

**Medida da Força Entrópica
de Uma Molécula de DNA**
Rodrigo Teixeira Santos Freire

Medida da Força Entrópica de Uma Molécula de DNA

Rodrigo Teixeira Santos Freire
Orientador: Prof. Oscar Nassif de Mesquita

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais como
requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Física.

Belo Horizonte
Setembro de 2001

Dedicado aos meus pais,
Sirlei e Antônio,
ao Sérgio Lúcio
e à Fernanda.

Agradecimentos

Agradeço

A Deus e Nossa Senhora Rainha da Paz, por tudo...

A meus pais, que sempre estiveram a meu lado, me apoiando e guiando em todos os instantes de minha vida.

A meu irmão, pela amizade e pela orientação em muito do que fiz e faço.

À Fernanda, sempre presente com seu amor, carinho e apoio.

Ao amigo Anderson, pela amizade sempre presente, por toda a ajuda e conversas (sérias e fiadas) ao longo desses anos.

Ao Oscar, por ter me acolhido no Laboratório de Física Estatística Experimental e ter me orientado ao longo de toda a tese.

Aos amigos, companheiros no laboratório, Bira, Nathan, José Coelho, Aline e Costelinha, por toda a ajuda, discussões e pela conversa fiada. Agradeço especialmente ao Nathan, cuja ajuda, orientação e companheirismo foram fundamentais para a realização desse trabalho.

Aos professores e amigos do ICB, especialmente ao Jáder, que sempre me ajudou com boa vontade, paciência e disponibilidade raras. À Lígia, Miguel e César, por toda a ajudaram na preparação e discussão sobre soluções-tampão.

Aos professores, funcionários, colegas e amigos do DF que de alguma forma colaboraram para que esse trabalho acontecesse.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa, à FAPEMIG e ao FINEP-PRONEX, pelo financiamento do laboratório.

Resumo

Neste trabalho estudamos o comportamento elástico entrópico de uma molécula de DNA do bacteriófago λ , aliando as técnicas de pinçamento óptico, videomicroscopia e correlação de fótons. O método experimental permite a manipulação de uma única molécula por vez. A molécula de DNA é ancorada à superfície de uma lamínula de vidro e ligada a uma microesfera de poliestireno de cerca de $3\mu m$ de diâmetro. O pinçamento óptico dessa microesfera permite a manipulação e o estiramento da molécula de DNA. A constante de força da pinça óptica é obtida pela técnica de correlação de fótons. Medindo-se também o deslocamento da microesfera em relação à sua posição de equilíbrio no interior do poço da pinça, é possível determinar a força exercida pelo DNA em função de seu estiramento. Essa força é descrita pelo modelo ‘Worm-Like Chain’ (WLC), que permite a obtenção do *comprimento de persistência* da molécula de DNA.

Abstract

This work combines optical tweezer, videomicroscopy and photon correlation techniques in order to study the entropic elastic behaviour of single λ -fage DNA molecules. A DNA molecule is attached by one end to the surface of a coverslip and by the other to the a $3\mu m$ polystyrene bead. The optical trapping of this bead enables the manipulation and stretching of the DNA molecule. The photon correlation technique is used to measure the trapping force constant. By measuring also the displacement of the bead relative to its equilibrium position in the trapping potential well, it is possible to determine the force DNA exerts as a function of its extension. This force is theoretically described by the Worm-Like Chain (WLC) model and the *persistence length* of the DNA molecule is obtained.

Conteúdo

1	Introdução	1
2	A Estrutura dos Ácidos Nucléicos	3
2.1	A Estrutura Básica dos Ácidos Nucléicos	3
2.2	O Modelo de Watson-Crick	7
3	O DNA como um Polímero	13
3.1	Polímeros	13
3.2	A Origem da Elasticidade Entrópica	15
3.3	O Modelo ‘Worm Like Chain’	17
3.4	A Força Elástica Entrópica no Modelo WLC	21
3.4.1	Estiramentos na Vizinhança do Equilíbrio	22
3.4.2	Estiramentos Muito Além da Posição de equilíbrio	22
3.4.3	Expressão Válida Para Toda a Faixa Entrópica de Estiramentos	24
4	Investigação da Força Entrópica de uma Molécula de DNA	26
4.1	Preparação das Amostras	27
4.1.1	Confecção dos Porta-Amostras	27
4.1.2	Preparação da Solução de DNA	27
4.1.3	Finalização da Amostra	28
4.2	Técnicas Experimentais	30
4.2.1	A Montagem Experimental	30
4.2.2	A Pinça Óptica	30

4.2.3	O Sistema de Videomicroscopia	34
4.2.4	Correlação de Fótons e Movimento Browniano	35
4.3	Os Experimentos	38
4.3.1	Calibração das Medidas de Força	38
4.3.2	Estudo da Força Entrópica da Molécula de DNA	43
4.4	Análise dos Dados Experimentais	45
4.4.1	Obtenção da Constante de Força da Pinça Óptica	45
4.4.2	Análise dos Perfis de Intensidade Retroespalhada	46
4.5	Calibração de Velocidade dos Micromotores	48
4.5.1	Velocidade de Deslocamento do Espelho E1	48
4.5.2	Velocidade de Deslocamento do Porta-Amostras	49
5	Resultados	51
6	Conclusão	55
A	A Função Autocorrelação Angular	58
B	Cálculo de $\langle R^2 \rangle$ na Configuração de Equilíbrio	64

Lista de Figuras

2.1	Estrutura das pentoses dos ácidos nucléicos	4
2.2	Os precursores das bases nitrogenadas	4
2.3	Bases nitrogenadas presentes nos ácidos nucléicos	5
2.4	Desoxirribonucleotídeos de Adenina e Citosina	5
2.5	Fitas simples de DNA e RNA	6
2.6	A Dupla Hélice de DNA - 1	8
2.7	A Dupla Hélice de DNA - 2	9
2.8	Emparelhamento das bases do DNA	10
2.9	Replicação do DNA	11
2.10	Formas mais comuns de DNA dupla-hélice	12
3.1	Tipos de polímeros	14
3.2	Monômeros distintos, polímeros iguais	15
3.3	Elasticidade entrópica de um polímero	16
3.4	Modelo de Kratky-Porod	19
3.5	Comportamento da Força Entrópica para parâmetros típicos.	25
4.1	Amostra preparada	28
4.2	Configuração das microesferas em uma amostra pronta	30
4.3	Esquema da montagem experimental	31
4.4	Princípio do pinçamento óptico	33
4.5	Pinçamento de um sistema microesfera-DNA	34
4.6	Calibração da medida de força: perfil da intensidade retroespalhada.	40

4.7	Calibração da medida de força: autocorrelação da intensidade retroespalhada	41
4.8	Calibração da medida de força: medidas típicas para duas velocidades distintas	41
4.9	Calibração da medida de força: deslocamento relativo da microesfera em função da velocidade.	42
4.10	Comportamento típico da força entrópica em função do estiramento do DNA	47
4.11	Calibração da velocidade de deslocamento do espelho E1	48
4.12	Sinal de tensão obtido sobre o LDR	50
4.13	Medida da velocidade de deslocamento do porta-amostras	50
5.1	Perfil típico de retroespalhamento.	51
5.2	Função típica de autocorrelação.	52
5.3	Perfil típico de estiramento.	52
5.4	Ajuste típico da força entrópica em função do estiramento horizontal.	53
A.1	Sistemas de referência para o cálculo da correlação angular . . .	61

Lista de Tabelas

2.1	Parâmetros das formas A, B e Z de DNA	12
4.1	Composição dos PBSs utilizados na preparação de amostras .	29
5.1	Comprimentos de persistência obtidos para o λ -DNA	53

Capítulo 1

Introdução

Embora a estrutura do DNA tenha sido desvendada há cerca de 50 anos [1] e, desde então, tenha sido extensivamente estudada, alguns aspectos sobre essa molécula ainda não são bem compreendidos. Em especial, seu comportamento elástico tem sido muito estudado nos últimos anos. As características elásticas do DNA são importantes para sua função biológica, pois controlam as modificações estruturais sofridas pela molécula, o que afeta processos como a sua replicação, a transcrição e a tradução da informação genética. O estudo das características elásticas do DNA podem também auxiliar na compreensão dos mecanismos de interação DNA-proteína [2].

Com o desenvolvimento da técnica de pinçamento óptico [3], tornou-se possível a manipulação e o estiramento de uma única molécula de DNA. Dessa forma, vários experimentos têm sido realizados, utilizando diferentes técnicas, para estudar-se as características elásticas da molécula de DNA [4, 5, 6, 7, 8].

Neste trabalho, utilizaremos as técnicas de pinçamento óptico, videomicroscopia e correlação de fótons (espalhamento de luz dinâmico localizado)[9] para o estudo do comportamento elástico de uma única molécula de DNA, eliminando-se, assim, os efeitos das interações intermoleculares e a necessidade de se fazer médias estatísticas para a análise dos resultados. Os resultados experimentais serão analisados modelando-se o DNA como um polímero

flexível, descrito pelo modelo ‘Worm-Like Chain’ (WLC) [6, 10], que nos permitirá determinar o comprimento de persistência da molécula de DNA.

Nosso trabalho inicia-se com uma breve discussão sobre a estrutura dos ácidos nucléicos, em especial o DNA.

No capítulo 3, apresentamos o modelo teórico, fundamentado na física de polímeros, que descreve a força entrópica de uma molécula de DNA.

No capítulo 4, apresentamos as técnicas experimentais utilizadas, a montagem e os procedimentos experimentais e de ajuste dos dados obtidos.

Os resultados e conclusões são apresentados e discutidos nos capítulos 5 e 6.

Capítulo 2

A Estrutura dos Ácidos Nucléicos*

2.1 A Estrutura Básica dos Ácidos Nucléicos

Os ácidos nucleicos - o DNA e o RNA - são longas cadeias poliméricas constituídas de uma seqüência linear de unidades fundamentais denominadas *nucleotídeos*. Estes, por sua vez, são formados por uma *base nitrogenada*, uma *pentose* (um açúcar constituído por 5 carbonos) e um ou mais *radicais fosfato* (PO_4^-).

A pentose é característica do tipo de ácido nucleico, sendo responsável pelo nome dado a cada um deles: encontra-se a *ribose* no ácido *ribonucleico* (RNA) e a *desoxirribose* no ácido *desoxirribonucleico* (DNA). O radical *desoxi* indica a ausência de um átomo de oxigênio presente na ribose (Figura 2.1).

Existem cinco tipos de bases nitrogenadas, duas delas derivadas da purina (as chamadas *bases púricas*) e três derivadas da pirimidina (as *bases pirimídicas*) (Figura 2.2). As bases púricas são a *adenina* e a *guanina*. As bases pirimídicas são a *citossina*, a *timina* e a *uracila* (Figura 2.3).

*Este capítulo foi baseado no livro *Biochemistry*. Para maiores informações veja [11].

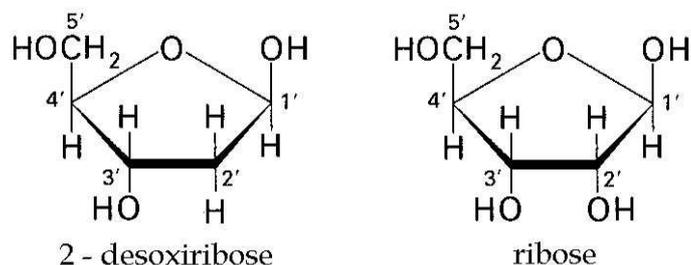


Figura 2.1: Estrutura das pentoses dos ácidos nucleicos

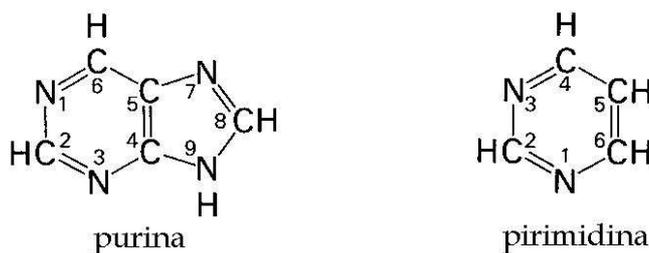


Figura 2.2: Os precursores das bases nitrogenadas

A timina é uma base nitrogenada exclusiva do DNA e a uracila é encontrada apenas em moléculas de RNA. De modo geral, a formação de um nucleotídeo se dá pela ligação do carbono C-1 da pentose ao nitrogênio N-1 do anel pirimídico ou ao nitrogênio N-9 do anel púrico. O grupamento fosfato se liga à molécula através do carbono C-5 da pentose (Figura 2.4).

A cadeia de ácidos nucleicos é formada pela polimerização de um grande número de nucleotídeos.[†] Nesse processo, a extremidade 3'-hidroxila da pentose de um nucleotídeo é conectada à extremidade 5'-hidroxila da pentose de outro nucleotídeo adjacente por uma ponte de fosfodiéster. Essa ligação química é denominada *ligação glicosídica*. O crescimento da cadeia se dá, portanto, a partir da extremidade 5' em direção à extremidade 3'. Assim, forma-se o 'esqueleto' (ou 'backbone') da cadeia nucleotídica, composta pelos fosfatos e pentoses. É importante dizer que a parte variável dos ácidos nucleicos é a seqüência dos quatro tipos de bases nitrogenadas. É nela que se expressa

[†]Essa polimerização é catalisada por uma classe de enzimas denominadas polimerases.

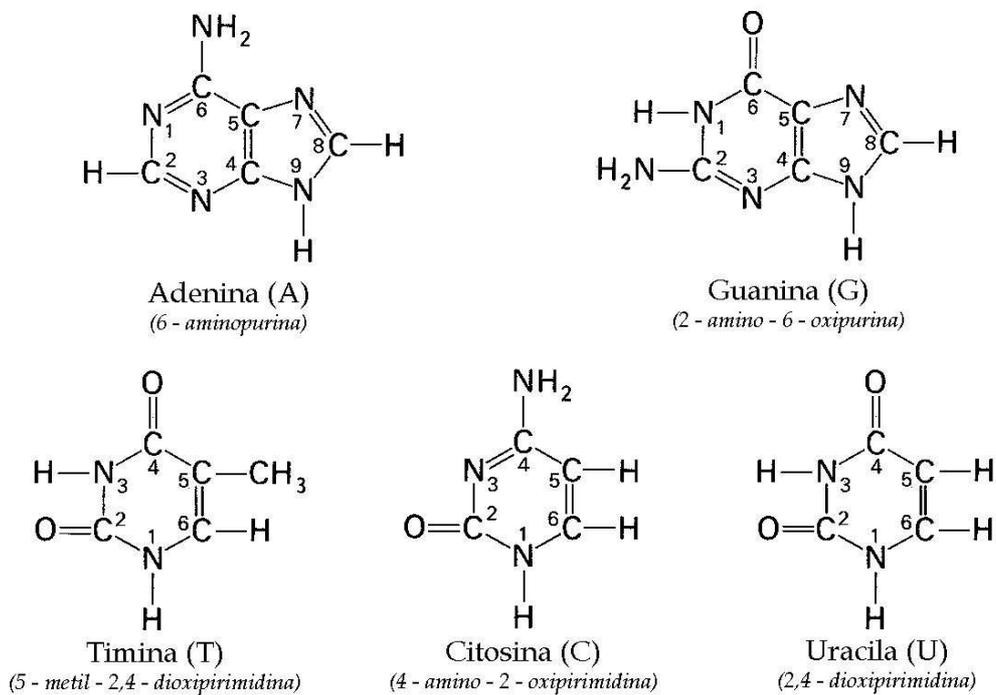


Figura 2.3: Bases nitrogenadas presentes nos ácidos nucleicos

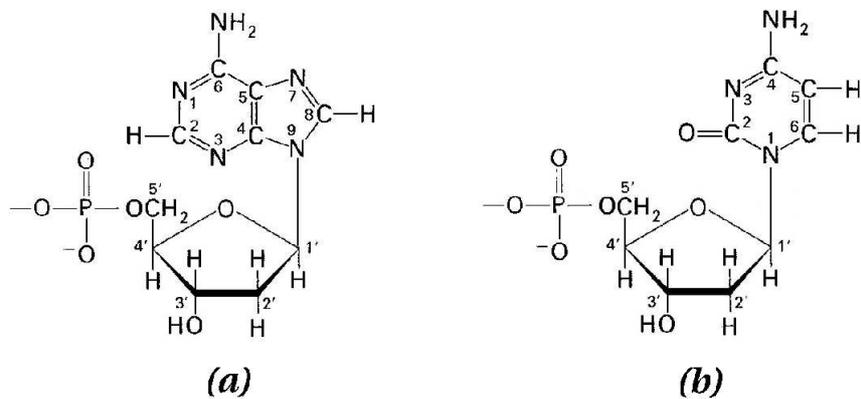


Figura 2.4: Desoxiribonucleotídeos de Adenina (a) e Citosina (b)

toda a gama de informações depositada no código genético (Figura 2.5).

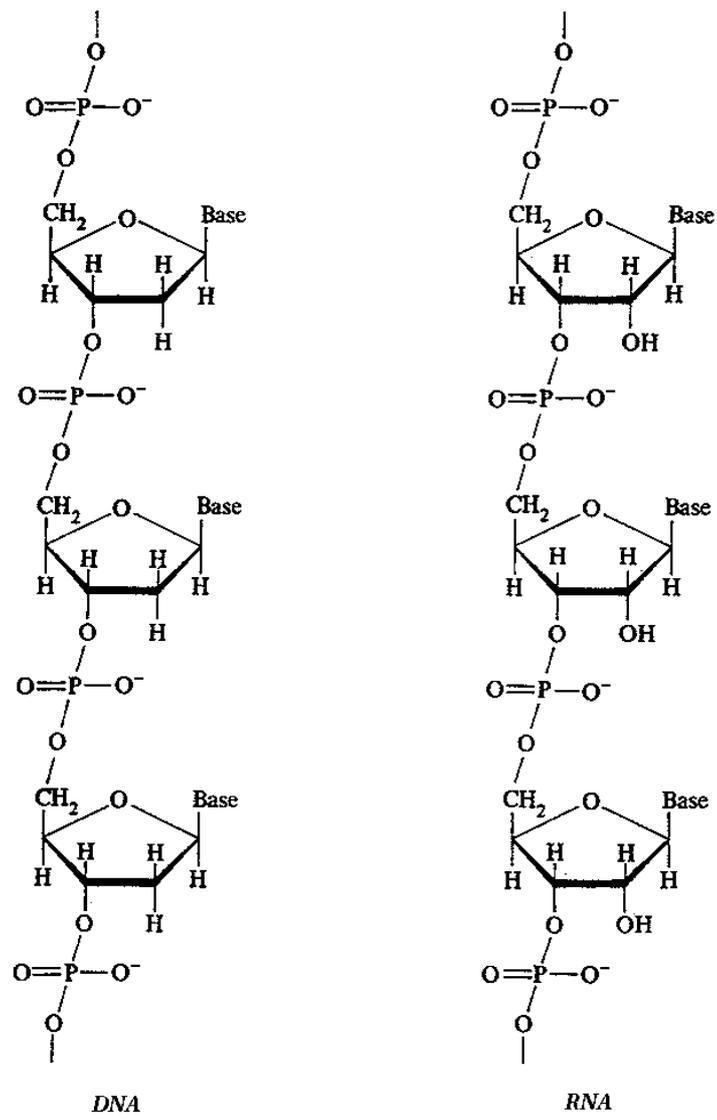


Figura 2.5: Fitas simples de DNA e RNA

2.2 O Modelo de Watson-Crick

Tendo já descrito a estrutura básica dos ácidos nucléicos em geral, passemos agora à descrição mais detalhada da estrutura do DNA em especial, nosso objeto de estudo.

Em 1953, o biólogo James D. Watson e o físico Francis Crick desvendaram a estrutura tridimensional do DNA [1]. A análise dos padrões de difração de raios-x obtidos por Rosalind Franklin e E. Goslin [12] em amostras de fibras de DNA, além de outras evidências experimentais, os levou a propor uma estrutura em dupla fita para o DNA com as seguintes características fundamentais:

- Duas cadeias nucleotídicas helicoidais dispostas ao longo de um eixo comum. As cadeias correm em sentidos opostos (ou seja, partindo de uma das extremidades dessa cadeia, observa-se que uma cresce no sentido $3' \rightarrow 5'$ e, a outra, no sentido $5' \rightarrow 3'$) (Figura 2.6);
- As bases nitrogenadas estão na parte interior da dupla hélice, enquanto que as desoxirriboses e os fosfatos ficam na parte externa. O plano das bases é perpendicular ao eixo da hélice. O plano dos açúcares é aproximadamente perpendicular ao plano das bases (Figura 2.7);
- O diâmetro da hélice é de 20 \AA . As bases adjacentes são separadas por uma distância de 3.4 \AA ao longo do eixo da hélice e relacionadas por uma rotação de 36° . Portanto, a estrutura helicoidal se repete após um período de 10 bases, ou seja, a intervalos de 34 \AA ;
- As duas cadeias são mantidas ligadas por pontes de hidrogênio entre pares de bases. A adenina parecia-se sempre com a timina e, a citosina, sempre com a guanina (Figura 2.8)
- Não há qualquer restrição à seqüência de bases ao longo de *uma* das fitas. É a seqüência de bases que carrega toda a informação genética.

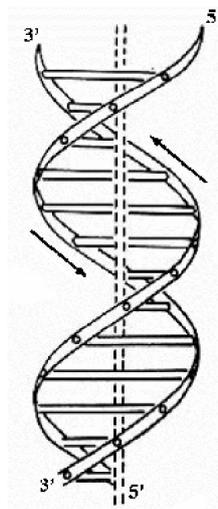


Figura 2.6: Dupla Hélice de DNA. As fitas correm em sentidos opostos.

A pista fundamental para que Watson e Crick postulassem o esquema de pareamento de bases proposto veio dos trabalhos de Erwin Chargaff [13], que observou que a razão entre bases púricas e pirimídicas, para todas as espécies estudadas, era próxima de 1 e, mais ainda, que as razões adenina/timina e citosina/guanina eram também próximas da unidade. *O pareamento específico entre bases é sem dúvida a característica mais importante do modelo da dupla-hélice.* Há também razões estereoquímicas para que o pareamento seja da forma descrita. Uma delas se relaciona à regularidade do esqueleto pentose-fosfato de cada cadeia nucleotídica. As ligações glicosídicas conectadas a um par de bases ligadas estão sempre a uma distância de 10.85 Å. Um par base púrica-base pirimídica se encaixa perfeitamente nesse espaço. Em contrapartida, não há espaço suficiente para duas bases púricas. Há espaço de sobra para duas bases pirimídicas; elas, porém, estariam muito distantes entre si para a formação de pontes de hidrogênio. O pareamento de bases é também regido por requisitos necessários para a formação das pontes de hidrogênio. Os átomos de hidrogênio apresentam posições bem definidas nas bases nitrogenadas. A adenina não pode parear-se com a citosina porque haveria dois hidrogênios próximos a um dos sítios de ligação e nenhum próximo ao outro.

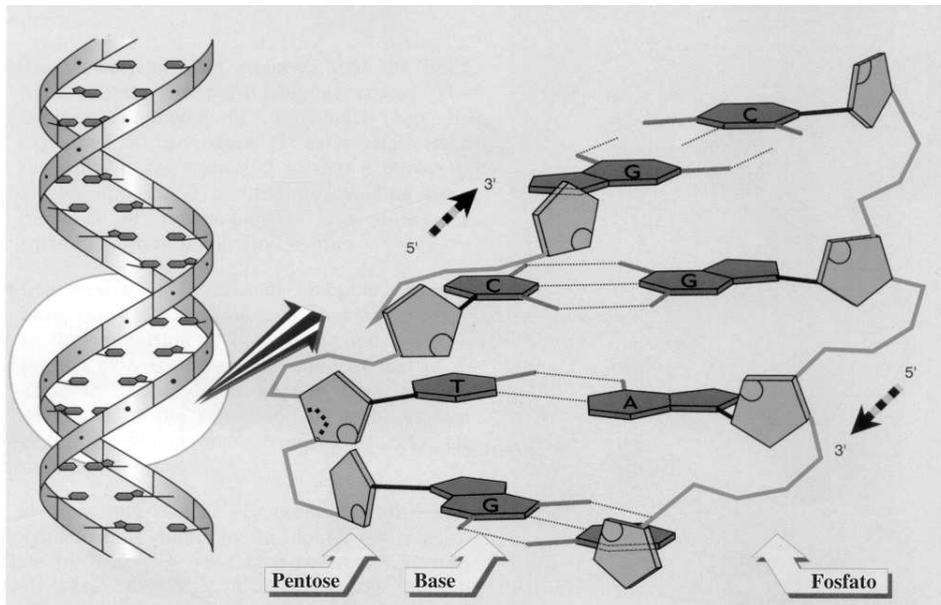


Figura 2.7: Dupla Hélice de DNA. Observe a perpendicularidade entre os planos do anel da pentose e da base nitrogenada. (Modificada de *Genes VI* [14])

Pelo mesmo motivo, a guanina não pode parear-se com a timina. Por outro lado, a adenina para-se bem com a timina, com a formação de duas pontes de hidrogênio, e a citosina forma três pontes de hidrogênio com a guanina (Figura 2.8).

O modelo de dupla-hélice sugere imediatamente um engenhoso mecanismo para a replicação do DNA. Watson e Crick [15] publicaram sua hipótese apenas um mês depois de haverem publicado sobre seu modelo. Posteriormente, provou-se que os fundamentos propostos por eles estavam corretos. A característica essencial para a replicação é o pareamento das bases. Sabendo-se a seqüência de bases de uma das fitas, pode-se, graças ao pareamento específico, conhecer exatamente a seqüência da outra fita. Dessa forma, o que ocorre, em linhas gerais, no processo de replicação é a separação prévia das fitas (quebra das pontes de hidrogênio) e cada uma delas funciona como um molde para a síntese de uma nova cadeia complementar. Esse processo é

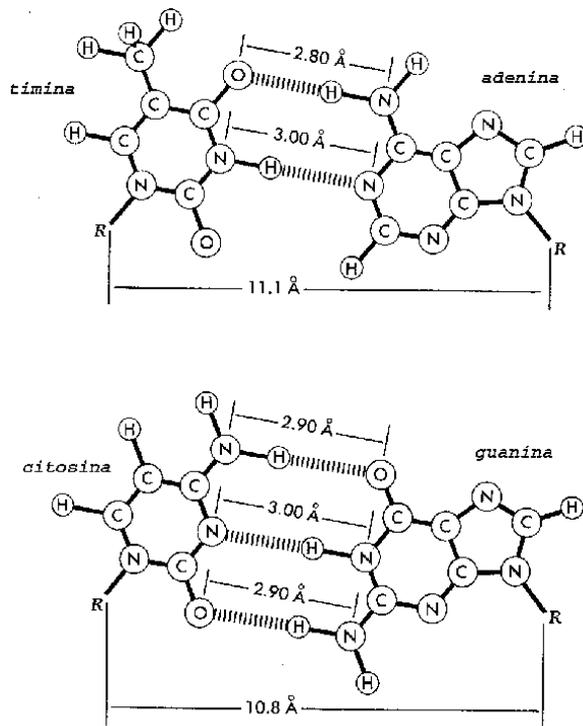


Figura 2.8: Emparelhamento das bases do DNA

catalizado por enzimas denominadas *polimerases*, que vão incluindo novos nucleotídeos que se pareiam especificamente com os do molde, formando-se a nova fita complementar. A replicação é chamada de *semiconservativa*, já que cada dupla-fita é constituída por uma fita do DNA que a originou (o molde) e uma nova fita recém-sintetizada (Figura 2.9)

A estrutura discutida refere-se ao chamado B-DNA, que é a forma mais comumente encontrada nos organismos vivos. Sabe-se, porém, que existem também outras conformações. O DNA tipo A é uma forma mais compacta, que ocorre em meios onde a humidade relativa cai a menos de cerca de 75%. O Z-DNA é uma dupla hélice que gira em sentido contrário e cujos grupos fosfato descrevem um movimento de ‘zig-zag’ ao longo da cadeia (daí o nome Z-DNA) (Figura 2.10). Uma característica também importante da estrutura do DNA é a presença de dois tipos de reentrâncias, denomi-

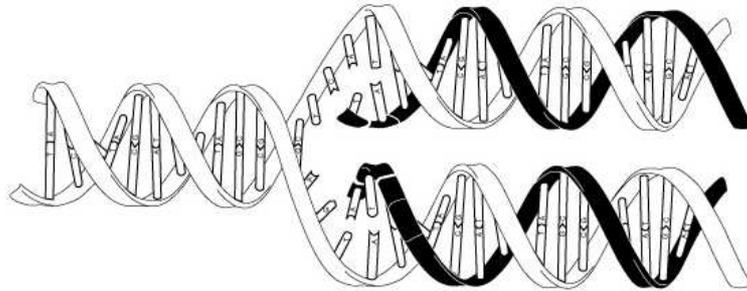


Figura 2.9: Replicação do DNA: A dupla hélice original (em branco) se separa. Uma nova fitas simples (em preto) começa a se formar a partir de cada fita simples original. No fim do processo, teremos duas novas duplas hélices idênticas.

nadas ranhuras (ou sulcos). Distinguem-se, especialmente no B-DNA, dois tipos de ranhuras - a ranhura menor e a ranhura maior. A assimetria na profundidade e dimensão desses sulcos ocorre porque as ligações glicosídicas de um par de bases não se encontram diametralmente opostas uma à outra. O acesso à informação genética e a interação DNA proteínas se dá através dessas ranhuras, especialmente a ranhura maior. A tabela 2.1 apresenta as características mais importantes dos três tipos de DNA.

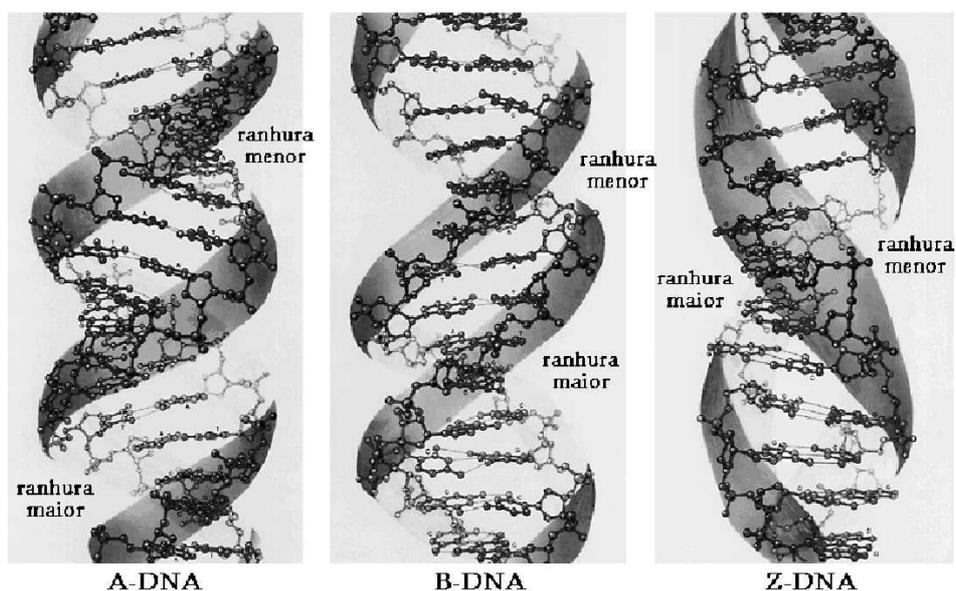


Figura 2.10: Formas mais comuns de DNA dupla-hélice

Forma	A-DNA	B-DNA	Z-DNA
Distância entre os pares de bases (pb)	2.3Å	3.32Å	3.8Å
Diâmetro da hélice	25.5Å	23.7Å	18.4Å
Sentido de rotação	horário	horário	anti-horário
Nº de pb por volta	~ 11	~ 10	12
Passo da hélice	24.6Å	33.2Å	45.6Å
Ângulo da normal ao plano do pb em relação ao eixo da hélice	19°	1.2°	9°
Ranhura maior	muito estreita e muito profunda	larga e medianamente profunda	chata
Ranhura menor	muito larga, rasa	estreita e medianamente profunda	muito estreita e muito profunda

Tabela 2.1: Parâmetros das formas A, B e Z de DNA. (Adaptada de [16])

Capítulo 3

O DNA como um Polímero

3.1 Polímeros

As macromoléculas ou polímeros ocupam lugar de destaque na tecnologia de materiais e também na Biologia. Substâncias como os plásticos em geral, a goma de mascar e a clara de ovo são exemplos de polímeros.

Os polímeros são moléculas longas compostas de uma grande quantidade de unidades básicas chamadas de *monômeros*. São formados quando as condições necessárias à adição de mais um monômero à cadeia polimérica são praticamente independentes do tamanho da mesma. Se partirmos, por exemplo, de um único monômero (A) e desejarmos sintetizar o composto (A)-(A), as condições para que a síntese ocorra podem ser bem distintas das necessárias para a produção do composto (A)-(A)-(A) a partir de (A)-(A). Entretanto se partirmos de um composto (A)-(A)-(A)-...(A) (suponhamos $(A)_n$) e se as condições necessárias para a síntese $(A)_n \rightarrow (A)_{n+1}$ forem praticamente as mesmas para a síntese $(A)_{n+1} \rightarrow (A)_{n+2}$, o processo poderá continuar, com a formação, a princípio, de uma cadeia indefinidamente longa. Formam-se então, os polímeros. A flexibilidade dessas moléculas pode variar, havendo polímeros muito rígidos (como o kevlar, empregado em coletes à prova de bala) e outros altamente flexíveis (por exemplo, o polietileno de baixa densidade para a confecção de sacos plásticos) (Figura 3.1). Estes

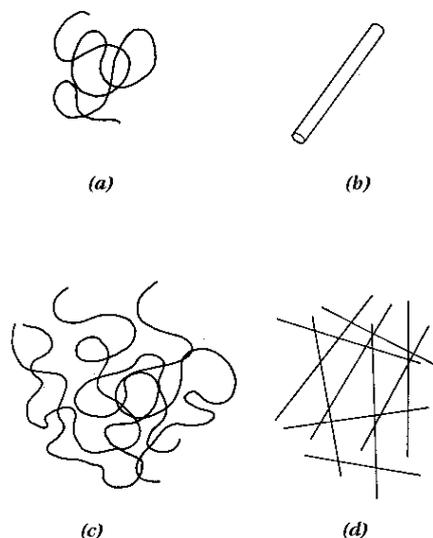


Figura 3.1: Tipos de polímeros: (a) flexível, (b) rígido; (c) e (d) suas respectivas soluções concentradas.

são casos extremos, havendo uma grande variedade de polímeros de flexibilidade intermediária.

Muito embora a análise dessas estruturas pareça difícil, essa tarefa pode ser razoavelmente simplificada devido ao fato de as moléculas serem muito grandes. Isto faz com que seu comportamento macroscópico seja governado pelas características de larga escala da molécula. Por exemplo, suponhamos duas soluções (a) e (b) de monômeros livres (não polimerizados). Uma delas contém monômeros circulares, enquanto, a outra, monômeros triangulares (Figura 3.2). Nessas soluções, a forma dos segmentos é uma característica importante: a viscosidade de (a) difere da viscosidade de (b). Entretanto, se os monômeros forem conectados para constituírem duas grandes moléculas, de mesmo tamanho, a diferença entre (a) e (b) não será importante. De fato, a viscosidade é determinada principalmente pelo tamanho da molécula, sendo praticamente independente da forma dos segmentos constituintes. A diferença de viscosidade entre as soluções (a) e (b) é da ordem de $\frac{1}{\sqrt{N}}$, sendo N o número de segmentos do polímero [17].

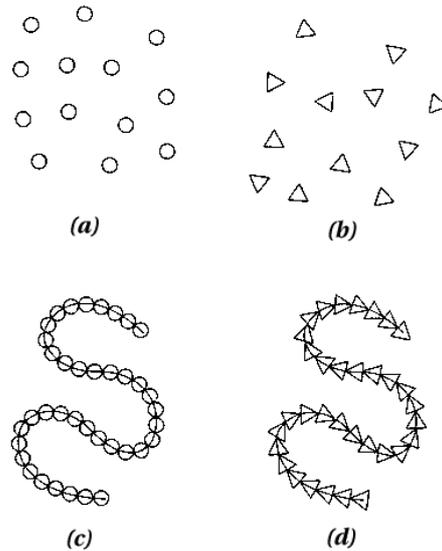


Figura 3.2: Soluções de (a) monômeros circulares e (b) triangulares . (c) e (d) Polímeros compostos pelos tipos de monômeros apresentados.

Como já foi dito no capítulo 2, o DNA é formado por uma longa seqüência de unidades que se repetem - os nucleotídeos (ou mesmo os pares de nucleotídeos, se considerarmos uma dupla hélice). Sendo assim, o DNA é também um polímero. Como o tipo de unidade monomérica tem pouca influência sobre o comportamento macroscópico do polímero, podemos empregar as mesmas ferramentas teóricas da dinâmica de polímeros para estudarmos a molécula de DNA.

3.2 A Origem da Elasticidade Entrópica

Consideremos um polímero, flexível, de comprimento definido (usualmente chamado de comprimento de contorno), como no caso de uma molécula de DNA e que possua inicialmente forma retilínea. Uma vez em solução, essa molécula vai dobrar-se sobre si mesma até atingir um estado de equilíbrio termodinâmico com o meio em que se encontra. Isto ocorre devido às colisões das partículas do meio com a molécula ao longo de toda a sua extensão.

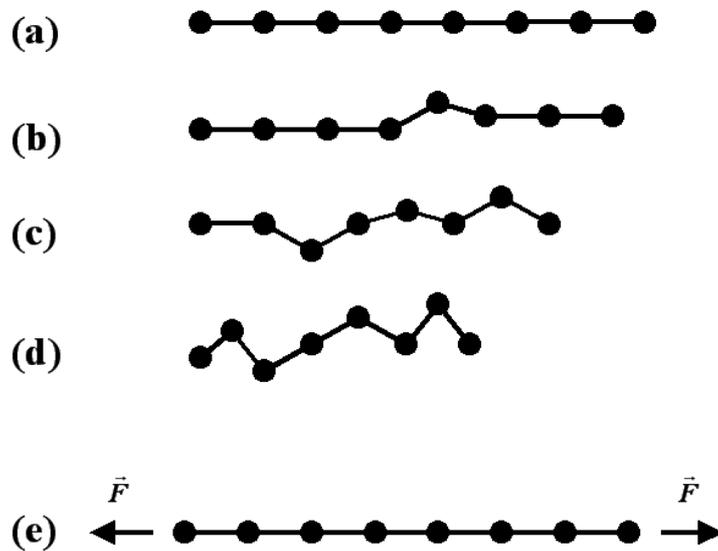


Figura 3.3: Elasticidade entrópica de um polímero: (a) Molécula em sua forma inicial retilínea. (b) e (c) Molécula acomodando-se devido aos choques com as partículas do meio. (d) Molécula em uma conformação de equilíbrio. (e) *Elasticidade entrópica*: para manter a molécula estirada, é necessária a aplicação de uma força \vec{F} a suas extremidades.

Graças à flexibilidade do polímero, flutuações na intensidade dos choques sofridos em uma dada direção fazem com que a parte da molécula atingida se mova, abandonando a configuração retilínea inicial e expandindo-se em todas as direções possíveis. Como o comprimento da molécula é fixo, a movimentação dos segmentos faz com que suas extremidades se aproximem uma da outra. Esse processo continua até que a molécula atinja uma conformação em que os choques não sejam mais capazes de alterar a posição média de suas extremidades, o que caracteriza o estado de equilíbrio. Somente a aplicação de uma força externa \vec{F} será então capaz de afastar novamente as extremidades da molécula, compensando o efeito dos choques com as partículas do meio (Figura 3.3).

O efeito dos choques depende não só das características do meio mas, de uma maneira especial, da elasticidade do polímero em solução. Sendo

assim, já que o que nos interessa são as características do polímero em si, podemos embutir o efeito dos choques na própria molécula, atribuindo a ela uma *elasticidade entrópica*, cuja função é de manter a molécula em uma de suas conformações de equilíbrio. Essa força atuará sempre que a distância entre as extremidades do polímero for maior que a distância média permitida ao conjunto de configurações de equilíbrio.

A origem entrópica do comportamento elástico do polímero fica mais clara ao analisarmos sua entropia. Esta é dada por

$$S = k_B \ln \Omega, \quad (3.1)$$

onde Ω é o número de configurações possíveis para a molécula.

Quando a distância entre as extremidades da molécula é igual ao seu comprimento de contorno, ou seja, quando a molécula está completamente estirada, só há uma única configuração possível: todos os segmentos orientados ao longo de uma mesma linha reta. Nesse caso, $\Omega = 1$ e, portanto, $S = 0$. Por outro lado, quando a distância entre as extremidades da molécula é menor que seu comprimento de contorno, os segmentos constituintes da cadeias polimérica podem rearranjar-se em um número de configurações compatíveis com aquela distância entre as extremidades. O número Ω de configurações (e, portanto, a entropia) será tanto maior quanto menor for a distância entre os extremos da molécula. Pelo princípio da entropia máxima, o estado de equilíbrio é aquele que maximiza a entropia de um dado sistema. Assim, para atingir o estado de equilíbrio, a molécula tenderá a maximizar o número de configurações possíveis, aproximando suas extremidades.

3.3 O Modelo ‘Worm Like Chain’

Como modelo para a molécula de DNA, será utilizado o modelo WLC [6, 10], capaz de descrever satisfatoriamente o comportamento elástico da molécula de DNA no regime entrópico tanto para estiramentos pequenos, próximos ao

estado de equilíbrio, quanto para grandes estiramentos, próximos à configuração retilínea, bem além do equilíbrio.

O WLC é, na verdade, o limite contínuo do modelo de Kratky-Porod [6]. Sendo assim, comecemos por descrevê-lo. O modelo de Kratky-Porod descreve uma cadeia polimérica que não sofre forças de torção.* A cadeia polimérica é representada por uma sucessão de segmentos de comprimento b e vetor de orientação \hat{t}_i (Figura 3.4). A energia \mathcal{E}_{KP} de uma dada configuração é a soma das energias de curvatura dos sucessivos segmentos (aqui numerados de 0 a N):

$$\mathcal{E}_{KP} = -\frac{B}{b} \sum_{i=1}^N \hat{t}_i \cdot \hat{t}_{i-1} = -\frac{B}{b} \sum_{i=1}^N \cos \theta_i, \quad (3.2)$$

onde θ é o ângulo entre vetores de orientação sucessivos e B é o módulo de curvatura da cadeia.

A correlação entre os vetores de orientação, que denominaremos correlação angular, decai exponencialmente com a distância ao longo da cadeia (veja o apêndice A):

$$\langle \hat{t}_i \cdot \hat{t}_j \rangle = e^{-b|i-j|/A}, \quad (3.3)$$

onde $A = B/k_B T$ é o chamado *comprimento de persistência*.

Ele pode ser interpretado como o comprimento de correlação da cadeia polimérica, isto é, uma medida do alcance de perturbações locais na cadeia. Dessa forma, no caso de A ser muito menor que o comprimento L de contorno da cadeia polimérica, uma pequena alteração na posição de um ou de um pequeno grupo de monômeros (perturbação local) causará um efeito de curto alcance na cadeia, perturbando a posição apenas dos monômeros localizados dentro de um raio de alcance $A \ll L$. Assim, trechos da molécula poderão mover-se uns em relação aos outros com relativa facilidade, o que caracteriza um polímero flexível. Se, por outro lado, $A \gg L$, então o efeito de

*Esta é uma simplificação aceitável em nosso caso, já que trabalhamos apenas com o estiramento da molécula de DNA, sem submetê-la a torções.

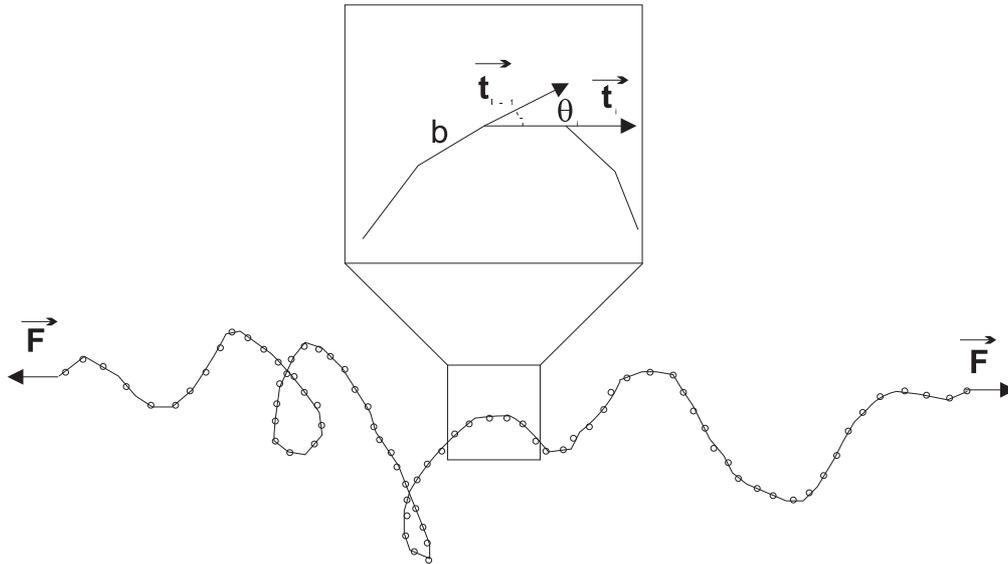


Figura 3.4: Modelo de Kratky-Porod: Um polímero pode ser modelado por uma cadeia de segmentos de comprimento b e vetor de orientação \hat{t}_i , que podem girar livremente. A direção da força \vec{F} de estiramento da molécula define a direção z .

uma perturbação local se fará sentir por todos os monômeros da cadeia, que tenderão a manter suas posições relativas inalteradas, o que caracteriza um polímero rígido. De acordo com esse mesmo raciocínio, dados dois polímeros de comprimento L , será mais rígido o que tiver um maior comprimento A de persistência. Portanto, o comprimento de persistência pode ser também considerado um indicador do grau de flexibilidade (ou rigidez) de um polímero. Uma outra definição mais intuitiva é de que o comprimento de persistência é o comprimento característico onde uma dobra pode ser feita na molécula.

A distância quadrática média entre os extremos da molécula polimérica na configuração de equilíbrio pode ser calculada a partir da função de auto-correlação angular 3.3, nos limites flexível e rígido (Apêndice B):

- Limite flexível ($A \ll L$)

$$\langle R^2 \rangle \approx 2AL. \quad (3.4)$$

- Limite rígido ($A \gg L$)

$$\langle R^2 \rangle \approx L^2. \quad (3.5)$$

Há ainda um ingrediente importante a ser acrescentado ao modelo de Kratky-Porod para que ele descreva o comportamento de um polímero sob tensão: o trabalho realizado pela força entálpica sobre a cadeia polimérica ao longo do eixo z :

$$W = -Fz = -Fb \sum_{i=0}^N \cos \Theta_i, \quad (3.6)$$

onde Θ_i é o ângulo entre o vetor \hat{t}_i e o eixo z .

Dessa forma, o modelo de Kratky-Porod que descreve uma cadeia polimérica sob tensão é:

$$\mathcal{E}_{KP} = -\frac{B}{b} \sum_{i=1}^N \cos \theta_i - Fb \sum_{i=0}^N \cos \Theta_i. \quad (3.7)$$

Uma descrição mais precisa da molécula polimérica é obtida pelo modelo WLC. O modelo WLC é o limite contínuo do modelo de Kratky-Porod:

$$\mathcal{E}_{WLC} = \frac{k_B T}{2} \int_0^L A \left| \frac{d\hat{t}}{ds} \right|^2 ds - Fz, \quad (3.8)$$

Nesse caso, a molécula polimérica, de comprimento L , passa a ser descrita por uma curva $R(s)$, com $0 \leq s \leq L$. $\hat{t}(s)$ é definido agora como o vetor unitário tangente à curva $R(s)$:

$$\hat{t}(s) = \frac{dR}{ds}(s). \quad (3.9)$$

3.4 A Força Elástica Entrópica no Modelo WLC

A força entrópica que tende a aproximar as extremidades do polímero pode, de modo geral, ser calculada a partir da energia livre do sistema

$$\mathcal{F} = -k_B T \ln Z, \quad (3.10)$$

onde Z é a função partição da energia da molécula.

Esse cálculo apresenta solução explícita exata para casos mais simples, como para o modelo FJC ([8], apêndice A). Entretanto, esse problema para o modelo WLC possui apenas solução numérica. É possível, por outro lado, construir uma solução aproximada, com base no valor quadrático médio da distância entre as extremidades da molécula na conformação de equilíbrio e em aproximações para a expressão da energia do modelo WLC. Essa solução é construída em duas etapas: a primeira é realizada para pequenos estiramentos, na vizinhança da posição de equilíbrio ($z \approx \sqrt{\langle R^2 \rangle}$); a segunda, é feita para grandes estiramentos, muito além do equilíbrio ($z \approx L$). As soluções parciais, obtidas separadamente em cada etapa, podem, então, ser combinadas para a obtenção de uma solução única, válida com boa precisão em toda a faixa de estiramentos na região entrópica. Esta será a expressão que aplicaremos ao ajuste dos dados experimentais.

3.4.1 Estiramentos na Vizinhança da Configuração de Equilíbrio

Para pequenos estiramentos, na vizinhança do equilíbrio, a força entrópica pode ser aproximada pela Lei de Hooke,

$$F = -kz, \quad (3.11)$$

onde a constante k de força pode ser encontrada a partir da equipartição da energia na configuração de equilíbrio:

$$\frac{1}{2}k \langle R^2 \rangle = \frac{3}{2}k_B T. \quad (3.12)$$

A partir das equações 3.4 e 3.12, temos que:

$$k = \frac{3k_B T}{2AL} \quad (3.13)$$

A força de recuo para pequenos estiramentos na vizinhança da configuração de equilíbrio será então:

$$F = -\frac{3k_B T}{2A} \frac{z}{L} \quad (3.14)$$

3.4.2 Estiramentos Muito Além da Posição de equilíbrio

Para grandes estiramentos, não é mais válida a aproximação da lei de Hooke. Nessa situação a estimativa da força entrópica baseia-se na equação 3.8. Quando grandes forças são aplicadas à cadeia polimérica, a distância entre extremos da cadeia se aproxima do seu comprimento de contorno L . Nesse caso, o vetor tangente \hat{t} flutua levemente em torno do eixo z . Assim, a componente \vec{t}_z de \hat{t} , paralela à direção de estiramento, além de ser bem maior que as demais, se mantém praticamente constante. As demais componentes de \hat{t} , \vec{t}_x e \vec{t}_y , variam livremente dentro dos limites impostos pelo vínculo $\hat{t} = \vec{t}_x + \vec{t}_y + \vec{t}_z$. Como $|\hat{t}|^2 = |\vec{t}_x|^2 + |\vec{t}_y|^2 + |\vec{t}_z|^2 = |\vec{t}_\perp|^2 + |\vec{t}_z|^2 = 1$, podemos escrever $|\vec{t}_z|^2 = 1 - |\vec{t}_\perp|^2$. Uma vez que $|\vec{t}_\perp| \ll 1$, é válida a aproximação

$$|\vec{t}_z| = 1 - \frac{|\vec{t}_\perp|^2}{2} + \mathcal{O}(|\vec{t}_\perp|^4). \quad (3.15)$$

Como o vetor tangente \hat{t} flutua levemente em torno da direção z , podemos escrever que $d\vec{t}_z/ds \approx 0$. Isto implica que $d\hat{t}/ds \approx d\vec{t}_\perp/ds$. Escrevendo ainda $z = \int_0^L |\vec{t}_z| ds$, podemos então reescrever 3.8:

$$\mathcal{E}_{WLC} = \frac{k_B T}{2} \int_0^L \left[A \left| \frac{d\vec{t}_\perp}{ds} \right|^2 + \frac{F}{k_B T} |\vec{t}_\perp|^2 \right] ds - FL. \quad (3.16)$$

A transformada de Fourier $\tilde{t}_\perp(q) = \int \vec{t}_\perp(s) e^{iqs} ds$ desacopla a energia em modos normais

$$\mathcal{E}_{WLC} = \frac{k_B T}{2} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{dq}{2\pi} \left[Aq^2 + \frac{F}{k_B T} \right] |\tilde{t}_\perp|^2 - FL \quad (3.17)$$

O valor médio de $|\vec{t}_\perp|^2$, calculado a partir de 3.17 ([8], apêndice C), é

$$\begin{aligned} \langle |\vec{t}_\perp|^2 \rangle &= \int_{-\infty}^{\infty} \frac{dq}{2\pi} \langle |\tilde{t}_\perp(q)|^2 \rangle = 2 \int_{-\infty}^{\infty} \frac{dq}{2\pi} \frac{1}{(Aq^2 + F/k_B T)}. \\ \langle |\vec{t}_\perp|^2 \rangle &= \sqrt{\frac{K_B T}{FA}}. \end{aligned} \quad (3.18)$$

Para o regime de grandes estiramentos, podemos escrever, a partir de 3.15

$$z = \langle R \rangle = \int_0^L \langle |\vec{t}_z| \rangle ds = L - \int_0^L \langle |\vec{t}_\perp|^2 \rangle ds. \quad (3.19)$$

Vale, então, que

$$\frac{z}{L} = 1 - \frac{1}{2} \sqrt{\frac{K_B T}{AF}}. \quad (3.20)$$

Donde obtemos facilmente

$$F = \frac{k_B T}{A} \left[\frac{1}{4} \frac{1}{(1 - \frac{z}{L})^2} \right]. \quad (3.21)$$

3.4.3 Expressão Válida Para Toda a Faixa Entrópica de Estiramentos

Para construirmos uma expressão válida para a força entrópica tanto para pequenos quanto para grandes estiramentos, partamos de 3.21, válida para grandes estiramentos. No regime de pequenos estiramentos, o comportamento de 3.21 pode ser aproximado por sua expansão em série até primeira ordem

$$F = \frac{k_B T}{A} \left[\frac{1}{4} + \frac{z}{2L} \right]. \quad (3.22)$$

Esperamos que 3.22 tenha exatamente a forma da expressão 3.14, válida para pequenos estiramentos. Para que isto aconteça acrescentemos a 3.22 duas pequenas correções desprezíveis no limite de grandes estiramentos ($z \sim L$). Obtemos, assim, uma fórmula aproximada, vale para toda a faixa entrópica de estiramentos [5, 6, 10]

$$F = \frac{k_B T}{A} \left[\frac{z}{L} + \frac{1}{4(1 - \frac{z}{L})^2} - \frac{1}{4} \right]. \quad (3.23)$$

O comportamento da força entrópica está ilustrado no gráfico a seguir (Figura 3.5), para valores típicos do comprimento de persistência e do comprimento de contorno do DNA que estudamos.

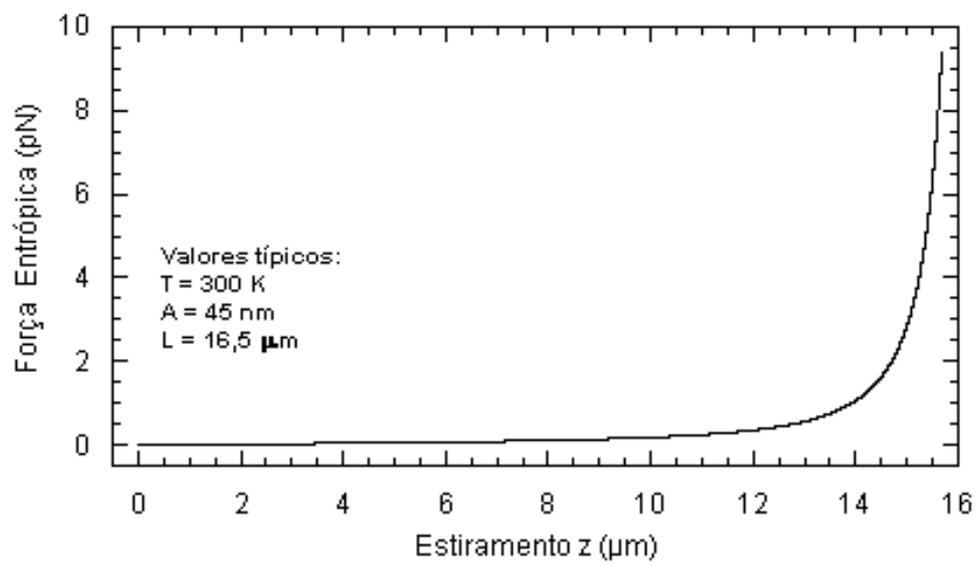


Figura 3.5: Comportamento da Força Entrópica para parâmetros típicos.

Capítulo 4

Investigação da Força Entrópica de uma Molécula de DNA

Para investigar-se o comportamento elástico de uma molécula de DNA, é necessário um sistema capaz de localizar e manipular essa molécula, aplicando sobre ela a força necessária para estirá-la. Além disto, o sistema deve ser capaz de medir, direta ou indiretamente, a força entrópica exercida pela molécula estirada.

Devido a seu pequeno diâmetro (cerca de 20\AA), não é possível a visualização de moléculas isoladas de DNA ao microscópio óptico.* Assim para que possam ser localizadas e manipuladas, emprega-se um procedimento de preparação de amostras em que as moléculas de DNA são conectadas à superfície de microesferas de poliestireno de cerca de $2,8\ \mu\text{m}$ de diâmetro, facilmente observáveis ao microscópio óptico. O processo também oferece condições para que ligações ocorram entre as moléculas de DNA e a superfície de vidro da lamínula do porta-amostras. A ocorrência desse fenômeno é atribuída ao pH baixo, que propicia a adsorção do DNA ao poliestireno e ao vidro. Em um pH de $5,5\pm 0,2$, a adsorção às superfícies se dá preferencialmente pelas extremidades [6, 19]. Maiores detalhes são discutidos em [19].

*Em condições especiais, utilizando-se sondas fluorescentes e um microscópio óptico equipado com aparato de fluorescência, é possível a detecção de moléculas de DNA.

Para os experimentos, serão selecionadas moléculas de DNA que apresentem uma de suas extremidades ligada a uma microesfera e a outra adsorvida à superfície do vidro. Esse arranjo possibilita tanto a localização quanto o estiramento de moléculas de DNA isoladas. Isto é feito por meio da manipulação das microesferas, utilizando-se a técnica de pinçamento óptico [3]. Os princípios de funcionamento e o modo de utilização da pinça óptica serão descritos posteriormente.

4.1 Preparação das Amostras

4.1.1 Confecção dos Porta-Amostras

O primeiro passo na confecção dos porta-amostras é a limpeza das lamínulas de vidro.[†] Lamínulas novas, limpas com um fluxo de ar, são lavadas em tolueno P.A., em banho ultra-sônico por 30min. São posteriormente secas em estufa a 100°C e nela mantidas até o momento do uso, quando recebem cada uma um anel de borracha, previamente limpo com acetona P.A. em banho ultra-sônico[‡] e seco em estufa a 100°C por cerca de 20min. Para a fixação do anel de borracha à superfície da lamínula, banha-se cuidadosamente a face inferior do anel em parafina derretida, imediatamente antes de sua colocação sobre a lamínula. Finalmente, cada lamínula é aquecida em placa quente por alguns segundos para que a parafina se distribua uniformemente na interface vidro-anel, proporcionando aderência e vedação adequadas.

4.1.2 Preparação da Solução de DNA

A próxima fase é a preparação da solução do porta-amostras. Em um microtubo limpo, são adicionados 136 μ l de PBS ('Phosphate Buffer Saline')[§] pH 5,5. A seguir, são adicionados 180 μ l de uma solução previamente prepara-

[†]Lamínulas Corning de $\approx 0,15\mu$ m de espessura cat. #2935-246.

[‡]São feitas duas lavagens de 15 min.

[§]A composição dos PBSs utilizados na preparação de amostras é dada na tabela 4.1

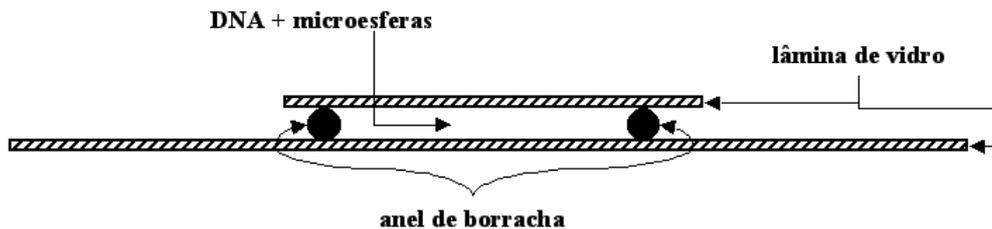


Figura 4.1: Corte transversal de uma amostra preparada.

da contendo $1\mu\text{l}$ de solução estoque de microesferas de poliestireno[¶] diluídos em $1,4\text{ml}$ de PBS pH 5,5. O microtubo é então suavemente agitado para homogeneização da solução. A seguir, são adicionados a essa solução $5\mu\text{l}$ de solução estoque de DNA^{||} previamente descongelado em banho térmico a 62°C por 5 min. O microtubo é novamente homogeneizado suavemente e deixado em repouso por cerca de 20 min para que haja adsorção das moléculas de DNA à superfície das microesferas.

4.1.3 Finalização da Amostra

Basta, agora, distribuir o conteúdo do microtubo entre os porta-amostras. O volume de solução preparado ($321\mu\text{l}$) é suficiente para dois porta-amostras, com anéis de borracha pequenos (diâmetro aproximado de 7mm). A seguir, cada porta-amostras é cuidadosamente coberto com uma lamínula de cobertura, isto é, uma lamínula previamente lavada conforme o procedimento anteriormente descrito e cortada nas dimensões adequadas (Figura 4.1). O preenchimento dos porta-amostras deve ser feito com cuidado, de forma a evitar a formação de bolhas de ar no interior dos anéis de borracha.

Após terem sido cobertas, as amostras devem permanecer em repouso por um período de 12 a 24 horas, durante o qual haverá a adsorção das moléculas de DNA (e também de microesferas) à superfície do vidro. Quanto maior o

[¶]Polysciences, cat.#17134. $\rho = 1.05\text{g/ml}$; $n=1,6$.

^{||}New England Biolabs Lambda-DNA, $550\mu\text{g/ml}$, cat.#N3011S. Esse DNA é extraído vírus bacteriófago λ . Apresenta 48.502 pares de bases e mede cerca de $16,5\mu\text{m}$.

período de repouso, maior a probabilidade de serem encontrados bons pares DNA-microesfera.

Ao final do período de repouso, os porta-amostras devem ser cuidadosamente abertos e lavados delicadamente com PBS pH 7,4. Esse procedimento é realizado para a remoção do excesso de microesferas livres na amostra e o restabelecimento do pH ideal para o DNA (pH fisiológico). O processo deve ser feito com bastante cuidado, evitando-se a remoção de todo o líquido do porta-amostras. Deve-se remover boa parte da solução do porta-amostras, repondo-se, a seguir, em excesso, o volume removido com PBS pH 7,4. O processo deve repetir-se por três a quatro vezes. Na última vez, o volume repostado não deve exceder a capacidade do porta-amostras, para que este seja novamente fechado cuidadosamente. A lâmina de cobertura a ser usada pode ser a mesma já utilizada, desde que tenha sido também lavada por cerca de três vezes em PBS pH 7,4. Feito isto, as amostras estão prontas para o experimento.

Uma vez prontas para o uso, as amostras apresentarão microesferas livres, flutuando na solução e outras aderidas à superfície da lamínula. Haverá, também, uma fração de microesferas que estarão ligadas a uma ou mais moléculas de DNA ancoradas à superfície da lamínula, flutuando próximas a ela, formando sistemas microesferas-DNA (Figura 4.2).

PBS	pH 5,5	pH 7,4
<i>NaCl</i>	140 mM	140 mM
<i>Na₂HPO₄</i>	0,5 mM	8,0 mM
<i>NaH₂PO₄</i>	9,5 mM	2,0 mM

Tabela 4.1: Composição dos PBSs utilizados na preparação de amostras

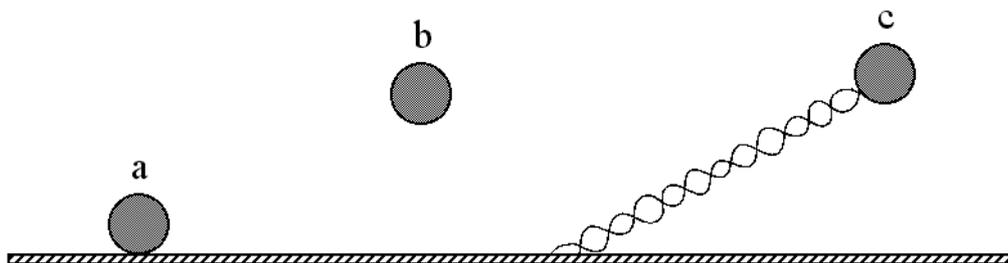


Figura 4.2: Configuração das microesferas em uma amostra pronta: (a) microesfera presa à superfície da lamínula; (b) microesfera flutuando livre na solução; (c) microesfera ancorada à superfície da amostra através de uma molécula de DNA.

4.2 Técnicas Experimentais

4.2.1 A Montagem Experimental

A montagem experimental (Figura 4.3) consiste de um microscópio óptico invertido *Nikon*** associado a dois lasers (um infravermelho e outro de He-Ne) e acoplado a um sistema de videomicroscopia com câmera CCD. Ambos os feixes de laser são focalizados a poucos micra da superfície da lamínula do porta-amostras com o auxílio de uma objetiva. Dessa forma, o laser infravermelho constituirá a pinça óptica usada para a manipulação das microesferas da amostra e o laser visível funcionará como sonda para o estudo da amostra, através da luz do laser que é retroespalhada pela microesfera confinada ao poço P de potencial da pinça óptica.

4.2.2 A Pinça Óptica

Desde a sua criação por Ashkin [3] no início da década de 1970, a técnica de manipulação de objetos em escala microscópica através de um feixe de laser,

**Nikon Eclipse TE300. Este modelo de microscópio apresenta óptica corrigida no infinito, permitindo que elementos ópticos diversos possam ser inseridos antes da objetiva sem alterar a focalização da mesma, facilitando a montagem da pinça óptica.

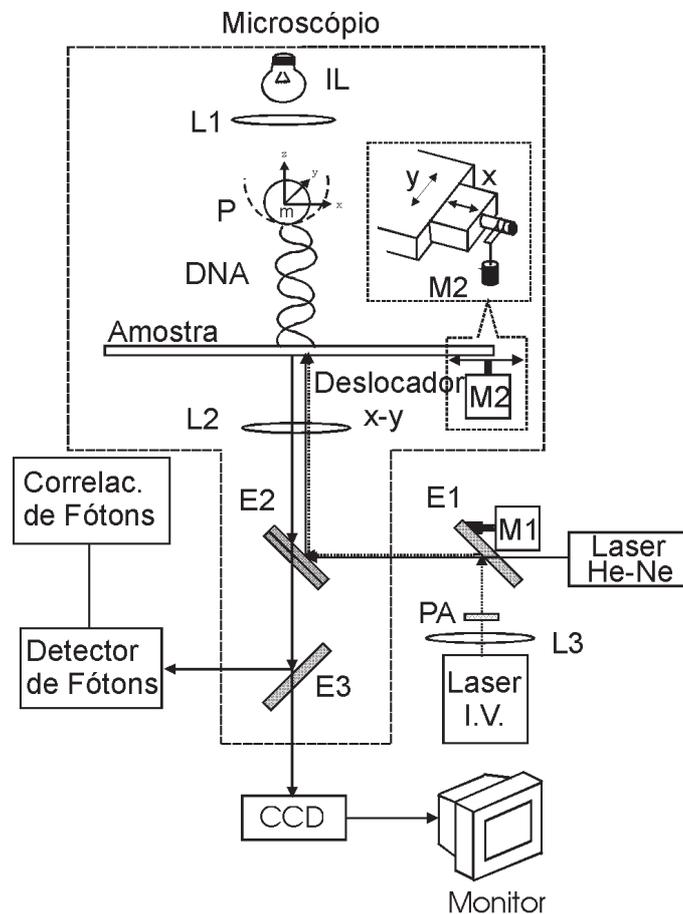


Figura 4.3: Esquema da montagem experimental

- **L1:** Condensador
- **L2:** Objetiva Nikon 100x NA=1,4
- **L3:** Objetiva 20x
- **E1:** Espelho total (i.v.)
- **E2:** Espelhos: 100% (i.v.)+
+50% (luz visível)
- **E3:** Divisor de feixes
- **Laser i.v.:** SDL 5422 $\lambda = 832nm$
- **PA:** Prisma Anamórfico
- **M1:** Micromotor (rotação de E1)
- **M2:** Micromotor para deslocamento
horizontal da amostra

conhecida como *pinça óptica*, tem encontrado várias aplicações em áreas como a física, a química, e, em particular, na biologia [3, 20]. A pinça óptica permitiu a manipulação precisa de células e outros organismos vivos e mesmo de organelas celulares e moléculas, como o DNA, sem danos aparentes às estruturas. Dessa forma, foi possível até mesmo observar-se a reprodução da bactéria *Escherichia coli* enquanto presa a uma pinça óptica [21].

Funcionamento Básico

A pinça óptica consiste, essencialmente, de um feixe de laser gaussiano focalizado por meio de uma lente. O mecanismo de pinçamento pode ser compreendido, de uma maneira simples, com o uso da óptica geométrica e da conservação do momento linear do sistema laser-objeto pinçado (Figura 4.4).

A força de pinçamento depende da intensidade e da frequência do laser utilizado. É importante considerar o tipo de material a ser manipulado, para que se escolha o tipo de laser e a intensidade adequados para evitar danos às amostras. Em nosso caso, utilizamos um laser na faixa do infravermelho ($\lambda = 832nm$) e a potência incidente medida na amostra é da ordem de $2mW$, o que gera uma força de pinçamento da ordem de alguns pN .^{††}

A pinça óptica tem importância fundamental em nossos experimentos. Com base no comportamento das microesferas de poliestireno capturadas e manipuladas através da pinça óptica é que se torna possível detectar moléculas únicas de DNA adequadas à realização dos experimentos. A cada vez que uma microesfera é pinçada, o estágio do microscópio, onde repousa o porta-amostras, é movimentado no plano $x-y$. Essa movimentação é possível pelo uso de deslocadores piezolétricos, que permitem uma precisão submicrométrica. Se a microesfera capturada encontrar-se ancorada à superfície da amostra por meio de uma molécula de DNA, a microesfera deverá escapar da pinça após o estágio ter sido deslocado de uma distância máxima de $2L$. A pinça óptica que empregamos não é capaz de exercer força suficiente para

^{††}A potência incidente do laser de He-Ne é cerca de 10 ordens de grandeza menor que a do laser infravermelho e também não causa danos às amostras.

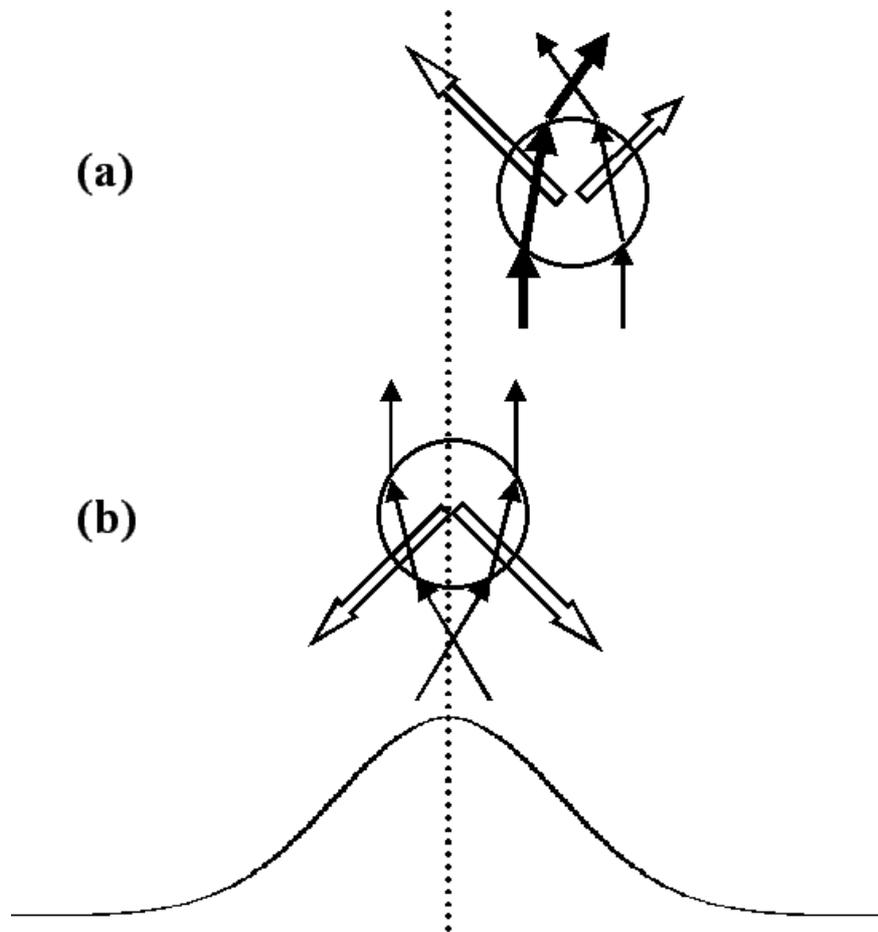


Figura 4.4: Princípio do pinçamento óptico: (a) Consideremos um objeto (por exemplo, uma esfera, que é o caso dos experimentos) situado fora do eixo do feixe gaussiano, abaixo do foco o suficiente para que os raios incidentes possam ser considerados paralelos. A esfera refrata o laser da forma indicada pelas setas sólidas. A conservação do momento linear do sistema laser-esfera faz com que a esfera sofra a ação de forças (setas abertas). A diferença de intensidade gerada pelo perfil gaussiano do laser gera uma resultante de forças que conduz a esfera em direção ao eixo do feixe do laser e ao foco. (b) Uma vez sobre o eixo do feixe do laser, a esfera, caso ultrapasse o foco, experimentará uma força resultante que tende a trazê-la de volta ao foco. Como resultado, a esfera fica confinada sobre o eixo do laser, em uma posição ligeiramente além do foco, onde a força da pressão de radiação se iguala à força de pinçamento vertical.

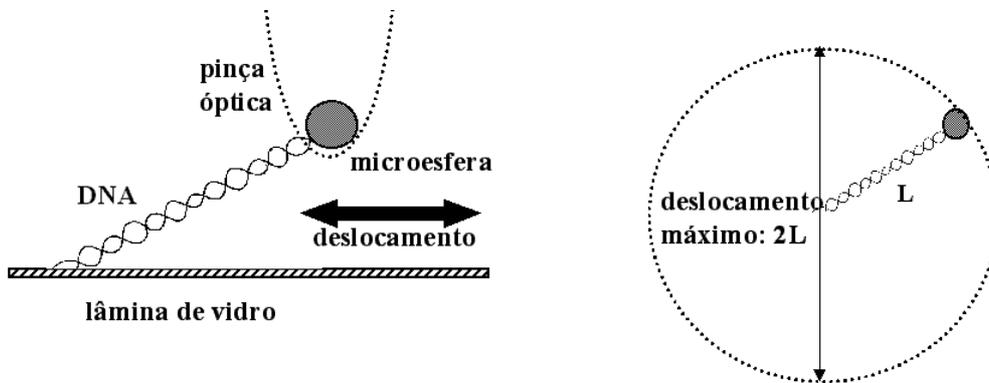


Figura 4.5: Pinçamento de um sistema microesfera-DNA

causar deformações reais à molécula de DNA^{‡‡} nem para arrancá-la da superfície da amostra ou da microesfera. Para verificar se há somente uma única molécula de DNA conectando a microesfera à lamínula, se não há obstruções ao deslocamento da microesfera ou ao estiramento do DNA e também para confirmar a amplitude $2L$ de deslocamento, a movimentação da amostra é feita repetidas vezes, em diferentes direções, procurando-se observar o padrão de simetria circular em torno do ponto de ancoramento do DNA à lamínula (figura 4.5).

Outra função crucial da pinça óptica é agir como sonda para a medição da força exercida pela molécula de DNA à medida em que esta é estirada, o que será explicado em detalhe oportunamente.

4.2.3 O Sistema de Videomicroscopia

O sistema de videomicroscopia é formado por uma câmera CCD conectada ao microscópio óptico. As imagens coletadas pela CCD possibilitam a visualização e manipulação das microesferas, permitindo, também, a localização e focalização dos feixes de laser na amostra.

^{‡‡}Segundo [8], a força necessária para estirar uma molécula de DNA além de seu comprimento L de contorno ('overstretching') é da ordem de $60pN$.

4.2.4 Correlação de Fótons e Movimento Browniano

No experimento, além do laser infravermelho, responsável pelo pinçamento óptico, incide também, sobre a microesfera pinçada, um feixe de laser de He-Ne. A luz visível retroespalhada pela microesfera, que é captada por um detector de fótons, carrega informações importantes sobre o sistema DNA-microesfera, que podem ser ‘lidas’ por meio da técnica de *autocorrelação* da intensidade retroespalhada.

A correlação é uma medida da similaridade entre duas grandezas. A correlação entre dois sinais $A(t)$ e $B(t)$ é definida como

$$\mathcal{G}(\delta) = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_{t_0}^{t_0+T} A(t) B(t - \delta) dt, \quad (4.1)$$

onde T é o tempo de integração, t_0 é o tempo inicial, δ é o atraso temporal entre os sinais. $\mathcal{G}(\delta)$ é chamada de *função de correlação cruzada* dos sinais $A(t)$ e $B(t)$. Se $A(t) = B(t)$, $\mathcal{G}(\delta)$ é a chamada *autocorrelação* do sinal. Para sinais estacionários e sistemas ergódicos, a função de correlação pode ser escrita

$$\mathcal{G}(\delta) = \langle A(0)B(\delta) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T A(t) B(t - \delta) dt, \quad (4.2)$$

onde $\langle A(0)B(\delta) \rangle$ é a média no ensemble. A autocorrelação da intensidade retroespalhada está intimamente relacionada ao movimento browniano realizado pela microesfera, que permanece, durante os experimentos, confinada ao poço de potencial harmônico da pinça óptica. O movimento browniano da microesfera confinada em um poço de potencial harmônico obedece à equação de Langevin. O termo inercial $m d^2x/dt^2$ da equação de Langevin pode ser desprezado porque $\gamma/k \gg m/\gamma$ (para o nosso sistema, $\gamma/k \sim 10^3 m/\gamma$)*.

*O tempo m/γ é o tempo necessário para que o sistema atinja o equilíbrio. Sendo ele desprezível, isto implica que o sistema atinge o equilíbrio tão rapidamente que podemos considerá-lo sempre em equilíbrio, onde a resultante das forças é nula.

$$\gamma \frac{dx}{dt}(t) = -kx(t) + f(t), \quad (4.3)$$

onde γ é o coeficiente de atrito da microesfera com o meio em que se encontra, k é a constante de força da pinça e $f(t)$ é a força estocástica que surge devido aos choques da partícula confinada no poço com as demais partículas do meio.

Resolvendo (4.3) para $x(t)$, temos

$$\Delta x(t) = x(t) - x_{(-\infty)} = \frac{1}{\gamma} \int_{-\infty}^t dt' e^{-(t-t')/\tau} f(t'), \quad (4.4)$$

Podemos, agora, calcular a função de autocorrelação da posição

$$\langle \Delta x(0) \Delta x(t) \rangle = \frac{1}{\gamma^2} \int_{-\infty}^0 dt_1 \int_{-\infty}^t dt_2 e^{-(t-t_1-t_2)/\tau} \langle f(t_1) f(t_2) \rangle. \quad (4.5)$$

Mas

$$\langle f(t_1) f(t_2) \rangle = 2\gamma k_B T \delta(t_1 - t_2). \quad (4.6)$$

Donde

$$\begin{aligned} \langle \Delta x(0) \Delta x(t) \rangle &= \frac{1}{\gamma^2} \int_{-\infty}^0 dt_1 \int_{-\infty}^t dt_2 e^{-(t-t_1-t_2)/\tau} 2\gamma k_B T \delta(t_1 - t_2) = \\ &= 2 \frac{k_B T}{\gamma} \int_{-\infty}^0 dt_1 e^{-(t-2t_1)/\tau} \end{aligned} \quad (4.7)$$

Portanto

$$\langle \Delta x(0) \Delta x(t) \rangle = \frac{k_B T}{k} e^{-t/\tau}, \quad (4.8)$$

onde

$$\tau = \gamma/k. \quad (4.9)$$

É possível relacionar a autocorrelação das posições com a autocorrelação das intensidades. O perfil da intensidade retroespalhada é gaussiano, podendo ser escrito

$$I(x) = I_0 e^{-x^2/2\sigma^2}. \quad (4.10)$$

Para pequenos deslocamentos, é válido escrever

$$I(x_0 + \Delta x) = I(x_0) \left[1 - \frac{x_0}{\sigma^2} \Delta x + \left(\frac{x_0^2 - \sigma^2}{\sigma^4} \right) \frac{(\Delta x)^2}{2} \right], \quad (4.11)$$

onde $I(x_0) = I_0 e^{-x_0^2/2\sigma^2}$.

A autocorrelação da intensidade retroespalhada é

$$\begin{aligned} \langle I(x_0 + \Delta x)I(x_0 + \Delta x') \rangle &= I^2(x_0) \left\langle \left[1 - \frac{x_0}{\sigma^2} \Delta x + \left(\frac{x_0^2 - \sigma^2}{\sigma^4} \right) \frac{(\Delta x)^2}{2} \right] \times \right. \\ &\quad \left. \left[1 - \frac{x_0}{\sigma^2} \Delta x' + \left(\frac{x_0^2 - \sigma^2}{\sigma^4} \right) \frac{(\Delta x')^2}{2} \right] \right\rangle, \quad (4.12) \end{aligned}$$

que pode ser reescrita, após algumas simplificações,

$$\langle I(x_0 + \Delta x)I(x_0 + \Delta x') \rangle = I^2(x_0) \left(1 + \frac{x_0^2}{\sigma^4} \langle \Delta x \Delta x' \rangle + \frac{(x_0^2 - \sigma^2)^2}{4\sigma^8} \langle (\Delta x)^2 (\Delta x')^2 \rangle \right) \quad (4.13)$$

Para que a correlação de primeira ordem predomineBLABLABLAo que ocorre nos nossos experimentos... Donde

$$\langle I(x(t_0))I(x(t)) \rangle = I^2(x_0) \left(1 + \frac{x_0^2}{\sigma^4} \langle \Delta x \Delta x' \rangle \right). \quad (4.14)$$

Normalizando (4.14) pela intensidade de linha de base $I_{(x_0)}$ e usando a equação (4.8)

$$\langle I(x(t_0))I(x(t)) \rangle_N = 1 + B \left(\frac{k_B T}{k} \right) e^{-(t-t_0)/\tau}, \quad (4.15)$$

onde $B = \frac{1}{l^2(x_0)} \frac{x_0^2}{\sigma^4}$.

O Correlacionador: O correlacionador que utilizamos é o modelo digital BI-9000AT (Brookhaven Instruments Corporation). Esse equipamento apresenta uma função extra, fundamental para nossos experimentos. É capaz de construir o gráfico da intensidade de luz captada pelo detector de fótons em função do tempo.

4.3 Os Experimentos

4.3.1 Calibração das Medidas de Força

O método experimental que empregamos para a medição da força entrópica do DNA baseia-se no fato de que, quando a molécula é estirada, a microesfera a ela ligada sai de sua posição de equilíbrio no fundo do poço de potencial da pinça, assumindo uma nova posição de equilíbrio onde a força entrópica do DNA seja igual àquela exercida pela pinça. Medindo-se esse deslocamento e a constante de força da pinça, obtemos, em princípio, a força exercida pelo DNA. O experimento descrito a seguir visa a verificar a consistência desse método, através de uma calibração das medidas de força. Para isto, prepara-se uma amostra contendo uma solução pouco concentrada de microesferas em PBS pH 7,4. Essa solução não contém DNA, de modo que as esferas se encontram livres.

Emprega-se, nesse experimento, o motor M2 acoplado diretamente ao deslocador horizontal. A calibração de velocidades é feita por meio do sistema de videomicroscopia, com a filmagem do deslocamento de uma régua micrométrica colocada sobre o estágio do microscópio. O índice de tempo dos quadros filmados permite a determinação das velocidades utilizadas. As imagens são analisadas utilizando-se o software *NIH Image 1.62*.

O procedimento experimental consiste no pinçamento de uma microesfera a uma altura adequada. A altura é medida por meio da escala micrométrica do knob do microscópio, cuja referência zero é determinada pela focalização

do laser visível na lamínula. Utilizamos uma altura de $10\mu m$ acima da superfície da amostra e uma corrente[†] de $60mA$ para a pinça óptica. Em seguida, obtém-se o perfil de luz retroespalhada pela microesfera. Para isto, a microesfera é centralizada, movendo-se o espelho E1, sobre o pico do perfil de luz retroespalhada, cuja intensidade máxima é corrigida para um limite adequado. De modo geral, utilizamos uma intensidade máxima da ordem de 100 kcontagens/s. Deslocando-se o espelho E1 na direção horizontal, com o auxílio do micromotor M1, a uma velocidade adequada conhecida, obtém-se o perfil retroespalhado, construído pelo correlacionador (Figura 4.6). A velocidade utilizada é $v = 0.012\mu m/s$. A curva do perfil é ajustada utilizando-se uma função gaussiana

$$I = I_1 + I_2 e^{-\frac{(x-x_c)^2}{2\sigma^2}}, \quad (4.16)$$

onde x_c é a abscissa do pico da gaussiana e σ é sua largura. Os parâmetros de livres do ajuste são I_1 , I_2 , x_c e σ . A função ajustada fornece a relação entre a posição da microesfera e a intensidade retroespalhada.

Em seguida, a microesfera é conduzida para a região de máxima derivada do perfil, onde a variação da intensidade retroespalhada é mais sensível ao deslocamento da microesfera. Faz-se uma medida de autocorrelação da intensidade retroespalhada, de onde se extrai o tempo característico τ (Figura 4.7). O tempo de medida é de $100s$ e a janela de correlação foi de $\delta = 200\mu s$ a $\delta = 200ms$. A curva de autocorrelação é ajustada com o auxílio do programa *KaleidaGraph*, utilizando-se a generalização para três dimensões de (4.15)

$$\langle I(\vec{r}(0))I(\vec{r}(t)) \rangle_N = C + A e^{-t/\tau} + A_z e^{-t/\tau_z}, \quad (4.17)$$

onde $A = Bk_B T/k$ é a amplitude da função de autocorrelação do movimento da microesfera no plano $x-y$ e, $A_z = B_z k_B T/k_z$, a amplitude da função de autocorrelação do movimento na direção z . O tempo τ é o tempo caracte-

[†]A corrente que alimenta o diodo gerador da radiação i.v. é o parâmetro utilizado para o controle da constante de força da pinça óptica.

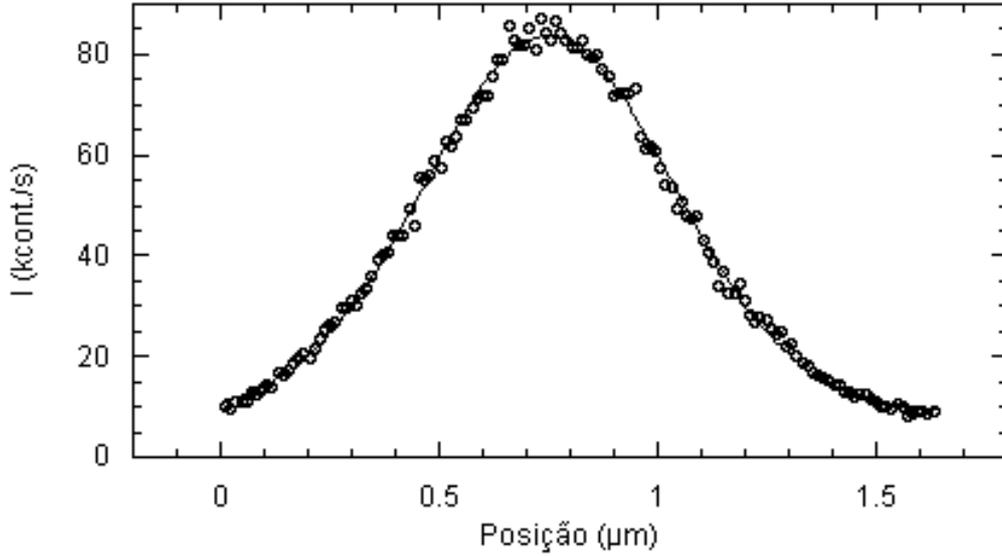


Figura 4.6: Calibração da medida de força: perfil da intensidade retroespalhada.

terístico da autocorrelação em x - y [‡] e τ_z é o tempo característico da autocorrelação em z .

Os parâmetros livres de ajuste são as amplitudes e os tempos de correlação. O parâmetro C representa o valor experimental da linha de base da curva de correlação normalizada, obtido por inspeção direta do gráfico. Este valor é muito próximo do valor 1 teórico, mas é utilizado como parâmetro fixo para melhor ajuste da curva experimental.

O tempo de correlação obtido nesse caso é $\tau = 7,8(4)ms$.

Feita a correlação a amostra é então deslocada a velocidade constante, armazenando-se a variação ocorrida na intensidade retroespalhada (Figura 4.8). A velocidade é progressivamente aumentada ($\Delta v = 5,6\mu m/s$), até que a microesfera escape da pinça.

Através do perfil de luz retroespalhada, é possível transformar em posição as intensidades retroespalhadas pela bolinha na situação de equilíbrio e fora dela (quando a amostra é deslocada). Com o deslocamento da amostra, a

[‡]Devido à simetria radial da pinça óptica, $k_x = k_y$, donde $B_x = B_y$ e $\tau_x = \tau_y$.

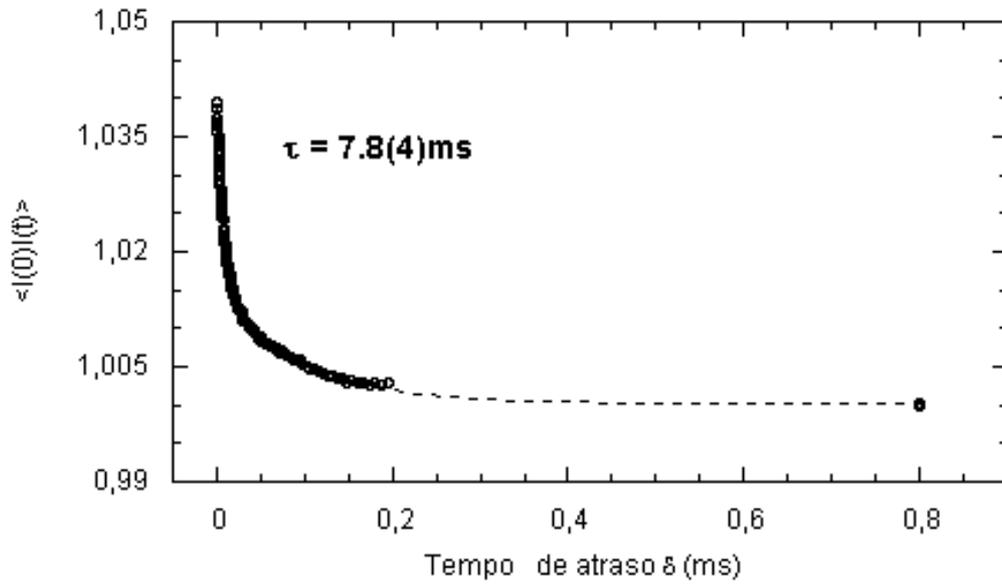


Figura 4.7: Calibração da medida de força: autocorrelação da intensidade retroespalhada. A linha tracejada indica a curva de ajuste.

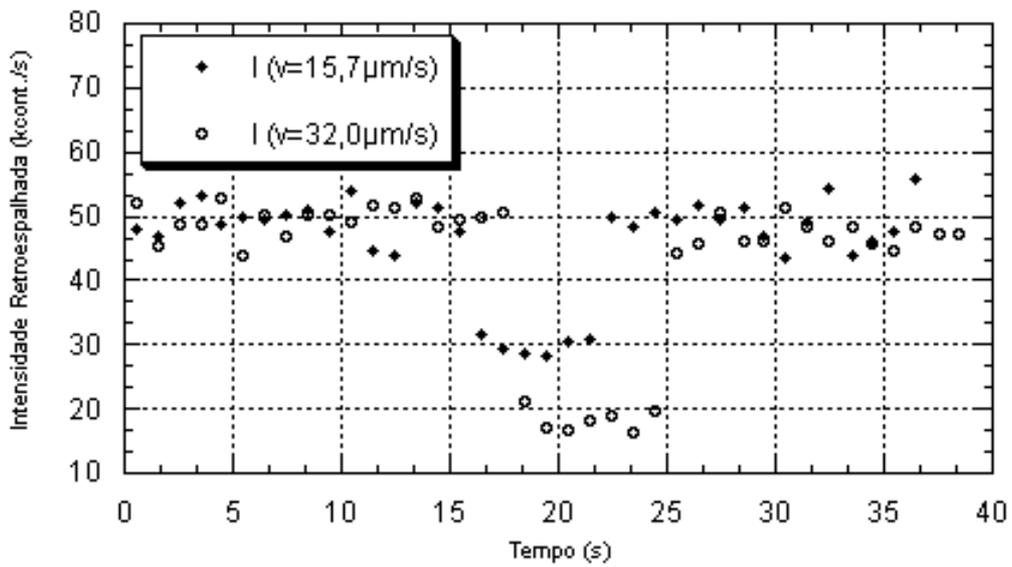


Figura 4.8: Calibração da medida de força: medidas típicas para duas velocidades distintas

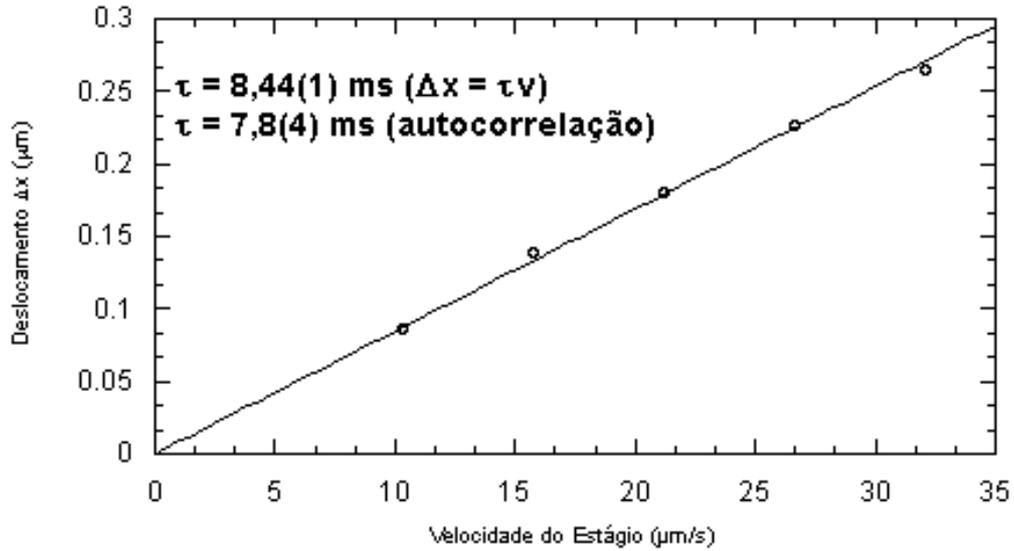


Figura 4.9: Calibração da medida de força: deslocamento relativo da microesfera em função da velocidade.

microesfera assume uma nova posição de equilíbrio, onde a força da pinça equilibre a força de Stokes, ou seja,

$$\gamma v = k\Delta x. \quad (4.18)$$

Daí obtemos

$$\Delta x = v\tau \quad (4.19)$$

Assim, se o método experimental a ser empregado for capaz de fornecer corretamente os valores de Δx e τ , um gráfico Δx versus v fornecerá uma reta de inclinação igual ao tempo τ de correlação. Obtivemos um valor que concordam com o tempo de correlação dentro de uma faixa de erro aceitável de 8%, o que demonstra a consistência do método (Figura 4.9).

4.3.2 Estudo da Força Entrópica da Molécula de DNA

A técnica experimental utilizada para o estudo do comportamento elástico entrópico de moléculas de DNA compõe-se basicamente de seis etapas:

1. Preparação de amostras contendo moléculas de DNA em condições de serem manipuladas individualmente;
2. Localização de uma molécula de DNA para estudo;
3. Medida do perfil de luz retroespalhado pela microesfera presa à molécula de DNA (DNA em equilíbrio, não estirado);
4. Medida da constante de força da pinça óptica por correlação de fótons (DNA em equilíbrio, não estirado);
5. Estiramento da molécula, com a medida simultânea da intensidade de luz retroespalhada pela microesfera;
6. Análise dos dados para a obtenção da força exercida pela molécula em função de seu estiramento.

As etapas (1) e (2) já foram discutidas anteriormente. Discutiremos, agora, os demais procedimentos experimentais. Para todos estes, a pinça óptica deve estar operando à corrente adequada para as medidas. A corrente utilizada é de 100mA . A temperatura do ambiente em que as medidas são realizadas deve ser registrada.

Obtenção do Perfil de Retroespalhamento

Uma vez colocada a amostra ao microscópio e localizado um bom par DNA-microesfera para estudo, o próximo passo é a obtenção do perfil de luz retroespalhada pela microesfera. Para isto, a microesfera é pinçada em sua posição de equilíbrio e posicionada à altura desejada para as medidas. A altura utilizada é de $5\mu\text{m}$. Movendo-se o espelho E1, a microesfera é centralizada sobre o pico do perfil de luz retroespalhada cuja intensidade

máxima é corrigida para um limite adequado. De modo geral, utilizamos uma intensidade máxima da ordem de 100 kcontagens/s. Deslocando-se o espelho E1 na direção horizontal, com o auxílio do micromotor M1, a uma velocidade adequada conhecida, obtém-se o perfil retroespalhado. A velocidade utilizada foi $v_1 = 0.012\mu\text{m}/\text{s}$.

Medidas de Autocorrelação da Intensidade Retroespalhada

Em seguida, a microesfera é posicionada numa região do perfil de derivada significativa[§], certificando-se de pinçá-la em sua posição de equilíbrio. Neste ponto é feita a medida de autocorrelação da intensidade retroespalhada. O tempo de duração das medidas é de 100s de duração, com o atraso temporal δ variando de 200 μs a 200ms. São arquivadas tanto as curvas de correlação quanto da intensidade retroespalhada em função do tempo.

Obtenção do Perfil de Estiramento

O próximo passo é a obtenção do perfil da intensidade retroespalhada à medida em que o DNA é estirado a velocidade constante. Para diferenciá-lo do perfil anterior, este será chamado de *perfil de estiramento*, obtido com o auxílio do micromotor M2. A pinça óptica permanece estacionária (motor M1 parado), enquanto o motor M2 desloca horizontalmente o porta-amostras (a velocidade utilizada foi $v_2 = 0.005\mu\text{m}/\text{s}$). Dessa forma, a microesfera vai saindo cada vez mais de sua posição de equilíbrio (ou seja, do fundo do poço de potencial da pinça), gerando um perfil de luz retroespalhada em função do tempo de deslocamento do estágio do microscópio.

[§]Para que haja maior sensibilidade nas medidas de autocorrelação.

4.4 Análise dos Dados Experimentais

4.4.1 Obtenção da Constante de Força da Pinça Óptica

As curvas de autocorrelação são ajustadas com o mesmo procedimento descrito na seção 4.3.1, obtendo-se o tempo τ da correlação no plano $x-y$. Este é o tempo que nos interessa, como ficará claro adiante, pois se relaciona à constante de força k_x da pinça.

Como $\tau = \gamma/k$, podemos determinar a constante de força da pinça óptica, conhecendo o valor de γ . O coeficiente γ de atrito da microesfera imersa na solução depende da altura a que ela se encontra da superfície da amostra.

Para uma partícula esférica de raio r , (de acordo com [23])

$$D_{//} = D_0 \left[1 - \frac{9}{16} \left(\frac{r}{h} \right) + \frac{1}{8} \left(\frac{r}{h} \right)^3 - \frac{45}{254} \left(\frac{r}{h} \right)^4 - \frac{1}{16} \left(\frac{r}{h} \right)^5 \right] \quad (4.20)$$

onde h representa a altura do centro da partícula em relação à superfície e $D_0 = k_B T / \gamma_0$ representa o coeficiente de difusão livre da partícula. Este é dado por $\gamma = 6\pi\bar{\eta}r$, onde $\bar{\eta}$ é a viscosidade do meio em que se encontra a partícula, cuja dependência com a temperatura é dada por

$$\bar{\eta} = 0,26 + 1,51e^{-T/29}, \quad (4.21)$$

onde T é a temperatura em graus Celsius[¶]. Medindo-se a temperatura a que o experimento é realizado, dado que $r = 1,4\mu m$, $\bar{\eta} = 10^{-2} poise$ e $h = 5\mu m$, determina-se o respectivo valor de γ , a partir do qual se obtém o valor de k .

[¶]Essa função foi obtida ajustando-se o gráfico de viscosidade da água em função da temperatura construído a partir de tabela extraída do *American Institute of Physics Handbook*, p.2-166 (1957)

É importante observar que é preciso calcular apenas o coeficiente da difusão paralela à superfície ($D_{//}$), pois é ele que está relacionado à constante k_x da pinça.

4.4.2 Análise dos Perfis de Intensidade Retroespalhada

Sabendo-se a velocidade com que a microesfera é deslocada, obtém-se o perfil de retroespalhamento em função da posição da microesfera. Essa curva é ajustada pela gaussiana (4.16).

Analogamente, utilizando-se a velocidade de deslocamento do porta-amostras, o perfil de estiramento pode ser também dado em função da posição que, nesse caso, se refere à componente horizontal do estiramento da molécula de DNA. Já que a altura a que o perfil de estiramento é feito é pequena, a componente vertical da força entrópica é pequena, sendo equilibrada pela componente vertical da força da pinça óptica na faixa de deslocamentos analisada. Dessa forma, o deslocamento da microesfera é essencialmente horizontal e podemos relacionar a intensidade retroespalhada pela microesfera no perfil de estiramento com a sua posição, com o auxílio do perfil de retroespalhamento^{||}. A posição de equilíbrio da microesfera (ou seja, antes de o DNA ser estirado) pode ser determinada a partir da média da intensidade retroespalhada medida juntamente com a correlação nessa posição.

Tendo-se o deslocamento da microesfera em relação ao fundo do poço de potencial da pinça óptica, o equilíbrio de forças na direção horizontal nos leva a escrever

$$k\Delta x = F_{DNA} \cos \alpha = F_{DNA} \frac{x}{\sqrt{x^2 + h^2}}, \quad (4.22)$$

onde x é a componente horizontal do estiramento da molécula de DNA.

^{||}Caso a componente vertical da força entrópica se torne grande, a altura da microesfera se altera com o estiramento e não é possível relacionar o perfil de estiramento com o perfil de retroespalhamento, feito a altura constante.

O termo $\cos \alpha$ representa a correção da força para a altura utilizada, seno α o ângulo entre a direção da molécula estirada e a horizontal.

É possível, então, construir um gráfico da componente horizontal da força entrópica do DNA em função de seu estiramento horizontal. Um resultado típico é mostrado na figura 4.10.

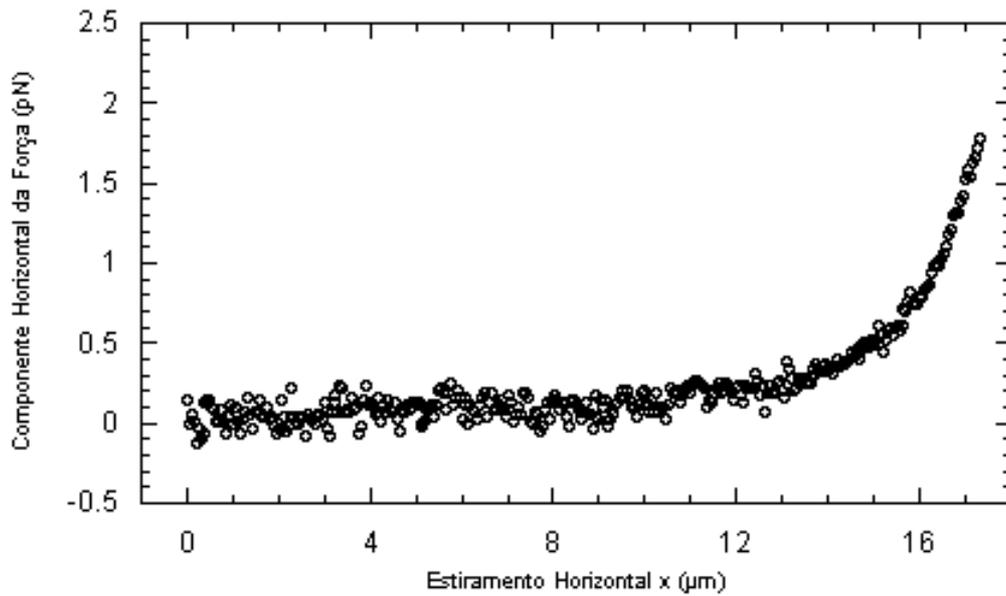


Figura 4.10: Comportamento típico da força entrópica em função do estiramento do DNA

O ajuste da curva de força é feito utilizando-se uma versão da equação 3.23

$$F = \frac{k_B T}{A} \left[\frac{\sqrt{x^2 + h^2}}{L} + \frac{1}{4 \left(1 - \frac{\sqrt{x^2 + h^2}}{L}\right)^2} - \frac{1}{4} \right] \frac{x}{\sqrt{x^2 + h^2}},$$

onde a força é expressa em função do estiramento horizontal e acrescentou-se a correção para a altura. Os parâmetros livres de ajuste são os comprimento A de persistência e L de contorno da molécula.

Resta, agora, apresentar os resultados experimentais obtidos, o que será feito no capítulo seguinte. Antes, apresentamos, em uma seção extra, os

procedimentos realizados para a calibração de velocidades envolvidas nos experimentos.

4.5 Calibração de Velocidade dos Micromotores

4.5.1 Velocidade de Deslocamento do Espelho E1

Sendo E1 responsável pelo deslocamento do feixe de laser infravermelho, ou seja, da pinça óptica, a calibração de sua velocidade é baseada no deslocamento de uma microesfera pinçada. Uma vez pinçada uma microesfera, o motor M1 é ligado e filma-se, em grande aumento, o movimento da microesfera. Isto é feito com o auxílio do sistema de videomicroscopia e do software Image 1.62, que é capaz de determinar as coordenadas do centro de massa da microesfera em função do tempo. Essa medida foi realizada várias vezes e a média obtida foi $v_1 = (0,012 \pm 0,001)\mu\text{m}/\text{s}$. Uma medida típica encontra-se ilustrada na figura 4.11.

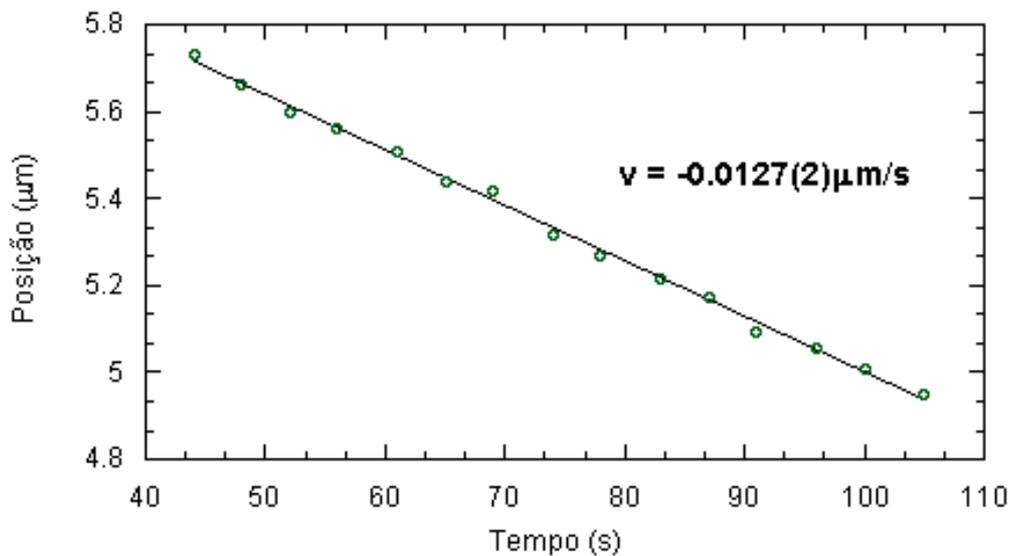


Figura 4.11: Calibração da velocidade de deslocamento do espelho E1

4.5.2 Velocidade de Deslocamento do Porta-Amostras

A velocidade de deslocamento do porta-amostras adequada à obtenção do perfil de estiramento é cerca de 10 vezes menor que a mínima velocidade permitida pelo acoplamento direto do motor M2 ao deslocador horizontal. Nesse caso, utiliza-se a alavanca de acoplamento, mostrada no detalhe da figura 4.3. Para medir essa velocidade, empregamos um interferômetro de Fabry-Perot, mais eficiente na medição de pequenos deslocamentos por sua maior precisão. São empregados dois semi-espelhos para luz visível, dispostos frente a frente, um deles fixo e o outro montado sobre o deslocador horizontal, de modo a que esse segundo semi-espelho se desloque juntamente com a amostra. Através de um arranjo de espelhos, desvia-se uma fração de luz do laser visível, que incide perpendicularmente sobre os semi-espelhos.

A intensidade luminosa que atravessa o interferômetro é captada por um LDR, que varia sua resistência de acordo com a intensidade luminosa que incide sobre ele, conectado a uma fonte de corrente. Com o deslocamento horizontal, varia a defasagem entre os feixes que incidem sobre o LDR, de modo que a intensidade captada por ele, resultante da interferência entre os feixes, oscila entre dois máximos consecutivos quando os espelhos se afastam de uma distância relativa igual à metade do comprimento de onda da luz do laser. A tensão sobre o LDR varia da mesma forma. Monitorando-se essa tensão com o auxílio de um osciloscópio, obtém-se o afastamento temporal entre os máximos e também a velocidade de deslocamento do porta-amostras. As figuras 4.12 e 4.13 ilustram o procedimento, repetido para várias inclinações da alavanca de acoplamento. A velocidade medida foi de $v_2 = 0,050 \pm 0,002 \mu m/s$.

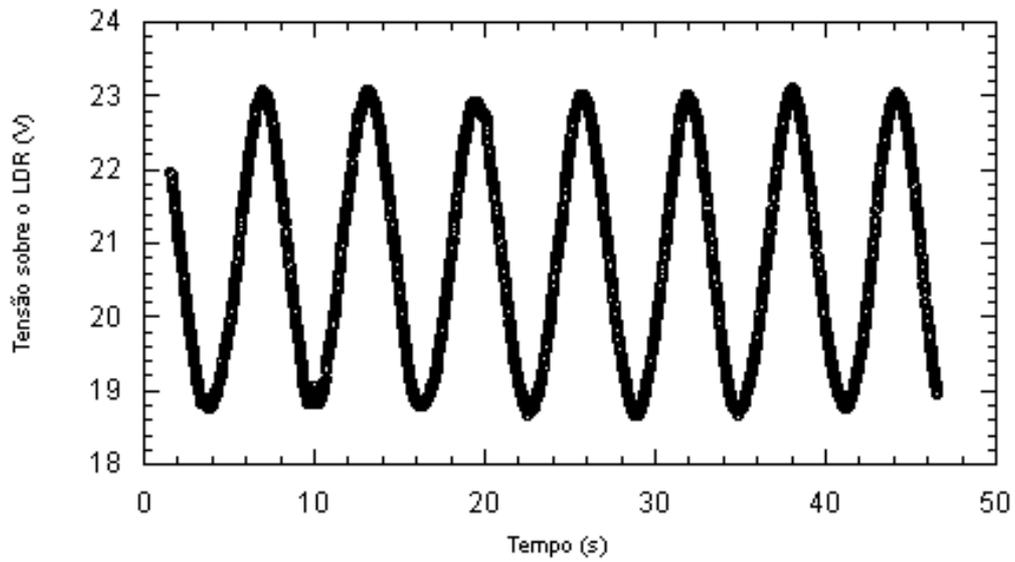


Figura 4.12: Sinal de tensão obtido sobre o LDR.

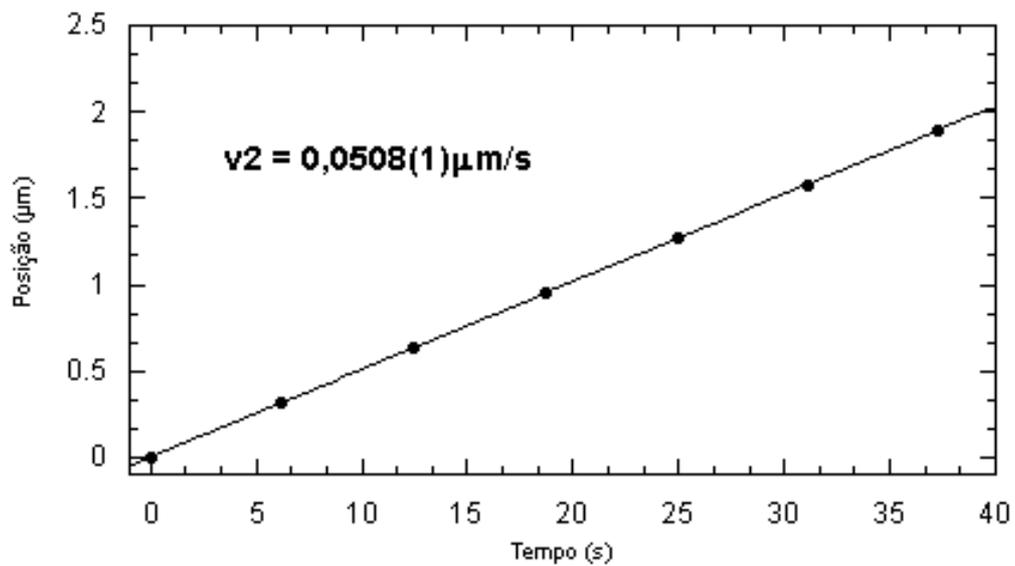


Figura 4.13: Medida da velocidade de deslocamento do porta-amostras

Capítulo 5

Resultados

Os gráficos a seguir ilustram os resultados típicos obtidos nos experimentos de investigação da força entrópica da molécula de DNA.

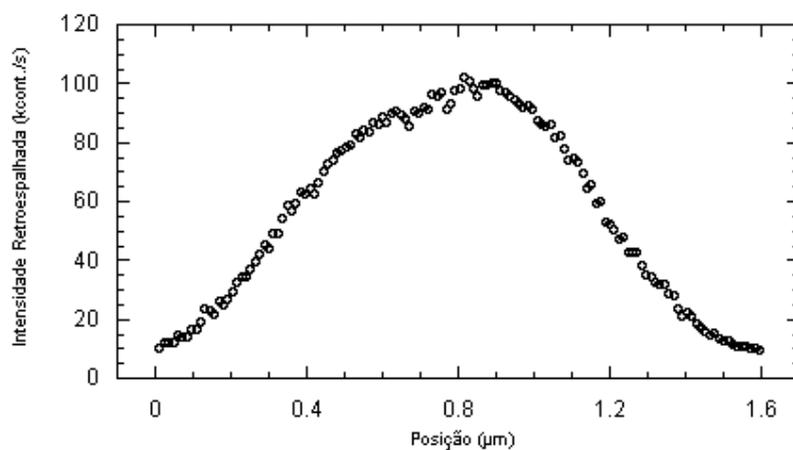


Figura 5.1: Perfil típico de retroespalhamento.

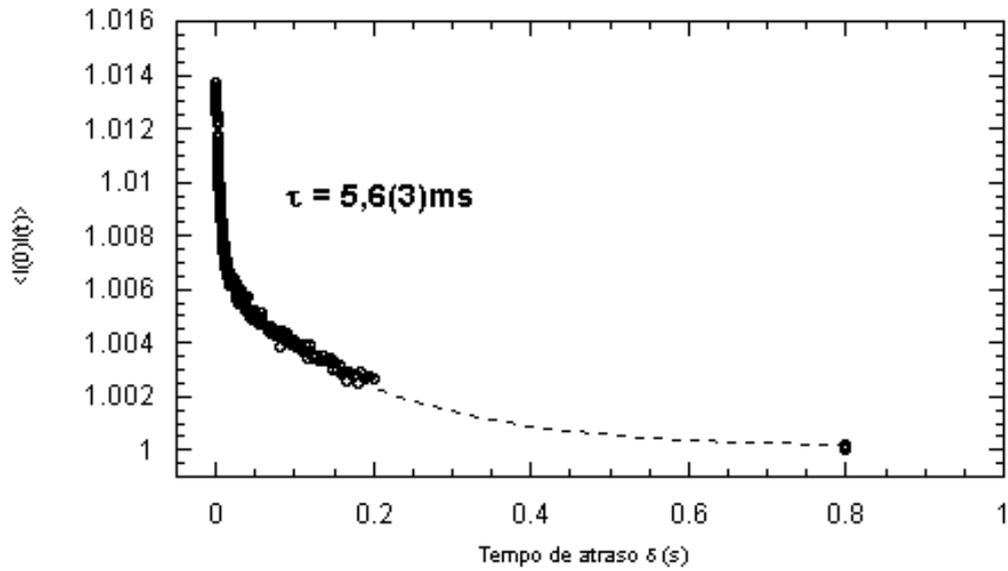


Figura 5.2: Função típica de autocorrelação.

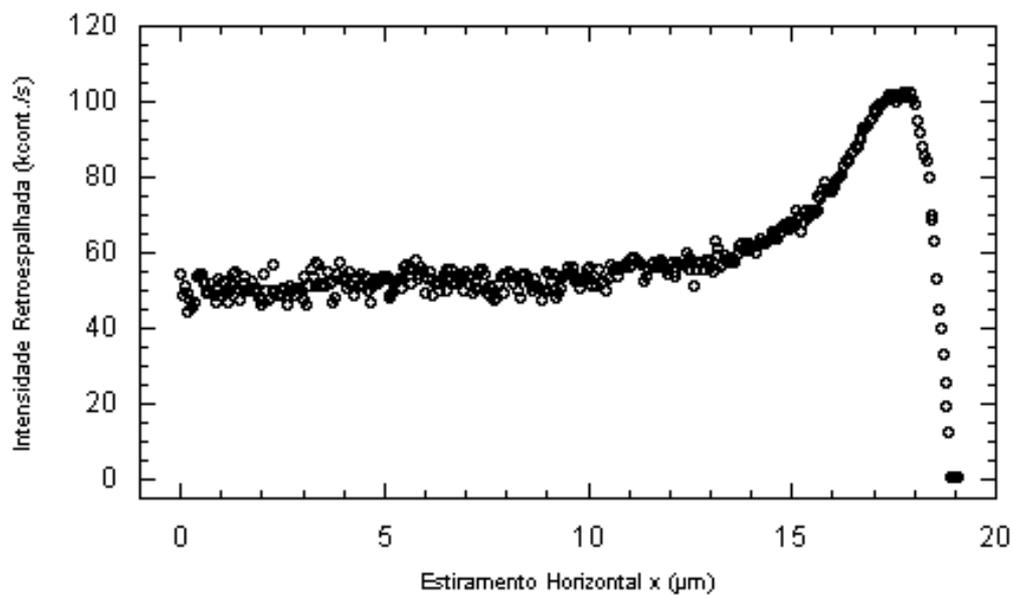


Figura 5.3: Perfil típico de estiramento.

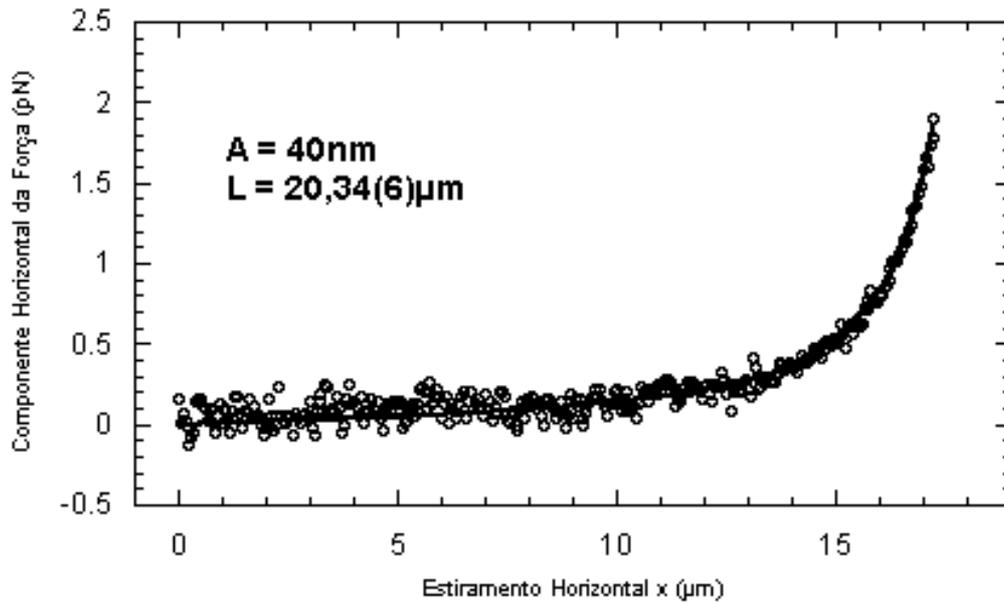


Figura 5.4: Ajuste típico da força entrópica em função do estiramento horizontal.

A tabela 5.1 apresenta os resultados típicos obtidos.

$A(\text{nm})$	$L(\mu\text{m})$
39(1)	20,81(6)
42(1)	20,36(5)
48(1)	19,28(4)
47(2)	15,63(4)
40(1)	15,51(4)
41(1)	15,55(4)
48(2)	15,77(4)
44(2)	16,00(5)

Tabela 5.1: Comprimentos de persistência obtidos para o λ -DNA

O valor médio do comprimento de persistência obtido é:

$$\underline{\underline{A = (44 \pm 4) \text{ nm}}}$$

O valor médio obtido está de acordo com os valores relatados na literatura, que variam de 39 a 53nm, dependendo da força iônica do meio em que se encontra o DNA. Para o meio utilizado nos experimentos (PBS 10mM, pH 7,4, 150mM Na⁺), o valor típico encontrado na literatura é de 43nm ([8, 7]).

Como se pode observar na tabela 5.1, foram encontrados valores de L diferentes do valor esperado para uma molécula única de λ -DNA, em torno de 16,5 μ m. Uma explicação plausível para a ocorrência de fragmentos menores é a degradação sofrida pelas moléculas em virtude do processo de congelamento e descongelamento repetidos das soluções-estoque utilizadas no preparo das amostras. Outra hipótese que poderia ser considerada é a existência de mais de uma molécula de DNA conectando a microesfera à superfície. Entretanto, é razoável afirmar que a rigidez dessa configuração seria diferente daquela apresentada por uma única molécula. Dessa forma, o comprimento de persistência medido seria diferente, o que não ocorreu nas amostras estudadas, o que nos leva a crer que se trata de fragmentos isolados. Os resultados de Coelho Neto ([8]) também corroboram a existência de fragmentos de DNA isolados.

Por outro lado, não podemos explicar claramente a existência de moléculas de comprimento de contorno maior que 16,5 μ m. Uma possível explicação seria a eventual formação de ligações entre as extremidades de fragmentos e moléculas. Sabe-se que a dupla-fita apresenta a mesma seqüência de pares de bases em ambas as extremidades. Dessa forma, uma molécula que perdesse um fragmento da extremidade de uma de suas fitas poderia ligar-se a outro fragmento que apresentasse, exposta em sua extremidade, a seqüência complementar àquela na extremidade da molécula.

Capítulo 6

Conclusão

Neste trabalho, combinamos as técnicas de pinçamento óptico, videomicroscopia e correlação de fótons para estudar o comportamento elástico entrópico de uma única molécula de DNA do vírus bacteriófago λ .

A concordância entre os valores de comprimento de persistência medidos e aqueles relatados na literatura, obtidos por outras técnicas, nos leva à conclusão de que o método experimental pode ser empregado com sucesso no estudo das características elásticas entrópicas de uma única molécula de DNA.

Uma vantagem importante de nosso método é que a calibração da pinça é feita para cada novo experimento, utilizando-se a mesma microesfera utilizada nas medidas de força. Alguns autores utilizam uma microesfera livre para essa calibração. Entretanto, a utilização da mesma microesfera evita discrepâncias relacionadas a variações individuais de uma microesfera para outra.

O comprimento de persistência pode ainda ser utilizado como parâmetro no estudo de alterações das características elásticas do DNA causadas por substâncias diversas, como proteínas ou outros agentes químicos. Dessa forma, é possível empregá-lo como uma sonda para observar a dinâmica da interação DNA-proteínas, realizando-se uma série de medidas de força ao longo do tempo em que a interação estiver ocorrendo.

Bibliografia

- [1] J. D. Watson & F. H. C. Crick, *Nature* **171**, 737 (1953).
- [2] M. E. Hogan & R. H. Austin *Nature* **329**, 263 (1987).
- [3] A. Ashkin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 4853 (1997).
- [4] G. V. Shivashankar, G. Stolovitzky & A. Libchaber *Applied Physics Letters* **73**, 291 (1998).
- [5] G. V. Shivashankar, M. Feingold, O. Krichevsky, A. Libchaber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 7916 (1999).
- [6] T. Strick, J. F. Allemand, V. Croquette, D. Bensimon, *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **74**, 115 (2000).
- [7] M. D. Wang, H. Yin, R. Landick, J. Gelles & S. M. Block, *Biophysical Journal* **72**, 1335 (1997).
- [8] J. C. Neto, *Medida da Elasticidade Entrópica de uma Molécula de DNA*. Dissertação de Mestrado. Departamento de Física - ICEX - UFMG, 2001.
- [9] R. Bar-Ziv, A. Meller, T. Tlusty, E. Moses, J. Stavans & S. A. Safran *Physical Review Letters* **78**, 154 (1997); *Biophysical Journal* **74**, 1541 (1998).
- [10] J. F. Marko & E. D. Siggia, *Macromolecules* **28**, 8759 (1995).
- [11] L. Stryer., *Biochemistry* (W. H. Freeman, New York, 1988).

- [12] R. E. Franklin & R. G. Gosling, *Nature* **171**, 740 (1953).
- [13] Citado em H. F. Judson, *The Eighth Day of Creation* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1996).
- [14] Benjamin Lewin *Genes VI* (Oxford University Press, New York, 1997).
- [15] J. D. Watson & F. H. C. Crick, *Nature* **171**, 964 (1953).
- [16] J. D. Watson et al., *Molecular Biology of the Gene* (Benjamin/Cummings, Menlo Park, 1987).
- [17] M. Doi & S. F. Edwards, *The Theory of Polymer Dynamics* (Oxford University Press, New York, 1995).
- [18] M. E. Fisher, *Am. J. Phys.* **32**, 343.
- [19] J. F. Allemand, D. Bensimon, L. Jullien, A. Bensimon, V. Croquette, *Biophysical Journal* **73**, 2064 (1997).
- [20] A. Ashkin & J. M. Dziedzic, *Science* **235**, 1517 (1987).
- [21] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, T. Yamane, *Nature* **330**, 769 (1987).
- [22] M. Doi & S. F. Edwards, *The Theory of Polymer Dynamics* (Oxford University Press, New York, 1995).
- [23] M. I. M. Feitosa & O. N. Mesquita, *Physical Review A* **44**, 10, 6677 (1991).

Apêndice A

A Função Autocorrelação Angular

Para o cálculo a função de autocorrelação angular, parte-se do modelo de Kratky-Porod (3.2)

$$\mathcal{E}_{KP} = -\frac{B}{b} \sum_{i=1}^N \hat{t}_i \cdot \hat{t}_{i-1} = -\frac{B}{b} \sum_{i=1}^N \cos \theta_i$$

Queremos calcular $\langle \hat{t}_i \cdot \hat{t}_j \rangle$. Para isto, é necessário o cálculo da função Z de partição de \mathcal{E}_{KP} .

$$Z = \sum_i e^{-E_i/k_B T}, \quad (\text{A.1})$$

onde o somatório é feito sobre todas as configurações do sistema.

Nesse caso, essa expressão se escreve

$$Z = \int \frac{d\Omega_0}{4\pi} \int \frac{d\Omega_1}{4\pi} \dots \int \frac{d\Omega_N}{4\pi} e^{\eta \sum_{i=1}^N \cos \theta_i}, \quad (\text{A.2})$$

onde definimos $\eta = B/bk_B T$.

Essa expressão é análoga à função partição de uma cadeia linear de spins. De fato todo o procedimento para o cálculo da função de autocorrelação é análogo ao utilizado para tal sistema de spins [18].

A função partição pode ser reescrita

$$Z = \left[\frac{1}{2} \int_0^\pi d\theta \sin \theta e^{\eta \cos \theta} \right]^N.$$

Efetuada a integração temos que

$$Z = \left[\frac{\sinh \eta}{\eta} \right]^N. \quad (\text{A.3})$$

Podemos, agora, calcular a correlação angular. Para isto, consideremos a correlação entre pares distanciados de um intervalo l na cadeia polimérica $W(l) = \langle \hat{t}_i \cdot \hat{t}_{i+l} \rangle$. Sem perda de generalidade, podemos escrever

$$W(l) = \langle \hat{t}_0 \cdot \hat{t}_l \rangle. \quad (\text{A.4})$$

Mas

$$\langle \hat{t}_0 \cdot \hat{t}_l \rangle = \langle t_0^x t_l^x \rangle + \langle t_0^y t_l^y \rangle + \langle t_0^z t_l^z \rangle \quad (\text{A.5})$$

em um referencial determinado. Como os vetores \hat{t} podem assumir qualquer posição aleatória, podemos escrever

$$\langle t_0^x t_l^x \rangle = \langle t_0^y t_l^y \rangle = \langle t_0^z t_l^z \rangle, \quad (\text{A.6})$$

donde

$$W(l) = \langle \hat{t}_0 \cdot \hat{t}_l \rangle = 3 \langle t_0^z t_l^z \rangle. \quad (\text{A.7})$$

Calculando $W(1)$, temos

$$W(l) = \frac{3}{Z} \int \frac{d\Omega_0}{4\pi} \int \frac{d\Omega_1}{4\pi} \dots \int \frac{d\Omega_N}{4\pi} t_0^z \cdot t_l^z e^{\eta \sum_{i=1}^N \cos \theta_i}, \quad (\text{A.8})$$

que pode ser reescrita

$$\begin{aligned} W(l) &= \frac{3}{Z} \int \frac{d\Omega_0}{4\pi} \int \frac{d\Omega_l}{4\pi} t_0^z \cdot t_l^z e^{\eta \cos \theta_l} \times \\ &\times \int \frac{d\Omega_1}{4\pi} \dots \int \frac{d\Omega_{l-1}}{4\pi} e^{\eta \sum_{i=1}^{l-2} \cos \theta_i} \times \\ &\times \int \frac{d\Omega_{l+1}}{4\pi} \dots \int \frac{d\Omega_N}{4\pi} e^{\eta \sum_{i=l+1}^N \cos \theta_i}. \end{aligned}$$

As integrais que aparecem aqui são do mesmo tipo que encontramos no cálculo da função partição, e podemos simplificar a expressão acima. Obtemos

$$W(l) = 3 \frac{\eta}{\sinh \eta} \int \frac{d\Omega_0}{4\pi} \int \frac{d\Omega_l}{4\pi} t_0^z \cdot t_l^z e^{\eta \cos \theta_l}. \quad (\text{A.9})$$

Para avançarmos no cálculo, é preciso definir algum referencial onde calcularemos explicitamente o produto interno $\hat{t}_0 \cdot \hat{t}_l$. Consideremos um referencial fixo, que denominaremos referencial S_L , do laboratório. Nesse referencial

$$\hat{t}_0(S_L) = (\sin \Theta_0 \cos \Phi_0, \sin \Theta_0 \sin \Phi_0, \cos \Theta_0). \quad (\text{A.10})$$

$$\hat{t}_l(S_L) = (\sin \Theta_l \cos \Phi_l, \sin \Theta_l \sin \Phi_l, \cos \Theta_l). \quad (\text{A.11})$$

Substituindo o produto das componentes z calculado nesse referencial em A.9, obtemos $W(l)$

$$W(l) = 3 \frac{\eta}{\sinh \eta} \int \int \frac{d\Omega_0}{4\pi} \frac{d\Omega_l}{4\pi} \cos \Theta_0 \cos \Theta_l e^{\eta \cos \theta_l}. \quad (\text{A.12})$$

Podemos também definir \hat{t}_l no referencial utilizado para definir o ângulo θ_i no modelo de Kratky-Porod. Recordemos que este referencial é definido, para cada vetor \hat{t}_i de orientação da cadeia, como aquele em que o eixo z coincide com o vetor \hat{t}_{i-1} . Chamaremos esse referencial de S_{i-1} . Em particular, o vetor \hat{t}_l , escrito no referencial S_{l-1} , fica

$$\hat{t}_l = (\sin \theta_l \cos \phi_l, \sin \theta_l \sin \phi_l, \cos \theta_l). \quad (\text{A.13})$$

É útil encontrarmos uma relação entre as variáveis nos referenciais S_L e S_{l-1} . Podemos fazê-lo encontrando como \hat{t}_l se escreve no referencial do laboratório dado que esse vetor se expressa, em S_{l-1} , na forma descrita em (A.13). Para isto, podemos escolher o referencial do laboratório de modo a que Φ_{l-1} seja nulo. Isto simplifica os cálculos, pois, dessa forma, S_L e S_{l-1} ficam relacionados através de uma rotação no plano xz (Figura A.1).

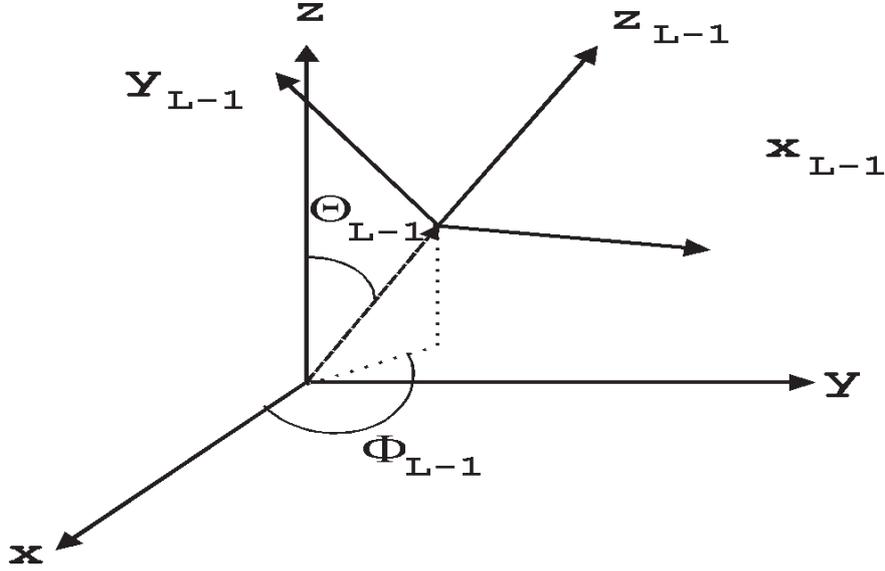


Figura A.1: Sistemas de referência para o cálculo da correlação angular. Sistema XYZ : referencial S_L do laboratório; referencial $X_{l-1}Y_{l-1}Z_{l-1}$: referencial S_{l-1} para o vetor \hat{t}_l definido pelo vetor de orientação \hat{t}_{l-1} .

$$\hat{t}_l(S_L) = R\hat{t}_l(S_{l-1}), \quad (\text{A.14})$$

onde

$$R = \begin{pmatrix} \cos \Theta_{l-1} & 0 & -\sin \Theta_{l-1} \\ 0 & 1 & 0 \\ \sin \Theta_{l-1} & 0 & \cos \Theta_{l-1} \end{pmatrix}$$

Recordando que t_0 já foi dado em (A.10))

$$t_0^z t_l^z = \cos \Theta_0 (\cos \theta_l \cos \Theta_{l-1} + \sin \theta_l \cos \phi_l \cos \Theta_0) \quad (\text{A.15})$$

Introduzindo essa expressão em (A.8), temos, após algumas simplificações

$$W(l) = 3 \left(\frac{\eta}{\sinh \eta} \right)^2 \int \frac{d\Omega_0}{4\pi} \cos \Theta_0 \times \\ \times \int \frac{d\Omega_{l-1}}{4\pi} e^{\eta \cos \theta_{l-1}} \left(\cos \Theta_{l-1} \int \frac{d\Omega_l}{4\pi} \cos \theta_l e^{\eta \cos \theta_l} + \sin \Theta_{l-1} \int \frac{d\Omega_l}{4\pi} \sin \theta_l \cos \phi_l e^{\eta \cos \theta_l} \right).$$

O segundo termo da soma entre parênteses é nulo pois $\int_0^{2\pi} \cos \phi_l d\phi_l = 0$.

$$W(l) = 3 \left(\frac{\eta}{\sinh \eta} \right)^2 \int \int \frac{d\Omega_0}{4\pi} \frac{d\Omega_{l-1}}{4\pi} \cos \Theta_0 \cos \Theta_{l-1} e^{\eta \cos \theta_{l-1}} \int \frac{d\Omega_l}{4\pi} \cos \theta_l e^{\eta \cos \theta_l}. \quad (\text{A.16})$$

Resolvendo a integral em Ω_l , temos

$$W(l) = 3 \left(\frac{\eta}{\sinh \eta} \right) \left(\coth \eta - \frac{1}{\eta} \right) \int \int \frac{d\Omega_0}{4\pi} \frac{d\Omega_{l-1}}{4\pi} \cos \Theta_0 \cos \Theta_{l-1} e^{\eta \cos \theta_{l-1}}. \quad (\text{A.17})$$

Comparando (A.17) com (A.12), podemos escrever

$$W(l) = \left(\coth \eta - \frac{1}{\eta} \right) W(l-1). \quad (\text{A.18})$$

Dessa relação de recorrência, temos que

$$\begin{aligned} W(0) &= 1 \\ W(1) &= u(\eta) \\ W(2) &= u^2(\eta) \\ &\vdots \\ W(l) &= u^l(\eta) \end{aligned}$$

onde fizemos $u(\eta) = \coth \eta - \frac{1}{\eta}$.

Impondo a condição

$$\eta \gg 1 \quad (\text{A.19})$$

(que ficará clara adiante), $u^l(\eta) \approx 1 - l/\eta$, donde temos que $\ln W(l) = l \ln(1 - 1/\eta)$. Para $\eta \gg 1$, é válida a aproximação $\ln(1 - 1/\eta) \approx -1/\eta$. Assim, podemos escrever

$$\ln W(l) = -l/\eta.$$

$$W(l) = e^{-l/\eta}.$$

Mas $l = |i - j|$, donde podemos escrever

$$\langle \hat{t}_i \cdot \hat{t}_j \rangle = e^{-\frac{|i-j|b}{B/k_B T}} \quad (\text{A.20})$$

O comprimento de persistência A é definido, para uma cadeia polimérica de $N + 1$ segmentos de comprimento b , como

$$A = \left\langle \hat{t}_0 \cdot \sum_{i=1}^N b \hat{t}_i \right\rangle. \quad (\text{A.21})$$

Isto é, o comprimento de persistência se relaciona à fração da extensão da cadeia que permanece na mesma direção do segmento inicial da cadeia.

Podemos escrever

$$A = b \sum_{i=1}^N \langle \hat{t}_0 \cdot \hat{t}_i \rangle = b \sum_{i=1}^N e^{-\frac{ib}{B/k_B T}}$$

Considerando uma cadeia com um número grande de segmentos, podemos aproximar o somatório por uma integral de fácil resolução

$$A = \int_0^L e^{-\frac{1}{B/k_B T} x} dx = -\frac{B}{k_B T} \left(e^{-\frac{L}{B/k_B T}} - 1 \right)$$

No limite de N grande, $e^{-\frac{L}{B/k_B T}} \ll 1$ e temos

$$A = \frac{B}{k_B T} \quad (\text{A.22})$$

então, podemos escrever finalmente

$$\langle \hat{t}_i \cdot \hat{t}_j \rangle = e^{-\frac{|i-j|b}{A}} \quad (\text{A.23})$$

Podemos, agora, justificar a condição (A.19), $\eta \gg 1$. Essa condição significa que o comprimento b dos segmentos da cadeia polimérica é muito menor que o comprimento A de persistência da cadeia, refletindo a rigidez dos monômeros e o fato de que a cadeia de Kratky-Porod só pode dobrar-se nas juntas entre os segmentos.

Apêndice B

Cálculo de $\langle R^2 \rangle$ na Configuração de Equilíbrio

A distância entre as extremidades do polímero pode ser escrita como

$$R = b \sum_{i=0}^N \hat{t}_i. \quad (\text{B.1})$$

donde

$$\langle R^2 \rangle = b^2 \sum_{i,j=0}^N \langle \hat{t}_i \cdot \hat{t}_j \rangle \quad (\text{B.2})$$

$$\langle R^2 \rangle = b^2 \sum_{i,j=0}^N e^{-b\frac{|i-j|}{A}} = b^2 \sum_{i=0}^N \left[\sum_{j=0}^i e^{-b\frac{(i-j)}{A}} + \sum_{j=i+1}^N e^{-b\frac{(j-i)}{A}} \right].$$

No limite contínuo, $N \rightarrow \infty$ e $b \rightarrow 0$, de modo a que $Nb = L$. Nessa condição, podemos transformar os somatórios em integrais.

$$\langle R^2 \rangle = \int_0^L dx \left[e^{-\frac{x}{A}} \int_0^x e^{\frac{y}{A}} dy + e^{\frac{x}{A}} \int_x^L e^{-\frac{y}{A}} dy \right].$$

$$\langle R^2 \rangle = 2AL - 2A^2 \left(1 - e^{-\frac{L}{A}} \right). \quad (\text{B.3})$$

Se $L \gg A$, $e^{-L/A} \rightarrow 0$ e temos

$$\langle R^2 \rangle \approx 2AL - 2A^2 = 2AL \left(1 - \frac{A}{L}\right) \approx 2AL. \quad (\text{B.4})$$

Por outro lado, se $L \ll A$, $e^{-L/A} \approx 1 - L/A + L^2/2A^2 + \mathcal{O}\left(\frac{L}{A}\right)^3$ e

$$\langle R^2 \rangle \approx L^2. \quad (\text{B.5})$$