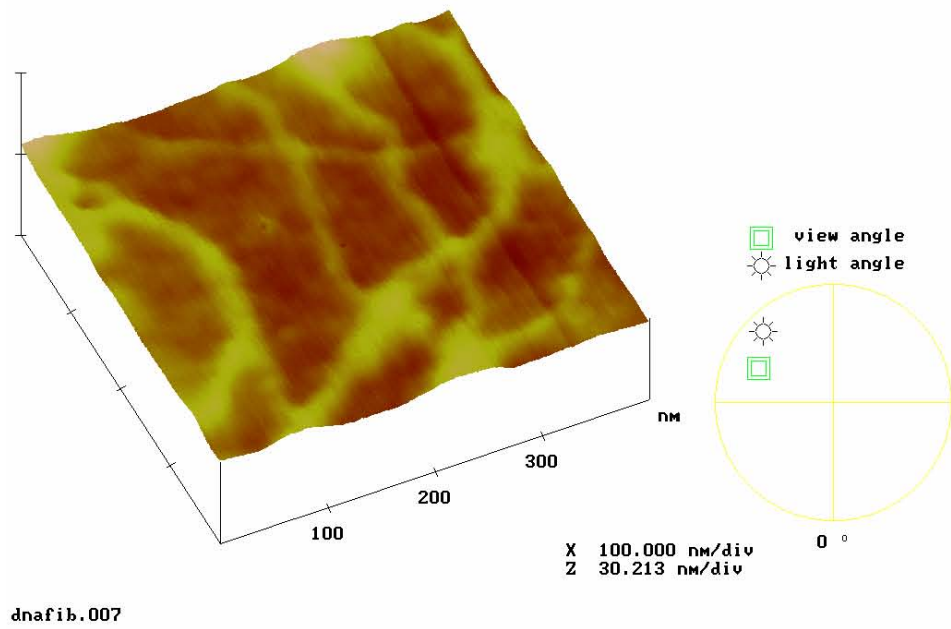


Figura 41. Imagen de la unión “Holliday” debido a la recombinación entre la nucleoproteína y la doble cadena de ADN-lambda.

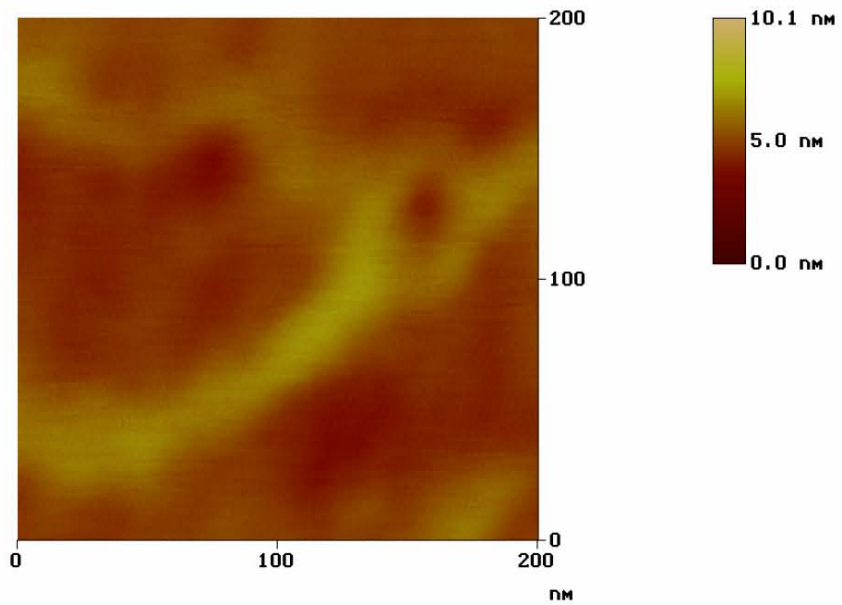


Figura 42. Acercamiento a la unión “Holliday” mostrada en la figura 41.

La Figura 43 muestra una fibra estirada de ADN recombinada y fijada en el sustrato antes de ser metalizada. La Figura 44 muestra la formación de posibles “islas” o “cúmulos” de plata a lo largo de la cadena de ADN recombinada después de haber metalizado por 14 horas el ADN mostrado en la Figura 43.

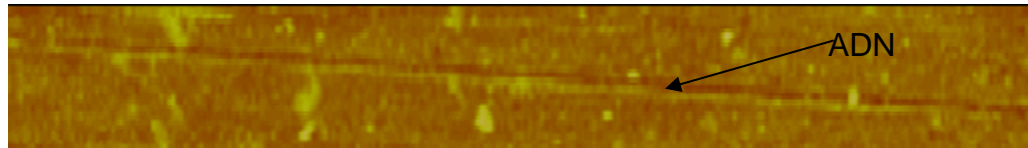


Figura 43. Imagen de AFM a una escala horizontal de $5\mu\text{m}$ de una fibra de ADN-lambda antes de ser metalizada.

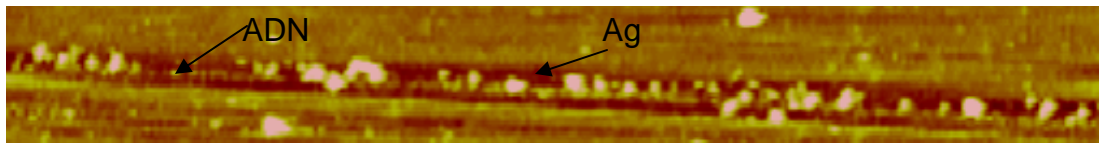


Figura 44. Imagen por AFM a escala horizontal de $5\mu\text{m}$ de una metalización de ADN-lambda recombinado con *RecA* a una concentración de $5\text{ ng}/\mu\text{l}$.

La Figura 45 muestra la imagen de SEM de un nanoalambre metalizado en una superficie de silicio recubierto con una delgada capa de oro por un tiempo de 14 horas. Se pueden observar que los cúmulos forman una línea recta a lo largo de la fibra de ADN original.

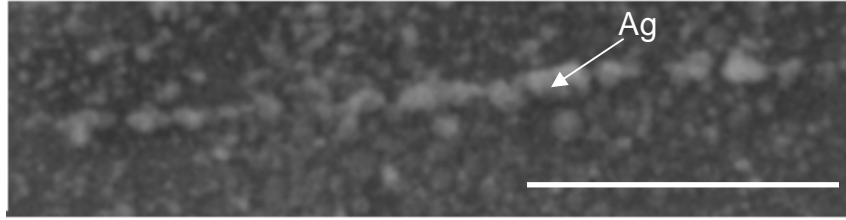


Figura 45. Imagen de SEM de islas de plata a lo largo de una doble cadena de ADN con una barra de escala de $4\mu\text{m}$.

Si se comparan las Figuras 44 y 45 se puede apreciar la notable similitud que existe entre las figuras obtenidas por técnicas de visualización distintas, AFM y SEM, de los agregados de plata a lo largo de la cadena de ADN-lambda. Es intuitivamente razonable pensar que si la metalización por 14 horas no fue suficiente para la síntesis de un nanoalambre continuo de plata; entonces si se extiende el tiempo de metalización, es probable que los cúmulos de plata se aglomeren y formen un continuo. De aquí que, el tiempo de metalización se incrementó a 24, 36 y 48 horas, siendo este último el lapso necesario para la síntesis de un nanoalambre continuo. Los resultados de la metalización por 48 horas, se observan en la figura 46, 48 y 51. La figura 47 muestra una imagen por AFM de un nanoalambre continuo de plata a lo largo de la cadena de ADN-lambda, lo que complementa los resultados obtenidos por SEM.

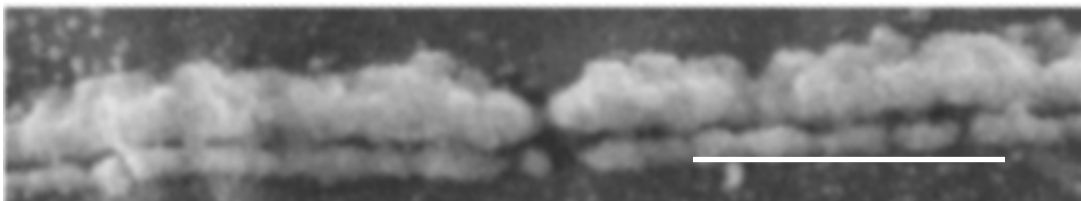


Figura 46. Nanoalambre de plata con una barra de escala de $4\mu\text{m}$.

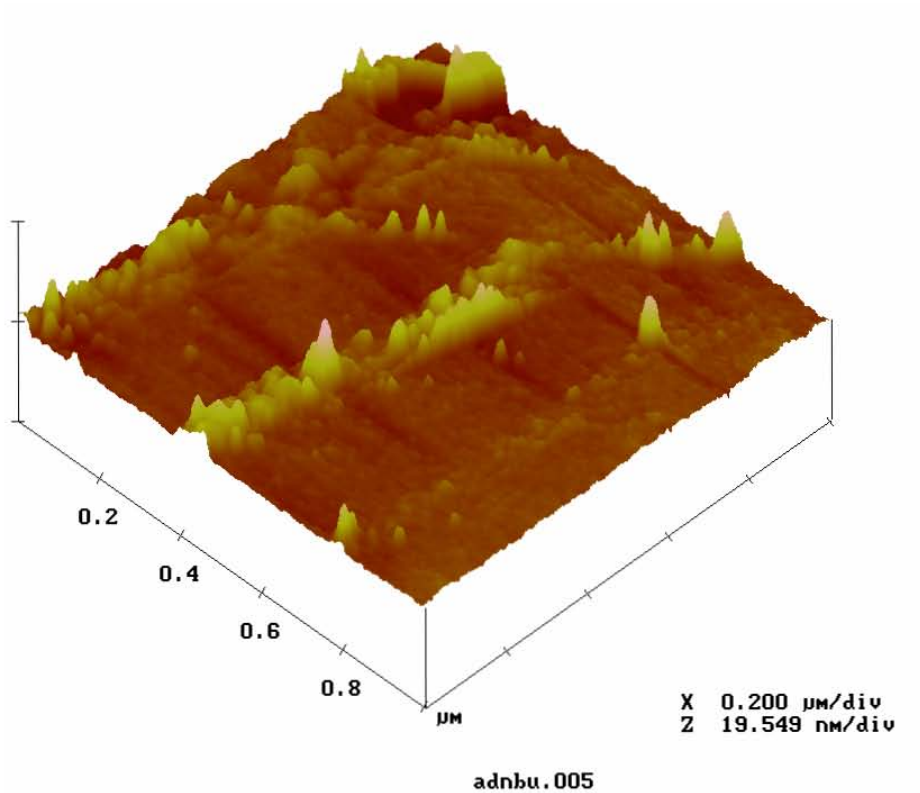


Figura 47. Nanoalambre continuo observado por AFM a una escala de 5 μm .

La Figura 46 muestra dos nanoalambres continuos y paralelos de plata a lo largo de la doble cadena de ADN-lambda recombinados y metalizados por un tiempo de 48 horas. La Figura 48 muestra un acercamiento de la Figura 46 donde se observa que uno de los nanoalambres tiene un mayor grosor. Esto se debe a que posiblemente se encontraban varias fibras de ADN unidas que resultaron en la formación de un nanoalambre con un mayor grosor, como se observa con mayor detalle en la Figura 49.

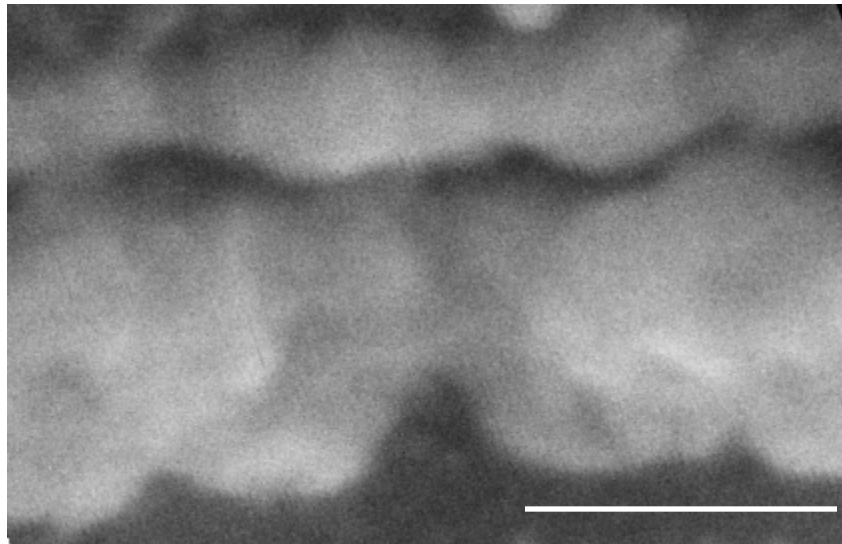


Figura 48. Acercamiento a los nanoalambres de la Figura 46, la escala de la barra es de 800nm.

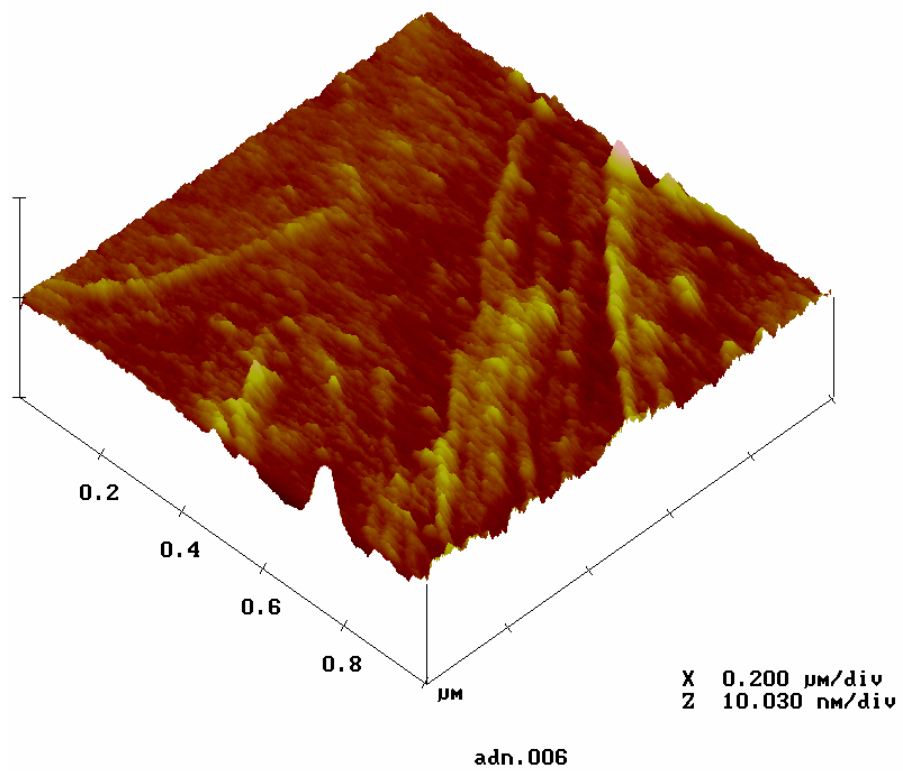


Figura 49. Imagen por AFM de diferentes nanoalambres continuos de plata.

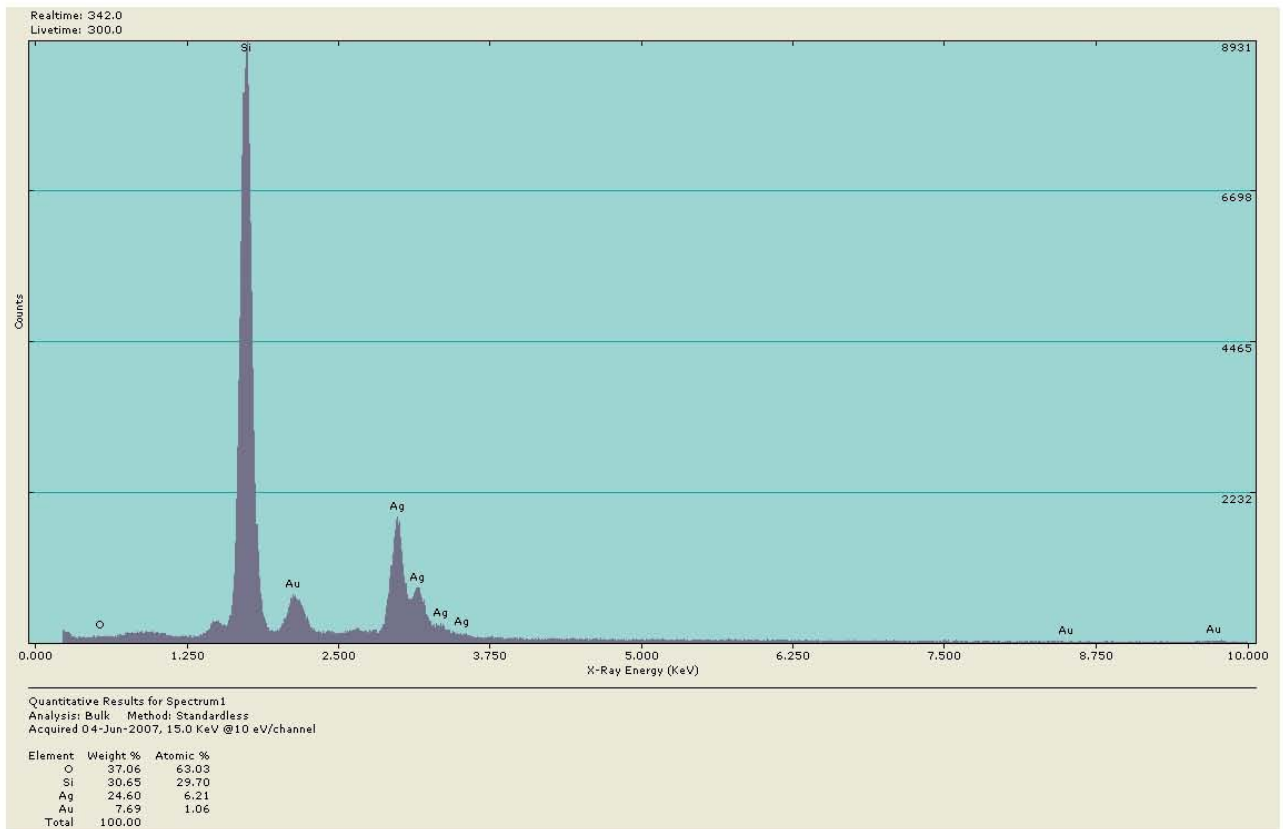


Figura 50. Composición química de los nanoalambres observados en la figura 46.

Después de haber obtenido los resultados por AFM y SEM era necesario y conveniente convencerse que las imágenes observadas eran nanoalambres de plata por lo que se procedió a realizarles un estudio puntual de composición elemental por EDS, la Figura 50 despliega un espectro típico.

La Figura 50 muestra el espectro característico por EDS del nanoalambre mostrado en la Figura 46, observando la presencia de cuatro elementos químicos. El análisis por EDS reporta una concentración atómica de 6.21% de Ag, 1.06% de Au, 63.03% de O y 29.70% de Si. La proporción relativa detectada para O y Si corresponde al sustrato de SiO_2 , la mayoría de las muestras presentan concentraciones semejantes a esta. La presencia de oro en las muestras se debe a que se depositó previamente unos cuantos

nanómetros de este material sobre los sustratos. Se considera que el volumen analizado por la técnica de EDS es el correspondiente al de un casquete semiesférico con un radio aproximado de $10\mu\text{m}$, es por esto que se tiene la presencia de los elementos Si, O y Au en el análisis químico. La Tabla 2 resume las concentraciones atómicas relativas de los espectros de EDS mostrados en las figuras 50, 52 y 54 y que son característicos de los nanoalambres de plata sintetizados en este trabajo.

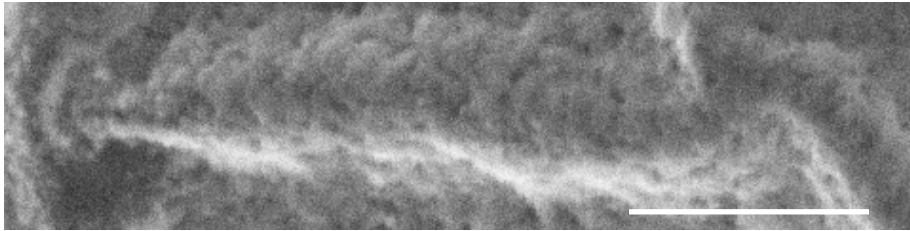


Figura 51. Nanoalambre continuo de plata con una barra de escala de $4\mu\text{m}$.

En la Figura 51, se observa una delgada capa de buffer de amonio cubriendo el nanoalambre de plata, esto se debe a que no se eliminó por completo la solución amortiguadora al lavar la muestra con agua destilada y desionizada después de la metalización por 48 horas. La Figura 52 muestra el espectro de EDS correspondiente al nanoalambre observado en la Figura 51. Un ejemplo más de la síntesis de nanoalambres se observa en la Figura 53, un par de nanoalambres continuos y paralelos de un mismo grosor. El espectro de composición elemental se presenta en la Figura 54.

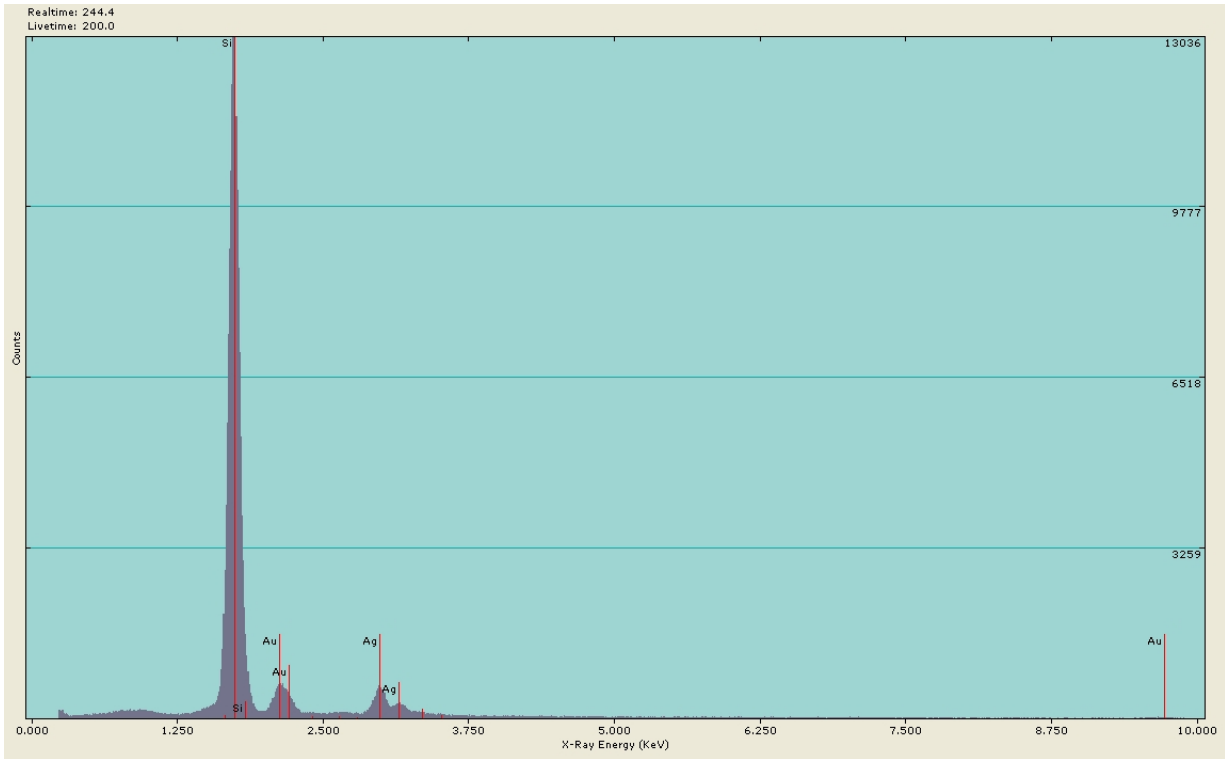


Figura 52. Análisis por EDS del nanoalambre observado en la figura 51.

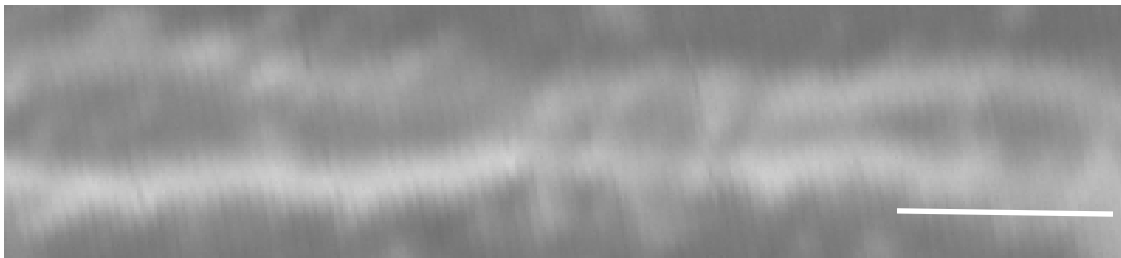


Figura 53. Imagen de ADN metalizado con una barra de escala de 1 μm .

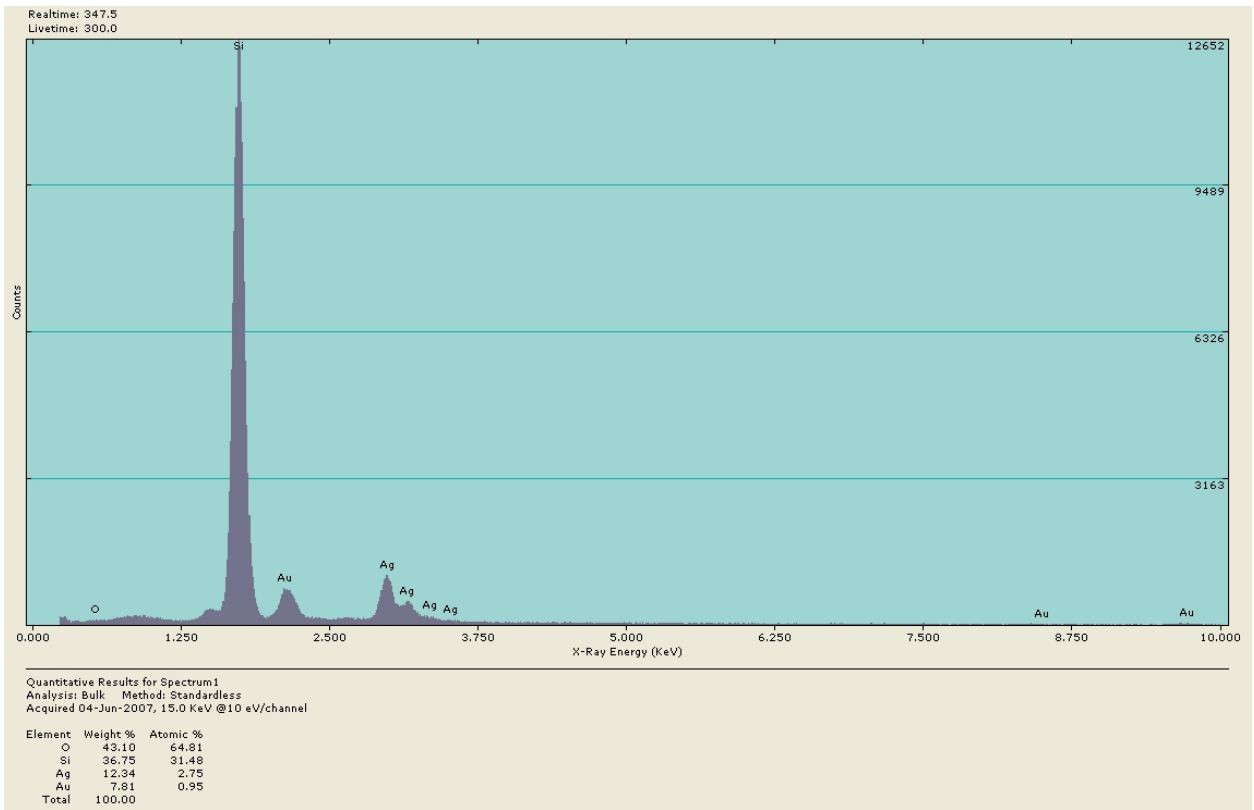


Figura 54. Análisis de composición química de la figura 53.

Tabla 2. Concentraciones atómicas relativas de los cuatro elementos detectados por EDS.

No. Figura	% O	% Si	% Au	%Ag
46	63.03	29.70	1.06	6.21
51	61.05	27.70	2.99	4.25
53	64.85	31.48	0.95	2.75

CAPÍTULO V. DISCUSIONES

El principal objetivo de este trabajo ha sido sintetizar nanoalambres continuos unidimensionales de Ag teniendo como mediador al ADN del bacteriófago lambda. Las diferentes etapas de la síntesis explicadas en la sección IV.1: digestión del ADN-lambda con la enzima de restricción *HindIII*, polimerización, recombinación homóloga y metalización fueron analizadas por microscopía de fuerza atómica (AFM) y microscopía electrónica de barrido (SEM).

Como se mencionó en el capítulo I, desde el punto de vista práctico, la molécula de ADN se considera un aislante pero con grandes ventajas. Entre las cuales se puede mencionar la propiedad de reconocimiento molecular y la capacidad de ensamblar nanopartículas dentro de una estructura bien definida con una precisión de escala nanométrica [Alivisatos, P.A., *et al*, 1996].

En un estudio precedente, Keren y colaboradores [Keren, K., *et al*, 2004] detectaron que al metalizar el ADN sin un tratamiento previo con un agente reductor, el ADN perdía sus propiedades biológicas. Esta fue la razón por lo que se prefirió utilizar el método de síntesis donde la molécula de ADN sea tratada con glutaraldehído, como agente reductor, en un proceso de recombinación homóloga con la proteína *RecA*. Bajo estas condiciones, la molécula de ADN sigue conservando sus propiedades biológicas intactas aún después de haber sido metalizada. Esto es de gran importancia tecnológica ya que esta sería una ruta viable para fabricar un dispositivo electrónico y vislumbrar la posibilidad de integrar circuitos.

Los resultados obtenidos mediante electroforesis expuestos en las Figuras 34 y 35 muestran que la recombinación homóloga con la proteína *RecA* se llevó a cabo; se

observa un corrimiento en la tercera columna del gel de poliacrilamida respecto a las otras dos columnas. Este corrimiento se debe al aumento del peso molecular de la doble cadena de ADN-lambda al haberse recombinado con la proteína; es decir, la nucleoproteína se ligó a la doble cadena. Por otro parte, las imágenes en las Figuras 41 y 42 de AFM complementan y corroboran los resultados obtenidos por electroforesis ya que muestran la unión tipo “Holliday”, que es específica y típica del proceso de recombinación homóloga [Lodish, H., *et al*, 1965].

Se observa en las Figuras 38 y 39, obtenidas por AFM, que las hebras de ADN se encuentran en su forma natural, ovillo o segmentadas. Se encuentran fraccionadas debido al método de análisis utilizado, que radica básicamente en la observación por AFM en modo “tapping” en un medio fluido. Se observó que el buffer de depósito mantuvo a las moléculas de ADN estables por un tiempo aproximado de 4 horas, sin que la degradación fuera significativa. Por otro lado, el análisis mostró que es necesario que las hebras o cadenas de ADN se encuentren fijas y estiradas sobre el sustrato para formar así una línea recta y permitir con ello que sea posible la metalización a lo largo de ellas.

Después de haber hecho la comparación de los resultados de la técnica de fijación y estiramiento de cadenas de ADN utilizada en este trabajo y desarrollada por Henegariu y colaboradores, ver sección IV.1, se observa que los resultados son consistentes con los reportados en la literatura reciente [Keren, K., *et al*, 2002], ver Figuras 43 y 55.

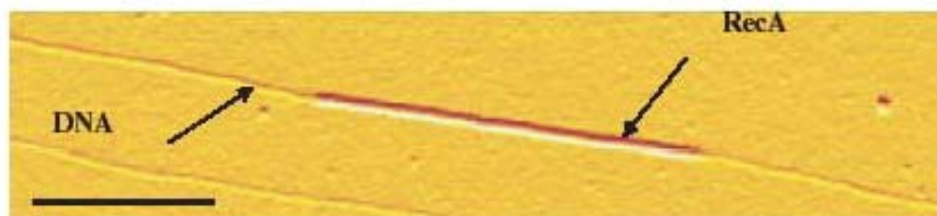


Figura 55. Fibra de ADN obtenida por Keren *et al.* La barra de escala es de 500nm.

Un conjunto de partículas o agregados que coligan a lo largo del ADN se observan claramente por AFM en la Figura 44. La hipótesis es que estos agregados o cúmulos estén formados por plata ya que se supone que al reducirse el AgNO_3 con el glutaraldehído se depositan y adhieren partículas de plata en los nucleótidos, véase la descripción del desarrollo experimental en la sección IV.1. Esta hipótesis se corrobora con los análisis de la composición química de las muestras hecha por EDS y cuya discusión se encuentra más adelante en este capítulo. Sin embargo, estos cúmulos de plata forman “islas” espaciadas y discretas, no continuas, a lo largo de la cadena de ADN, lo que no es conveniente para alcanzar el objetivo fundamental de este trabajo: obtener nanoalambres continuos. Esta fue la razón principal por lo que se propuso aumentar el tiempo de metalización de 14 a 48 horas, siendo este el tiempo mínimo para la formación de un nanoalambre continuo.

Las muestras metalizadas por 14 horas, fueron analizadas por AFM y SEM como se observa en las Figuras 44 y 45. Ahora bien si comparamos nuestros resultados con reportes recientes, se encuentra una notable semejanza morfológica, véase Figura 56 [Keren, K., *et al*, 2004]. El hecho de haber realizado análisis de nuestras muestras por dos diferentes microscopias confirma y complementa la formación de agregados de plata a lo largo de la cadena de ADN.

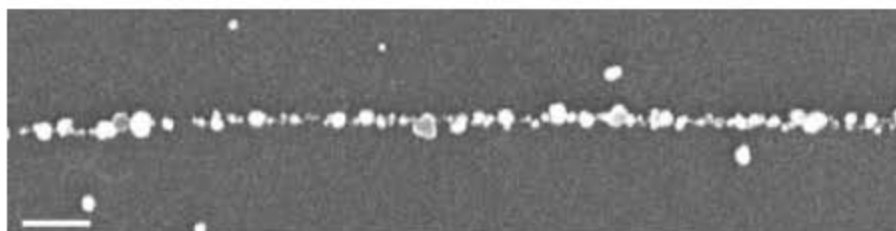


Figura 56. Imagen de SEM de las islas de Ag a lo largo del ADN a una escala de barra de 200nm. [Braun, E., *et al*, 2002].

En este trabajo se muestra que es posible la síntesis de nanoalambres unidimensionales y continuos en una primera metalización por un lapso de 48 horas, como se observa en las Figuras 46, 51 y 53. Se presupone que los nanoalambres observados por AFM y SEM son de Ag lo que se corrobora con un estudio de composición elemental por EDS. La ventaja de haber sintetizado nanoalambres continuos y unidimensionales en una primera metalización es de gran importancia debido a que en investigaciones recientes de síntesis de nanoalambres utilizando ADN como andamio, requerían de una doble metalización. Keren y colaboradores [Keren, K., *et al*, 2002] sintetizaron nanoalambres de plata utilizando ADN como andamio tal que la primera metalización se llevaba a cabo en una solución de AgNO_3 , formando cúmulos a lo largo de la cadena de ADN, véase Figura 56. Sin embargo, requerían de una segunda metalización para llenar los huecos entre los cúmulos de plata y así formar un nanoalambre continuo, véase Figura 57. Las desventajas de un segundo depósito es que se pierde control en el grosor del nanoalambre y la conductividad eléctrica tiende a ser menor que el del material en bulto [Qun, G., *et al*, 2006].

Los nanoalambres deben satisfacer las siguientes tres características:

- i) Alto control en las dimensiones de los nanoalambres durante la síntesis en un proceso “bottom-up” tanto o mejor que en los procesos convencionales “top-down”, como litografía.
- ii) Las propiedades de los nanoalambres unidimensionales deben ser comparables a las del material en bulto.
- iii) Posibilidad de ensamblaje de nanoalambres en sitios específicos sobre el sustrato [Qun, G., *et al*, 2006].

La importante diferencia que existe entre lo reportado por Seidel *et al* (2000), Keren *et al* (2002) y Ford *et al* (2001) es que metalizaron dos veces y con diferentes materiales para obtener un nanoalambre continuo, mientras que en nuestro trabajo una sola metalización con Ag fue suficiente para sintetizarlo.

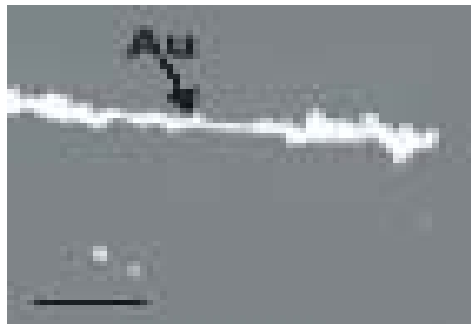


Figura 57. Nanoalambre observado por SEM, [Braun E. *et al*, 2002]

Se determinó la composición química de los nanoalambres continuos por medio de la técnica EDS, como se muestra en las Figuras 50, 52 y 54, exhibiendo que están formados por plata. La presencia de oro, oxígeno y silicio se debe a que la metalización de ADN se llevó a cabo en un sustrato de SiO₂ recubierto con una delgada capa de Au. Es importante señalar que aunque el ADN está compuesto por P, C, H, O y N, el análisis de las muestras por EDS no detectó la presencia de estos. Es probable que se deba a que la

concentración de estos elementos es tan pequeña comparada con los elementos detectados que está por debajo del nivel de resolución del instrumento.

Se realizó un análisis de sección por AFM para determinar la longitud y espesor de los nanoalambres sintetizados. La Figura 58 exhibe un nanoalambre continuo que corresponde a la Figura 47 mostrada en la sección IV.3. En esta figura se observa un nanoalambre con longitud aproximada de 500nm y un diámetro promedio de 7.5nm. El diámetro de este nanoalambre no es homogéneo, como se aprecia en la Figura 58, es probable que esto se deba a una superposición de partículas de plata en los bucles de de las cadenas de ADN debido a que estas no son perfectamente lineales. La Figura 59 exhibe un nanoalambre más uniforme que la figura anterior. Se observa que el nanoalambre tiene una longitud aproximada de 750nm y un diámetro promedio de 2nm. A diferencia del anterior, se observa un “pico” aislado de plata con una altura de 4nm. Estas dos figuras son un ejemplo de la síntesis de nanoalambres continuos unidimensionales de plata en una primera metalización.

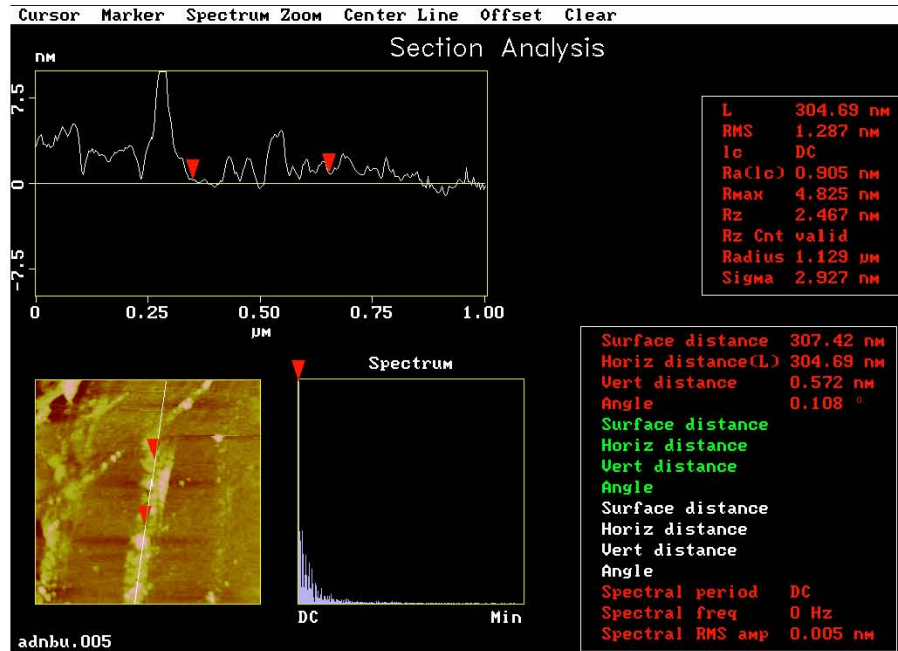


Figura 58. Análisis de sección transversal de un nanoalambre de plata. La imagen mostrada en la parte inferior izquierda tiene una escala de $2\mu\text{m} \times 2\mu\text{m}$.

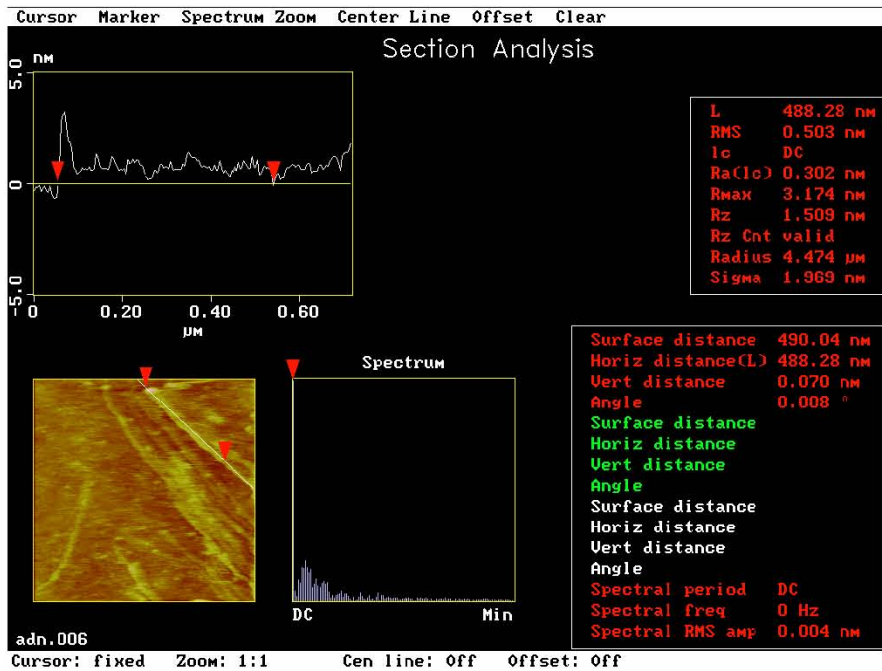


Figura 59. Análisis de sección transversal de un nanoalambre. La imagen mostrada en la parte inferior izquierda tiene dimensiones de $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$.

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

- Se sintetizaron nanoalambres continuos de plata caracterizados elementalmente por EDS utilizando el ADN del bacteriófago lambda como mediador.
- Se demostró que es posible sintetizar nanoalambres continuos sin haber requerido de una segunda metalización.
- El método propuesto abre nuevas posibilidades para la construcción de dispositivos electrónicos mediante procesos biológicos, utilizando a la molécula de ADN como andamio.
- Se determinaron las condiciones adecuadas para el estudio morfológico de cadenas de ADN por Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) en un medio fluido y en aire.
- Se logró observar las imágenes por AFM y/o SEM de la síntesis de nanoalambres de plata.
- Se obtuvo la composición química de los nanoalambres continuos de plata.

LITERATURA CITADA

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., y Walter P. **Molecular Biology of the Cell**, 4ta ed. New York & London: Gerland Publishing, 2002.

Allemand, J.F., Bensimon, D., Jullien, L., Bensimon, A., y Croquette V. **pH-Dependent Specific Binding and Combing of DNA**, Biophysical Journal **73**, 1997.

Alivisatos, P.A., Johnsson, K.P., Peng, X., Wilson, T.E., Loweth, C.J., Bruchez, M.P. y Schultz, P.G. **Organisation of nanocrystal molecules using DNA** Nature **382**, 1996.

Avalos, M. y Gradilla, I. **El mundo a través del microcopio electrónico de barrido** Conciencia **2**, 1991.

Bashir, R. **DNA-mediated artificial nanobiostructures: state of the art and future directions** Superlattices and Microstructures **29**, 2001.

Bolivar, F. **Obra Científica IV: La Genética Moderna: fundamentos y horizontes** El Colegio Nacional, 2000.

Braun, E., Eichen, Y., Sivan, U. y Ben-Yoseph, G. **DNA-templated assembly and electrode attachment of a conducting silver wire**, Nature **391**, 1998.

Burns, J.A., Butler, J.C., Moran, J. y Whitesides, G.M. **Selective Reduction of Disulfides by tris-(2-carboxyethyl) phosphine**. Journal of Organic Chemistry **56**, 1991

Chang, R. **Química**, 7ma ed. Mc Graw Hill, 2002.

Duan, X., Huan, Y., Cui, Y. y Lieber, C. **Nanowire Nanoelectronics Assembled from the Bottom-Up, in Molecular Nanoelectronics**, M.A. Reed and T. Lee Inc. 2003.

Efron, M. **High voltage paper electrophoresis. Chromatography and electrophoretic techniques** 1960.

Energy Dispersive X-ray Microanalysis, KeveX Instruments Inc., Santa Barbara, CA.

Filardo, J.M. **50 años del transistor**, 1997.

Ford, W.E., Harnack, O., Yasuda, A. y Wessels J. **Platinated DNA as precursors to templated chain of metal nanoparticles** *Advanced Materials* **13**, 2001.

Freifelder, D. **Técnicas de bioquímica y biología molecular** 2da ed. Reverté, S.A. 1981.

Hall, H.E. **Solid State Physics** John Wiley and Sons 1979.

Heath, J.R. y Ratner, M.A. **Molecular electronics** *Physics Today* **56**, 2003.

Henegariu, O., Grober, L., Haskins, W., Bowers, P.N., State, M.W., Ohmido, N., Bray-Ward, P., y Ward D.C. **Rapid DNA Fiber Techniques for Size Measurements of Linear and Circular DNA Probes** *BioTechniques* **31**, 2001.

Herald I. **Solid-state physics: an introduction to principles of materials sciences** Goldsmid, 1998.

Keren, K., Krueger, M., Gilard, R., Ben Yoseph, G., Sivan, U. y Braun E. **Sequence-specific molecular lithography on single DNA molecules** *Science* **297** 2002.

Keren, K., Berman, R.S. y Braun E. **Patterned DNA metallization by sequence-specific localization of a reducing agent** *Nano letters* **4**, 2004.

Kittel, C. **Introduction to Solid State Physics** 8va ed. John Wiley and Sons Inc, 2004.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L., Matsudaira, P., Baltimore, D. y Darnell J. **Molecular Cell Biology** 4ta ed. Médica Panamericana, 2004.

Manual AFM, Chapter 1, Introduction to the AFM System, Pag. 1- 080.

Mao, C., Sun, W., Shen, Z. y, Seeman N.C. **A nanomechanical device based on the B-Z transition of DNA** *Nature* **397**, 1999.

Micro/Nano Tribology pag. 8

Moore, G. E. **Cramming more components onto integrated circuits** Electronics **38**, 1965.

Muller, B. Y Buerdett, S.C. Unusual stability of recombination intermediates made by E. coli RecA protein EMBO Journal 11, 1992.

Niemeyer, C. M., Ceyhan, B. y Hazarika, P. **Oligofunctional DNA-Gold Nanoparticle Conjugates** Angewandte Chemie International Edition 42, 2003.

Ohring, M. **Engineering Materials Science** Academic Press, 1995.

Pesce, A., Rosen, C.G. y Pasby T.L. **Fluorescent spectroscopy** Dekker 1971.

Porath, D., Bezryadin, A., de Vries, S. y Dekker, C. **Direct measurement of electrical transport through DNA molecules** Nature **403**, 2000.

Purcell, E.M. **Electricidad y Magnetismo** @da ed. Reverté, S.A., 2001.

Qun, G., Chuanding, C., Ravikanth, G., Shivashankar, S., Sathish, A., Kun, D. y Donald, H. Nanotechnology **17**, 2006.

Raymond, S. **Acrylamide gel electrophoresis**. Academic of Science **121**, 1964.

Rebek, J. **Synthetic Self-Replicant Molecules** Scientific American **34**, 1994.

Reitz and Milford, 1972.

Rodenhuis, E., Donato Di Paoula. Organic Chemistry, 1999.

Serway, R. **Fundamentos de Física** 4ta ed. Mc Graw Hill, 2004.

Stern, D., Bunker, A., Spinrad, H. y Dey, A., ApJ **73**, 2000

Surface Interface Anal 33. 2002.

Sze, S.M. **Physics of Semiconductor Devices** 2da ed. Wiley Interscience, 1981.

Watson, J. D., and Crick, F. H. C., 1953, Nature, 171, 737. Seeman, C.M., Nano Letters 1, 22 (2001).

Watson, J.D., Witkoswski, M.G. J. y Zoller, M., **Recombinant DNA**

2da ed. New York: Scientific American Books, 1992.

Weber, K. y Osborn M. **The reability of molecular weight determined by dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis en SDS-gel** 1969.

Whitten, K.W. y Gailey, K.D. **Química General** 5ta ed. Mc Graw Hill, 1985

Zwaan, J. **Estimation of moleculars weightsby poliacrilamide gel electrophoresis**
Analytical Biochemistry 1967.