



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 316 285**

② Número de solicitud: 200701859

⑤ Int. Cl.:
G01Q 60/24 (2010.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **02.07.2007**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.04.2009**

Fecha de la concesión: **18.01.2010**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **29.01.2010**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
29.01.2010

⑰ Titular/es: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas** (Titular al 51 %)
c/ Serrano, nº 142
28006 Madrid, ES
Universidad Autónoma de Madrid (Titular al 49 %)

⑱ Inventor/es: **Carrión Vázquez, Mariano Sixto;**
Valbuena Jiménez, Alejandro y
Gómez Herrero, Julio

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

④ Título: **Dispositivo interfase digital para la integración del modo de imagen en espectroscopio de fuerza monomolecular.**

⑦ Resumen:

Dispositivo interfase digital para la integración del modo de imagen en espectroscopio de fuerza monomolecular. Cuenta con un cabezal de detección de AFM (4) conectado a un controlador de espectroscopia (9) que se une a una tarjeta de obtención de datos (10) instalada en un ordenador (11) unido a un bloque procesador DSP (12) que conecta con un bloque de conversión DAC-ADC (13). La muestra a analizar (1) se monta en un elemento oscilante (2) colocado sobre un posicionador 3D (3) empujado por un motor y unido a un sensor de posición (8) con sensores en tres direcciones. Un controlador de imagen (7) conecta con la tarjeta (10), el bloque de conversión (13), el sensor de posición (8), el posicionador (3), el elemento oscilante (2), el cabezal de detección (4) y el controlador de espectroscopia (9), facilitando el conexionado una caja integradora. El cabezal de detección (4) se ubica en la parte superior de una mesa antivibraciones.

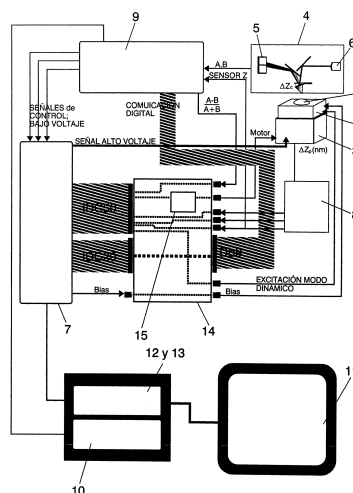


FIG. 1

ES 2 316 285 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Dispositivo interfase digital para la integración del modo de imagen en espectroscopio de fuerza monomolecular.

5 Objeto de la invención

La presente invención, tal y como se expresa en el enunciado de esta memoria descriptiva, se refiere a un dispositivo interfase digital para la integración del modo de imagen en la espectroscopia de fuerza monomolecular, cuya finalidad esencial consiste en proporcionar una herramienta sencilla, fiable, estable y de fácil implementación con la característica novedosa de añadir capacidades de formación de imágenes a un procedimiento standard muy usado en nanomecánica de proteínas. Dicha herramienta o instrumento se consigue básicamente mediante la interconexión de un controlador de imagen y otros bloques funcionales electrónicos a un microscopio de fuerza atómica (AFM, de sus siglas en inglés) y con determinados programas informáticos. El instrumento resultante combina las potentes capacidades de la última generación de dispositivos de espectroscopia de fuerza con toda la variedad de modos de formación de imágenes disponibles: por contacto, dinámico y por saltos. Usando un sistema modelo de poliproteínas (dominio I27 de la titina) se demuestra la capacidad de formación de imágenes, nanoposicionamiento y medición de fuerza casi simultáneas del dispositivo de la invención.

En la mayoría de estudios sobre nanomecánica de proteínas (medición de sus propiedades mecánicas a escala atómica) se utiliza el microscopio de fuerza atómica (AFM) en su modalidad de medición de fuerzas, es decir actuando como espectroscopio de fuerzas. Mediante la presente invención se añade la capacidad de formación de imágenes al dispositivo AFM en su modalidad de espectroscopio de fuerza y se integran programas de análisis potentes y disponibles para ambas modalidades. Mediante el dispositivo de la invención, único en su género es posible lograr un análisis de espectroscopia de fuerza y la formación de imágenes para moléculas individuales de manera casi simultánea y con una alta resolución.

Además, mediante la herramienta proporcionada por el dispositivo de la invención se pretende facilitar el desarrollo de un sistema de funcionalización universal muy necesario para permitir un mejor control de la muestra y una eficacia mejorada de inmovilización de proteínas necesaria para realizar los análisis con AFM.

30 Antecedentes de la invención

El microscopio de fuerza atómica (AFM) es un aparato que permite medir propiedades mecánicas de los materiales con resolución atómica [1]. La principal aplicación de este instrumento en biología ha sido la formación de imágenes superficiales a alta resolución de estructuras biológicas en su entorno acuoso natural [2]. Además, de esto se puede obtener información mecánica importante de la muestra usando el AFM en la denominada configuración de espectroscopia de fuerza [3].

El fundamento básico del AFM es la medición de la deflexión de un fleje a través de un láser reflejado en la superficie de este fleje a la vez que se desplaza la muestra a analizar en las tres direcciones del espacio (gracias a la actuación de un posicionador piezo-eléctrico) para lograr así la interacción de la punta fina del fleje con la muestra en las tres dimensiones. La deflexión de este fleje o sensor se detecta a través de la medida en el voltaje de un fotodiodo dual, de manera que cuando el fleje está en equilibrio la cantidad de luz sobre las dos partes del fotodiodo es la misma y la fuerza (diferencia de voltaje generador en cada sector del fotodiodo) será 0. La interacción de la punta del fleje con la superficie de la molécula hace que el mismo se flexiona, provocando que el fotodiodo detecte más luz en un sector que en otro. De esta manera se obtiene una señal en voltaje que está relacionada con la fuerza ejercida en la punta por la muestra bajo estudio. Otra parte básica de un microscopio de fuerzas es la señal de alto voltaje enviada a un posicionador piezo-eléctrico para mover la muestra bajo la punta y poder escanear la superficie. Por su parte, en un microscopio de fuerzas convencional la unidad generadora de alto voltaje que envía las señales al posicionador piezo-eléctrico y el controlador de dicho posicionador pueden encontrarse integrados en un mismo bloque o no. Así, por ejemplo el sistema de control Dulcinea (Nanotec Electrónica, S.L.) integra ambos elementos, mientras el sistema inicial desde el que se ha desarrollado la presente invención [7], mantenía ambos elementos separados, en este caso una controladora JRC Instruments y un amplificador de alto voltaje de Physik Instruments. El último componente básico es un ordenador provisto de tarjetas de adquisición de datos y de un software específico para procesar digitalmente las señales de la fuerza normal (la proveniente del fotodiodo) y las rampas que van al amplificador y después al piezoeléctrico. Este procesado permite representar los datos en bruto (espectro de fuerzas) o visualizar la topografía de la muestra como una imagen.

Puesto que el AFM estaba originalmente diseñado para registrar curvas de fuerza-extensión incluye un único posicionador piezoeléctrico, por lo que la tecnología más avanzada en el campo de los “espectrómetros de fuerza” se basa en el diseño “por encargo” de AFMs especializados en la extensión de las moléculas en una única dimensión, lo que permite su análisis individual [4].

En esta denominada modalidad de espectroscopia de fuerza de moléculas individuales (SMFS, de sus siglas en inglés), el AFM es capaz de medir fuerzas con una sensibilidad de decenas de piconewtons y cambios de longitud en las moléculas con resolución nanométrica, en una escala de tiempo en el rango de milisegundos. Estos instrumentos han permitido el análisis de eventos de despliegue y repliegue de moléculas individuales en proteínas modulares [5] y, con el uso de poliproteínas recombinantes (que permiten una identificación clara de moléculas individuales), en

módulos proteicos individuales [6] así como en proteínas no modulares. Por consiguiente, la aplicación de la SMFS al estudio de las proteínas se ha extendido rápidamente de manera que ha surgido un nuevo campo de investigación, denominado “nanomecánica de proteínas”. Es evidente sin embargo que estos avances también tienen potencial en el análisis de moléculas no proteicas, por lo que podríamos hablar de nanomecánica molecular.

Tras sus primeras aplicaciones al estudio de las proteínas [5, 6] la SMFS ha evolucionado gracias a una segunda generación de instrumentos que incorpora un posicionador 3D compacto con resolución subnanométrica (aproximadamente 0,5 nm), el modo de fuerza constante y un potente software, permitiendo funcionalidades tales como el funcionamiento semiautomático, el reconocimiento automático de patrones periódicos de poliproteínas y el establecimiento de protocolos específicos para despliegue y repliegue de proteínas. Estas características y funciones se han integrado actualmente mediante un paquete de software específico basado en IGRO Pro, que es de acceso público [7]. Si bien no existe propiamente un dispositivo para SMFS con estas características en el mercado, si lo están todos sus componentes, de manera que diversos grupos ya han establecido esta configuración de manera satisfactoria [8, 9, 10, 11].

Actualmente los análisis de tipo SMFS deben afrontar tres importantes restricciones: la falta de conocimiento del estado inicial de la muestra antes del experimento, la aleatoriedad en la “recogida” o selección de moléculas para cada observación y el que esta “recogida” tenga una eficacia reducida, pues a menudo no es posible seleccionar moléculas individuales. Asimismo, debe tomarse en consideración que, tras la inmovilización sobre una superficie, necesaria para su análisis mediante el AFM, las moléculas biológicas, y en particular las proteínas pueden desnaturalizarse en cierto grado [12]. Por lo tanto, en un experimento de SMFS normal, la muestra (generalmente una proteína purificada por cromatografía de afinidad) puede estar constituida por una población heterogénea de especies moleculares, que incluye moléculas individuales (nativas, parcialmente desnaturalizadas, completamente desnaturalizadas y plegadas incorrectamente), complejos supramoleculares, agregados y moléculas contaminantes. Si bien el uso de poliproteínas (en las que una única molécula proteica incluye diversas proteínas con funcionalidades individuales) es muy útil para realizar análisis de módulos proteicos individuales e inferir la identificación de moléculas individuales, su uso no siempre puede excluir todas estas posibles fuentes de error.

Para reducir estas limitaciones, la formación de imágenes por AFM de la muestra antes de la SMFS sería de suma importancia para caracterizar la muestra antes y después de llevar a cabo el análisis de espectroscopia de fuerza [4]. De este modo, se podrían elegir moléculas individuales u otras especies y analizarlas selectivamente. Además, el hecho de poder controlar la muestra de este modo también nos permitiría desarrollar en el futuro procedimientos de inmovilización inocuos, que preservaran mejor la conformación proteica y optimizaran la eficacia de la espectroscopia. Con el estado de la técnica actual apenas es posible realizar análisis de SMFS y lograr imágenes de forma casi simultánea, limitándose los mismos al estudio de algunos sistemas muy específicos, tales como la bacteriorodopsina [13]. Por otra parte, generalmente dichos análisis tampoco se realizan en la misma muestra ni en las mismas condiciones [14], lo que se debe a dos razones fundamentales: a) las proteínas son materiales “blandos” de los que resulta difícil obtener imágenes por AFM (por ello la bacteriorodopsina, capaz de formar cristales rígidos en 2D, sí es objeto de análisis SMFS/formación de imágenes), b) se debe establecer un compromiso en las condiciones de experimentación, dado que los requisitos para la SMFS y para la formación de imágenes son diferentes. Así, la SMFS requiere cobertura proteica relativamente elevada (para prevenir la desnaturalización [14] o simplemente aumentar la probabilidad de recoger moléculas nativas), acoplamiento débil de toda la molécula al sustrato (normalmente oro), y sensores mecánicos (“cantilevers”) “flexibles”. Por el contrario, la formación de imágenes requiere menor cobertura proteica, fuerte acoplamiento de toda la molécula al sustrato (normalmente mica) y “cantilevers” de alta frecuencia de resonancia (generalmente rígidos).

En resumen, actualmente existen sistemas no comerciales que permiten realizar SMFS con una serie de funcionalidades avanzadas [7] y por otra parte sistemas para la generación de imágenes [15], y aunque las dos modalidades puedan realizarse con el mismo AFM, la falta de un dispositivo y un sistema de integración de ambas no permite su realización cuasi-simultánea. La presente invención responde a esta necesidad de integración mediante una interfaz física (o “caja integradora”) que posibilita y estandariza el conexionado de las tres electrónicas utilizadas para controlar microscopios de fuerzas atómicas, encargadas respectivamente del control del sensor, del posicionador de la muestra y de la unidad que envía las señales al mismo. Asimismo se ha desarrollado un software específico (basado en IgorPro, de Wavemetrics y en WSxM de Nanotec Electrónica) y se ha añadido un motor al posicionador, comandado por el WSxM.

Bibliografía

1. **Binnig, G., Quate, C.F. & Gerber, C.** Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.* **56**, 930-933 (1986).
2. **Burnham, N.A., & Colton, R.J.** Measuring the nanomechanical properties and surface of materials using an atomic force microscope. *J. Sci. Technol. A* **7**, 2906-2913 (1989).
3. **Bustamante, C., Rivetti, C., Keller, D.J.** Scanning force microscopy under aqueous solutions. *Curr. Opin. Str. Biol.* **7**, 709-716 (1997).
4. **Carrion-Vazquez, M., Oberhauser, A.F., Diez, H., Hervas, R., Oroz, J., Fernandez, J., & Martinez-Martin, D.** Protein nanomechanics, as studied by AFM Single-Molecule Force Spectroscopy. In: Arrondo, J.L.R. and Alonso, A (eds.) *Advanced Techniques in Biophysics*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. pp 163-245 (2006).

5. Rief, M., Gautel, M., Oesterhelt, F., Fernández, J.M. & Gaub, H.E. Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM. *Science* **276**, 1109-1112 (1997).
6. Carrión-Vazquez, M., Oberhauser, A.F., Fowler, S.B., Marszalek, P.E., Broedel, S.E., Clarke, J., & Fernandez, J.M. Mechanical and chemical unfolding of a single protein: a comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 3694-3699 (1999).
7. Schlierf, M., Li, H. & Fernández, J.M. (2004). The unfolding kinetics of ubiquitin captured with single-molecule force-clamp techniques. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 7299-7304.
8. Qian, F., Wei, W., Germino, G., Oberhauser, A (2005). The nanomechanics of polycystin-1 extracellular region. *J. Biol. Chem.* **280**, 40723-40730.
9. Leake, M.C., Grutzner, A., Kruger, M., Linke, W.A. (2006). Mechanical properties of cardiac titin's N2B-region by single-molecule atomic force spectroscopy. *J. Struct. Biol.* **155**, 263-272.
10. Sharma, D., Chao, Y., Li, H. (2006) Engineering proteins with novel mechanical properties by recombination of protein fragments. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **45**, 1-7.
11. Wilcox, A.J., Choy, J., Bustamante, C. and Matouschek, A. (2005). Effect of protein structure on mitochondrial import. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 15435-15440.
12. Gray, J.J. (2004). The interaction of proteins with solid surfaces. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**, 110-115.
13. Frederix, P.L., Akiyama, T., Staufer, U., Gerber, Ch., Fotiadis, D., Müller, D.J., Engel, A. (2003). Atomic force bio-analytics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7**, 641-647.
14. Meadows, P.Y., Bemis, J.E., Walker, G.C. (2003). Single-molecule force spectroscopy of isolated and aggregated fibronectin proteins on negatively charged surfaces in aqueous liquids. *Langmuir* **19**, 9566-9572.
15. Moreno-Herrero, F., Colchero, J., Gomez-Herrero, J., Baro, A.M. (2004). Atomic force microscopy contact, tapping and jumping modes for imaging biological samples in liquids. *Phys. Revs. E* **69**, 031915-9.
16. Steward A, Toca-Herrea JL, Clarke J. (2002). Versatile cloning system for construction of multimeric proteins for use in atomic force microscopy. *Protein Sci.* **11**, 2179-2183.
17. Hinterdorfer, P. & Dufréne, Y.F. (2006). Detection and localization of single molecular recognition events using atomic force microscopy. *Nat. Methods* **3**, 347-355.
18. Li, H., Oberhauser, A.F., Redick, S.D. Carrion-Vazquez, M., Ericson, H.P. and Fernandez, J.M. (2001). Multiple conformations of PEVK proteins detected by single molecule techniques. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 10682-10686.

Descripción de la invención

Para lograr los objetivos y evitar los inconvenientes indicados en anteriores apartados, la invención consiste en un dispositivo interfase digital para la integración cuasi- simultánea del modo de formación de imagen con el de espectroscopia de fuerzas monomolecular durante el análisis mediante microscopia de fuerza atómica. La invención parte de una configuración descrita previamente [7], de la que se ha eliminado la unidad de alto voltaje y a la que como principales novedades se le ha añadido una controladora modular que lleva acoplada un software para formación de imagen (por lo que el sistema queda con dos controladoras para cada uno de los modos posibles: espectroscopia de fuerzas y formación de imagen), una "caja integradora" (para que las electrónicas de ambas controladoras puedan actuar sobre la parte mecánica del AFM: el cabezal del microscopio y el posicionador piezoeléctrico), sensores capacitivos en tres direcciones para conocer con gran precisión la posición del piezoeléctrico y poder hacer correcciones de linearización del desplazamiento del mismo, un pequeño piezoeléctrico que hace oscilar la muestra para poder obtener imágenes en el modo dinámico, y un motor acoplado a un tornillo micrométrico que empuja al conjunto del piezoeléctrico (incluido su soporte) para facilitar y automatizar la aproximación entre la punta y la muestra.

En su conjunto el cabezal de detección del microscopio de fuerza atómica se conecta con un controlador de la función de espectroscopia de fuerza unido a una o más tarjetas de obtención de datos. Dichas tarjetas se encuentran instaladas en un ordenador unido a un bloque procesador de señal digital (DSP) que conecta con un bloque de conversión digital-analógico/análogo-digital. Por su parte, la muestra a analizar se dispone sobre un elemento piezoeléctrico oscilante que se coloca en la parte superior del posicionador piezo-eléctrico 3D, conectándose este posicionador a un sensor de posición. Se incluye además un controlador de imagen que conecta con la tarjeta de obtención de datos, con el bloque de conversión y con el sensor de posición. Este controlador de imagen conecta asimismo con el posicionador 3D, con el elemento oscilante y con el cabezal de detección; existiendo también conexiones entre este controlador de imagen y el del modo de espectroscopia de fuerzas. Por último, el cabezal de detección se dispone en la parte superior de una mesa de aislamiento de vibraciones.

ES 2 316 285 B1

Según la realización preferente de la invención, el cabezal de detección es un cabezal multimodo de AFM, fotodetector de cuatro cuadrantes que se utiliza como fotodetector de dos semicírculos en el dispositivo de la invención.

5 Por otra parte, en esa realización preferente de la invención, en el cabezal de detección el sistema láser original se encuentra sustituido por un sistema de haces láser más estrecho y más estable.

Además, en la realización preferente de la invención, el posicionador piezo-eléctrico 3D es un posicionador piezo-eléctrico de bucle cerrado de varios ejes equipado con un sensor capacitivo rápido de la posición del accionador que permite una resolución subnanométrica.

10 En esa realización preferente de la invención, el controlador de imagen incluye amplificadores de alto voltaje cuya entrada consiste exclusivamente en la salida analógica de los DACs (convertidores de señal digital a analógica) del bloque de conversión; mientras que las señales analógicas que genera la tarjeta de obtención de datos son digitalizadas antes de ser tenidas en cuenta por el bloque procesador DSP.

15 Por otra parte, según la realización preferente de la invención, los movimientos piezo-eléctricos del elemento oscilante están codirigidos por el controlador del modo espectroscopia de fuerza y por el controlador de imagen; introduciéndose las señales de bajo voltaje de la tarjeta de obtención de datos en el bloque procesador DSP a través de tres canales diferentes del convertidor analógico-digital (ADC) del bloque de conversión.

20 Además, en la realización preferente de la invención, en el elemento piezo-eléctrico oscilante se incluyen sensores capacitivos en tres direcciones que posibilitan una gran precisión en conocimientos de posiciones y correcciones de linearización en desplazamientos.

25 Según la realización preferente de la invención, en el posicionador 3D se incluye un motor acoplado a un tornillo micrométrico que empuja al conjunto posicionador-elemento oscilante-muestra, facilitando y automatizando aproximaciones entre el cabezal de detección y la muestra.

30 En la realización preferente de la invención, el elemento oscilante incluye unas bias que posibilitan experimentos con potenciales en superficie, medidas de corriente, electroquímica y otros.

También, según una realización preferente, el dispositivo de la invención incluye una caja integradora que canaliza y ordena el conexionado entre diversos bloques del dispositivo.

35 Con la estructura que se ha descrito, el dispositivo de la invención presenta la principal ventaja de que permite añadir capacidades de formación de imágenes a la modalidad de espectroscopia de fuerza del AFM standard, permitiendo una espectroscopia de fuerza/formación de imágenes casi simultáneas y de alta resolución, especialmente aplicable a poliproteínas individuales en solución acuosa. El instrumento resultante de la invención combina las potentes capacidades de la última generación de dispositivos de espectroscopia de fuerza de AFM con toda la variedad
40 de modos de formación de imágenes disponibles: por contacto, dinámico y por saltos. La capacidad de representar en imágenes moléculas individuales antes de su análisis nanomecánico mediante el dispositivo de la invención permite la elección selectiva de moléculas específicas o de otras especies moleculares presentes en la muestra, abriendo las puertas a estudios sistemáticos sobre sistemas de funcionalización para SMFS de proteínas que buscan un procedimiento universal de funcionalización todavía inexistente que, reduciendo la desnaturalización provocada por inmovilización
45 y mejorando el anclaje de la molécula tanto al sustrato como a la punta, aumentaría el porcentaje de éxito y el control de la muestra en este tipo de experimentos. Disponiendo de una herramienta como la facilitada por el dispositivo de la presente invención, la estrategia de poliproteínas como indicadores de moléculas individuales para SMFS puede resultar innecesaria, dado que los topogramas serían un modo directo de identificarlas.

50 A continuación, para facilitar una mejor comprensión de esta memoria descriptiva y formando parte integrante de la misma, se acompañan unas figuras en las que con carácter ilustrativo y no limitativo se ha representado el objeto de la invención.

Breve descripción de las figuras

55 Figura 1.- Representa un diagrama de bloques funcionales de un dispositivo interfase digital para la integración del modo de imagen en espectroscopio de fuerza monomolecular, realizado según la presente invención.

60 Figura 2.- Representa unas gráficas y fotografías de experimentos de AFM de control usando poliproteínas 127 y utilizando el dispositivo referido en la anterior figura 1; dividiéndose esta figura 2 en tres partes A, B y C correspondientes a registros normales usando SMFS standard (A) y caracterización topográfica del sustrato (B) y la muestra de proteína (C), siendo los recuadros perfiles de z tomados de las líneas que se indican en las correspondientes fotografías.

65 Figura 3.- Representa una espectroscopia de fuerza/formación de imágenes casi simultáneas de poliproteínas 127, empleando el dispositivo de la anterior figura 1, y estando dividida esta figura 3 en dos partes A y B correspondientes a pruebas de F-z en moléculas individuales (A), y SMFS formación de imágenes por AFM a elevada concentración de proteínas (aproximadamente igual a 0,5 mg/ml) (B).

Descripción de un ejemplo de realización de la invención

Seguidamente se realiza una descripción de un ejemplo de la invención haciendo referencia a la numeración adoptada en las figuras.

Así, el dispositivo interfase digital para la integración del modo de imagen en espectroscopio de fuerza monomolecular del presente ejemplo de la invención tiene un diagrama de bloques funcionales que puede verse en la figura 1, donde se distingue un cabezal de detección de AFM de vista superior 4 provisto de fotodiodo 5 y láser 6, aplicándose a una muestra 1 que se sitúa sobre un posicionador piezo-eléctrico con capacidad de movimiento tridimensional 3, constituyéndose hasta aquí una configuración convencional.

Contrariamente, los bloques 7 a 13 de esa figura 1, así como un elemento piezo-eléctrico oscilante 2 que se intercala entre la muestra 1 y el posicionador 3 determinan la configuración novedosa básica del dispositivo de la invención.

Dichos bloques 7 a 13 consisten en un controlador de dispositivo de espectroscopia de fuerza 9 conectado con el cabezal de detección 4 y con una o varias tarjetas de obtención de datos 10 que se instalan en un PC 11.

El PC 11 se encuentra unido a un bloque procesador de señal digital DSP 12 que conecta con un bloque de conversión digital-analógico/análogo-digital 13.

Por otra parte, el posicionador piezo-eléctrico 3 conecta con un sensor de posición 8, así como con un controlador de imagen 7 que también se encuentra unido a la tarjeta de obtención de datos 10, al bloque de conversión 13, al sensor de posición 8, al elemento oscilante 2, al cabezal de detección 4 y al controlador de dispositivo de espectroscopia de fuerza 9.

Una caja integradora 14 facilita el conexionado y permite que los controladores 7 y 9 puedan actuar sobre el cabezal 4 y sobre el posicionador 3. Esta caja 14 incluye además un buffer 15 para un motor acoplado a un tornillo micrométrico que se aplica al posicionador 3.

El cabezal de detección 4 se encuentra en la parte superior de una mesa de aislamiento de vibraciones que no se ha representado en la figura 1.

A continuación se describe con mayor detalle la conectividad y sincronización de los diversos componentes según el sistema del dispositivo del presente ejemplo de la invención:

Nuestro sistema se basa en un dispositivo de espectroscopia de fuerza de AFM estándar no comercial que se ha descrito previamente al que hemos añadido capacidades de formación de imágenes como sigue. La sección de espectroscopia de fuerza de AFM de este instrumento se construyó usando un cabezal de detección de AFM de vista superior (Cabezal multimodo de AFM: TVOH-MMAFMLN; Digital Instruments, Santa Barbara, CA, USA. Este fotodetector de 4 cuadrantes se usa como uno de 2 semicírculos en nuestro sistema), en el que el sistema láser original se sustituyó por un sistema de haces láser más estrecho y más estable (alimentación de energía SK9732C, colimador de diodo láser 50BM, acoplador de haces láser 60SMS-1-4-A8-07, cable de fibra monomodo SMC630-5-NA010-3APC-0-50, lente colimadora 60 FC-4-M12; Schäfter+ Kirchoff, Hamburgo, Alemania) y una pila líquida (FC, Digital Instruments, Santa Barbara, CA, USA). El cabezal de AFM se montó sobre la parte superior de un posicionador piezoeléctrico de bucle cerrado de varios ejes (PicoCube P-363.3CD, Physik Instrumente, Karlsruhe, Alemania) equipado con un sensor capacitivo rápido de la posición del accionador que permite una resolución subnanométrica (Servocontrolador-PZT E-509.C3A, Physik Instrumente, Waldbronn, Alemania). El controlador del dispositivo de espectroscopia de fuerzas de AFM, originalmente fabricado por encargo, está actualmente disponible en el mercado (JRC Instruments, Rochester, MN, USA). La obtención de datos para el experimento de espectroscopia de fuerzas se realiza por medio de tarjetas de obtención de datos instaladas en PC (PCI-6052E y PCI-6703, National Instruments, Austin, TX, USA), que reciben órdenes del software IGOR Pro fabricado por encargo (WaveMetrics, Lake Oswego, OR, USA) (disponible previa petición al Prof. Fernández de la Universidad de Columbia). La sección de formación de imágenes del AFM se añadió integrando un controlador de imagen (High Voltage Dulcinea, Nanotec Electrónica S.L., Madrid, España) combinado con una tarjeta de procesador de señal digital (tarjeta flotante de DSP M67 de Innovative Integration, Simi Valley, CA, USA) que recibe órdenes del software WSxM (software gratuito que se puede descargar en la página web de Nanotec Electrónica). A fin de implementar el modo dinámico de formación de imágenes por AFM también añadimos un elemento piezoeléctrico oscilante en la parte superior del posicionador piezoeléctrico 3D.

El software que se encarga de la sección de formación de imágenes, WSxM (Nanotec Electrónica S.L.), se puso en comunicación con el software IGOR Pro, que se encarga de la espectroscopia de fuerza. Los desplazamientos se miden usando los sensores capacitivos y las señales resultantes se envían simultáneamente a los controladores de formación de imágenes y de espectroscopia de fuerza. En el caso del WSxM, el protocolo de comunicación se ha grabado como un programa de litografía del usuario (incorporado ya al programa general). En el lado del dispositivo de espectroscopia de fuerza se ha añadido un pequeño protocolo de comunicación al software Igor Pro estándar (disponible previa petición).

Se debe señalar que la entrada de los amplificadores de alto voltaje es exclusivamente la salida de los DACs (Convertidor de Digital a Analógico) de 16 bits del DSP (Procesador de Señal Digital) y que las señales analógicas

ES 2 316 285 B1

que genera la tarjeta de adquisición que controla el software IGOR primero se digitalizan y, posteriormente, las tiene en cuenta el WSxM a través del software del DSP. Este procedimiento es fácil de implementar, fiable y mantiene un nivel bajo de ruido analógico en la salida del amplificador de alto voltaje.

5 El aparato de AFM se monta en la parte superior de una mesa de aislamiento de vibraciones (Nano-K 25BM-4, Minus K Technology, Inglewood, CA, USA. No se muestra).

Seguidamente se describe una experimentación realizada con el dispositivo de la figura 1, en la que se aportan gráficas y fotografías obtenidas, según se muestra en las figuras 2 y 3:

10

Respecto a la constante elástica del cantilever y preparación de la muestra cabe indicar que la muestra se montó sobre la celda líquida del microscopio de fuerza atómica fabricado por encargo para el prototipo del presente ejemplo de la invención. Para formación de imágenes por AFM se escaneó la muestra usando el modo dinámico (sistemas electrónicos de formación de imágenes y software WSxM de Nanotec). Se realizó la SMFS a una velocidad de estiramiento de 0,4 nm/ms usando los procedimientos disponibles para obtención de datos y análisis incluidos por encargo en el software IGOR Pro. La constante elástica, k_c , de cada punta individual de AFM (Fig. 2: punta de Si_3N_4 de NPS, Digital Instruments, Santa Barbara, CA, USA; Fig. 3: punta de Si_3N_4 de Budgetsensors®, Sofía, Bulgaria), que oscilaba entre 20 y 60 pN/nm, se calibró en solución, justo antes de cada experimento, usando el procedimiento térmico que se basa en el teorema de equiparación. Previamente, se centrifugaron soluciones de poliproteínas a 18,000 g durante 10 min a 20 4°C y, posteriormente, se clarificaron usando filtros Millex-GV de 0,22 μm (Millipore).

Las poliproteínas recombinantes que se usaron en nuestros experimentos (tanto de 8 unidades monoméricas como de 12 unidades monoméricas) se fabricaron con una secuencia marcadora de seis histidinas en el extremo N (para purificación por afinidad de metales) y una secuencia marcadora de dos cisteínas (para inmovilización covalente sobre superficies doradas: S-Au). La proteína se extrajo, purificó y almacenó en Solución Salina Tamponada con Fosfato (PBS) /DTT 5 mM/EDTA 0,2 mM, como se ha descrito en la bibliografía. Se permitió que las proteínas se adsorbieran sobre cubreobjetos con cobertura de oro alisada (Arrandee, Werther, Alemania: Fig. 3) o recién evaporada (Fig. 2B, C) de 15 minutos a toda la noche, a una concentración de $\sim 10 \mu\text{g/ml}$ (Fig. 2a) o $\sim 5 \mu\text{g/ml}$ (Fig. 2b).

El movimiento piezoeléctrico se comparte entre el controlador de formación de imágenes y el controlador del dispositivo de espectroscopia de fuerza como sigue: las señales de bajo voltaje de la tarjeta de obtención de datos que controla la aplicación Igor se introducen en el procesador de señal digital a través de 3 canales diferentes del ADC (Convertidor de Analógico a Digital) de 16 bits y, posteriormente, el WSxM combina sus señales propias de escaneado de bajo voltaje con las que llegan del sistema electrónico del dispositivo de espectroscopia de fuerza. Durante la formación de imágenes, las señales del dispositivo de espectroscopia de fuerza no cambian y las señales piezoeléctricas estándar, que genera el WSxM, regulan la imagen. Durante la espectroscopia de fuerza el bucle de realimentación z del WSxM se abre y las señales de bajo voltaje, que genera el sistema estándar de espectroscopia de fuerza, establecen la posición de z, permitiendo la obtención de una curva $F-z$ en el punto medio de la línea de escaneado actual.

40

A fin de probar e ilustrar las capacidades de este sistema elegimos una poliproteína I27, hecha del módulo de titina de corazón humano (un dominio globular de la inmunoglobulina), un sistema modelo que se ha convertido en estándar en especialidades campo. Se realizó la extracción y purificación de poliproteínas I27 recombinantes como se ha descrito en la bibliografía. Se calibró la constante elástica del cantilever en solución mediante un procedimiento térmico, que usaba ambas configuraciones (dispositivo de espectroscopia de fuerza y formación de imágenes), obteniendo valores que coincidían dentro de un error del 3%.

Las poliproteínas I27 (construcción con 8 unidades monoméricas) en solución, a una concentración normal para SMFS (es decir, $\sim 0,5 \text{ mg/ml}$) se inmovilizaron sobre un cubreobjetos con cobertura de oro recién evaporada. Posteriormente, llevamos a cabo un análisis habitual de SFMS en las condiciones normales. La muestra se acercó de manera aleatoria a la punta del cantilever para establecer un contacto mecánico y, posteriormente, se retrajo para obtener curvas $F-z$. Realizamos varios ciclos de acercamiento-retracción y obtuvimos típicas curvas de fuerza-extensión con un único patrón en diente de sierra (fuerza media de $198 \pm 30 \text{ pN}$, $n=184$) que se ajustó a una única familia de curvas en cadena de tipo gusano usando un único incremento de longitud de contorno de entre las mismas con un promedio de $27,6 \pm 0,6 \text{ nm}$ ($n=184$), en la Figura 2A se muestra un registro representativo). Como es habitual en estos experimentos, en función de la periodicidad del patrón en diente de sierra obtenido, se identificó *a posteriori* que algunas de dichas curvas se debían al alargamiento de una molécula individual (Los datos se presentan como media \pm s.e.m). Tanto la fuerza media como el aumento de longitud de contorno coincidían con los datos anteriores relativos a esta poliproteína.

60

Además, realizamos una formación de imágenes por AFM de la muestra usando el modo dinámico para caracterizar su topografía en estas condiciones. La Figura 2B muestra un topograma del sustrato sin protección, es decir, oro recién evaporado, mientras que la Figura 2C muestra el sustrato tras la incubación con poliproteínas que muestran estructuras granulares amontonadas, la mayoría de ellas con una altura no compatible con el hecho de que sean moléculas individuales (recuadros de las Figs. 2B, C; todas las imágenes de AFM están codificadas por tonalidades, en las que la más oscura es más profunda y la más clara es más alta). Por cuanto sabemos este es el primer informe de un topograma de poliproteínas.

65

Se realizó un análisis por AFM de espectroscopia de fuerza/formación de imágenes casi simultáneos usando una solución diluida de poliproteínas ($\sim 10 \mu\text{g/ml}$) a fin de obtener una distribución poco densa de moléculas en el sustrato. La muestra se colocó en la parte superior de un cubreobjetos con cobertura de oro que se trató mediante recocido a la llama para obtener soportes amplios atómicamente planos. Las imágenes dinámicas de AFM representaron estructuras granulares aisladas dispersas de manera aleatoria en el sustrato. La medición de la altura del grupo indicó que algunas eran compatibles con la altura esperada de una proteína individual (Fig. 3a). Seleccionamos dichas estructuras para el análisis de espectroscopia de fuerza y llevamos a cabo curvas de fuerza-extensión (F - z) en las mismas. A esta baja concentración de proteína obtuvimos curvas que mostraban una indentación de la punta similar a la altura medida de la molécula (Fig. 3a), pero tras muchas pruebas (>100) no pudimos obtener los patrones habituales en diente de sierra típicos de experimentos de SMFS.

Se obtuvieron resultados similares usando mica, un sustrato común para formación de imágenes por AFM (no se muestra). Para solucionar este problema incubamos el sustrato del AFM con una concentración mucho más elevada de poliproteína ($\sim 0,5 \text{ mg/ml}$, la concentración normal para experimentos de SFMS) y repetimos este análisis. Curiosamente, sólo pudimos obtener espectros de patrones en diente de sierra para imágenes de mala resolución que sugerían que antes de la formación de imágenes la punta estaba posiblemente contaminada con proteínas, probablemente captadas de la superficie. Más específicamente, tras una serie de pruebas (>20) sólo pudimos obtener varias curvas de fuerza-extensión a partir de la misma molécula individual de un grupo específico (fuerza media $F=220\pm 30$ pN, aumento de longitud de contorno $L_c=29\pm 3$ nm, $n=46$, Fig. 3b). En un experimento normal de SMFS se deben llevar a cabo miles de pruebas para obtener datos suficientes, dado que la eficacia de los registros de patrones en diente de sierra de la espectroscopia de fuerza suele ser reducida (normalmente inferior al 10% para las poliproteínas I27). Estos resultados sugieren que el factor limitante de la eficacia de nuestra SMFS puede ser adherencia punta-proteína. No obstante, no se debe descartar la desnaturalización de proteínas provocada por la superficie, como se ha descrito en la bibliografía.

En la figura 3-A se muestran pruebas de F - z en moléculas individuales. Se muestra la topografía derivada compensada de un cubreobjetos con cobertura de oro alisada sin protección (izquierda) y el mismo sustrato con poliproteína (I27)₁₂ a $\sim 10 \mu\text{g/ml}$ incubada toda la noche (derecha). Nuestro análisis se centró en supuestas moléculas individuales (círculo negro de la imagen derecha y perfil izquierdo, altura ~ 5 nm, indentación ~ 4 nm), pero no pudimos obtener ningún patrón en diente de sierra (trazo derecho). El apartado B de la figura 3 se refiere a SMFS/formación de imágenes por AFM a elevada concentración de proteínas ($\sim 0,5 \text{ mg/ml}$). A partir de un topograma vertical seleccionamos una partícula con dimensiones superiores a las esperadas para moléculas individuales (flecha verde, perfil que muestra la altura de ~ 11 nm). Pudimos realizar varios ciclos de acercamiento/repliegue de sustrato a punta F - z (derecha) y obtuvimos varios patrones en diente de sierra, que tras ajustar los máximos a una familia de curvas en cadena de tipo gusano (no se muestran), produjeron parámetros similares a los presentados previamente para módulos I27. Los topogramas verticales están codificados por colores de manera que el más oscuro es más profundo y el más claro es más alto. Es de esperar, según la física de los polímeros, que cada molécula de poliproteína (con 8 ó 12 monómeros globulares) en solución se enrolle. Las dimensiones globales de cada monómero, medidas a partir de su estructura atómica, son $3,4 \times 1,2 \times 0,8$ nm. En el caso de las 12 unidades monoméricas, la longitud (extendida) esperada de cada poliproteína medida mediante EM de sombreado rotatorio es de ~ 58 nm.

El dispositivo del presente ejemplo de la invención presenta además otras características de interés que se indican a continuación:

- Inclusión en el elemento piezo-eléctrico oscilante 2 de unos sensores capacitivos en tres direcciones que posibilitan una gran precisión en conocimientos de posiciones y correcciones de linearización en desplazamientos.
- Inclusión en el posicionador 3 de un motor acoplado a un tornillo micrométrico que empuja al conjunto posicionador 3-elemento oscilante 2-muestra 1, facilitando y automatizando aproximaciones entre el cabezal de detección 4 y la muestra 1.
- Inclusión en el elemento oscilante 2 de unas bias que posibilitan experimentos con potenciales en superficie, medidas de corriente, electroquímica y otros.
- E inclusión en el dispositivo de una caja integradora que canaliza y ordena el conexionado entre diversos bloques de dicho dispositivo.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo interfase digital para la integración del modo de imagen en espectroscopio de fuerza monomolecular, que cuenta con un cabezal de detección de AFM (microscopio de fuerza atómica) de vista superior (4) provisto de fotodiodo (5) y láser (6), y que se aplica a una muestra a analizar (1) ubicada en un posicionador piezo-eléctrico 3D (3); **caracterizado** porque dicho cabezal de detección (4) se conecta con un controlador de la función de espectroscopia de fuerza (9) unido a una o más tarjetas de obtención de datos (10) que se instalan en un ordenador (11) unido a un bloque procesador de señal digital (DSP) (12) que conecta con un bloque de conversión digital-analógico/analógico-digital (13); en tanto que la muestra a analizar (1) se dispone sobre un elemento piezo- eléctrico oscilante (2) que se coloca en la parte superior del posicionador piezo-eléctrico 3D (3) y que hace oscilar la muestra (1) para poder obtener imágenes en modo dinámico, empujando al posicionador (3) un motor acoplado a un tornillo micrométrico para facilitar y automatizar la aproximación entre la punta del cabezal (4) y la muestra (1); conectándose este posicionador (3) a un sensor de posición (8) que cuenta con sensores capacitivos en tres direcciones para conocer con gran precisión la posición del posicionador (3) y poder hacer correcciones de linearización del desplazamiento del mismo; incluyéndose además un controlador de imagen (7) que conecta con la tarjeta de obtención de datos (10), con el bloque de conversión (13) y con el sensor de posición (8); conectando además este controlador de imagen (7) con el posicionador 3D (3), con el elemento oscilante (2) y con el cabezal de detección (4); existiendo también conexiones entre este controlador de imagen (7) y el controlador de la función de espectroscopia de fuerza (9); facilitándose el conexionado mediante una caja integradora (14) que permite que las electrónicas de los dos controladores (7 y 9) puedan actuar sobre la parte mecánica del AFM consistente en el cabezal del microscopio (4) y el posicionador piezo-eléctrico (3); y disponiéndose el cabezal de detección (4) en la parte superior de una mesa de aislamiento de vibraciones.

2. Dispositivo interfase digital para la integración del modo de imagen en espectroscopio de fuerza monomolecular, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el cabezal de detección (4) es un cabezal multimodo de AFM, fotodetector de cuatro cuadrantes que se utiliza como fotodetector de dos semicírculos en el dispositivo.

3. Dispositivo interfase digital para la integración del modo de imagen en espectroscopio de fuerza monomolecular, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque en el cabezal de detección (4) el sistema láser original se encuentra sustituido por un sistema de haces láser más estrecho y más estable.

4. Dispositivo interfase digital para la integración del modo de imagen en espectroscopio de fuerza monomolecular, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el posicionador piezo-eléctrico 3D (3) es un posicionador piezo-eléctrico de bucle cerrado de varios ejes equipado con un sensor capacitivo rápido de la posición del accionador que permite una resolución subnanométrica.

5. Dispositivo interfase digital para la integración del modo de imagen en espectroscopio de fuerza monomolecular, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el controlador de imagen (7) incluye amplificadores de alto voltaje cuya entrada consiste exclusivamente en la salida analógica de los DACs del bloque de conversión (13); mientras que las señales analógicas que genera la tarjeta de obtención de datos (10) son digitalizadas antes de ser tenidas en cuenta por el bloque procesador (DSP) (12).

6. Dispositivo interfase digital para la integración del modo de imagen en espectroscopio de fuerza monomolecular, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque los movimientos piezo-eléctricos del elemento oscilante (2) están codirigidos por el controlador de la función de espectroscopia de fuerza (9) y por el controlador de imagen (7); introduciéndose las señales de bajo voltaje de la tarjeta de obtención de datos (10) en el bloque procesador (DSP) (12) a través de tres canales diferentes del convertidor analógico-digital ADC del bloque de conversión (13).

7. Dispositivo interfase digital para la integración del modo de imagen en espectroscopio de fuerza monomolecular, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el elemento oscilante (2) incluye unas bias que posibilitan experimentos con potenciales en superficie, medidas de corriente, electroquímica y otros.

8. Dispositivo interfase digital para la integración del modo de imagen en espectroscopio de fuerza monomolecular, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la referida caja integradora (14) incluye un buffer (15) para el aludido motor.

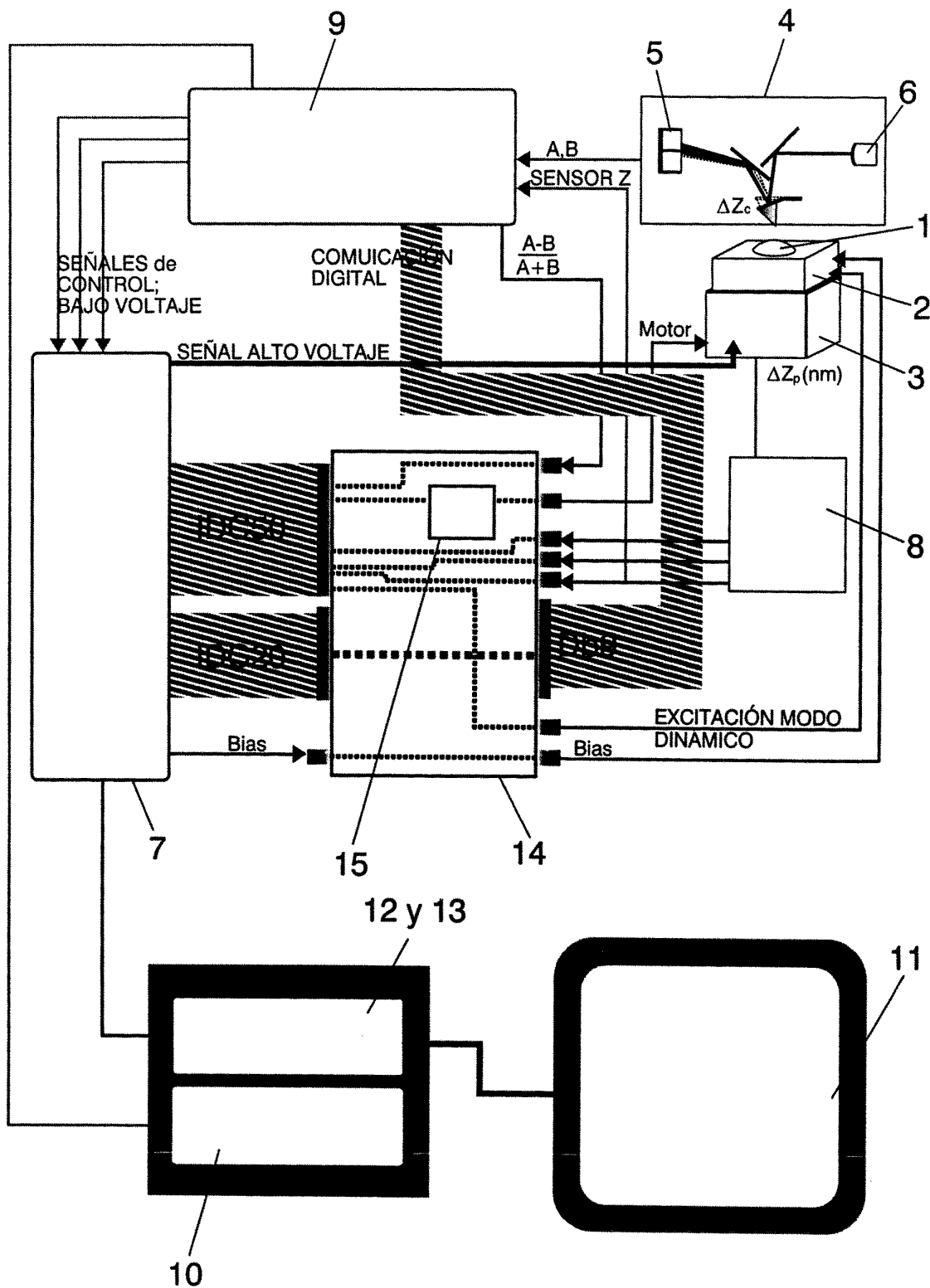


FIG. 1

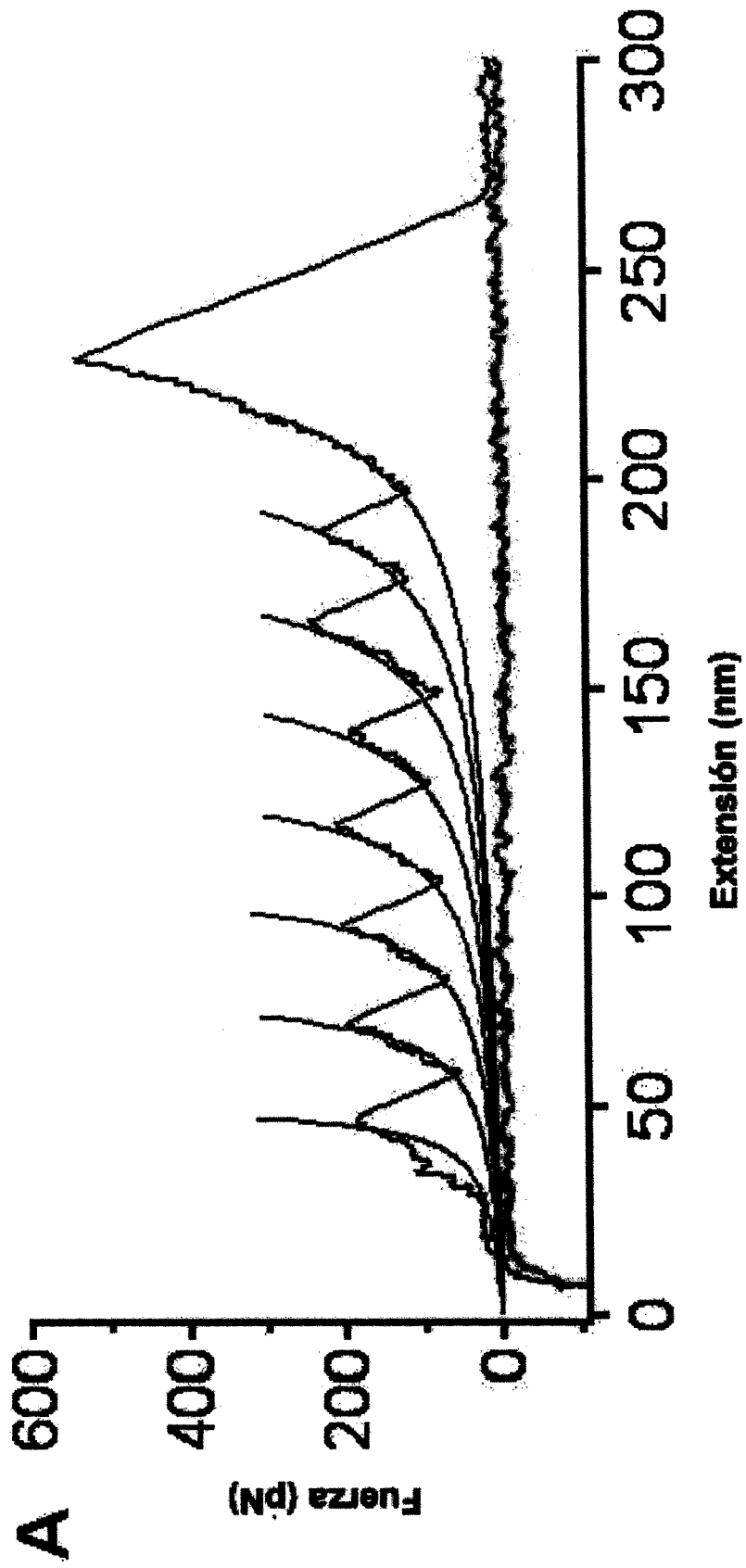


FIG. 2A

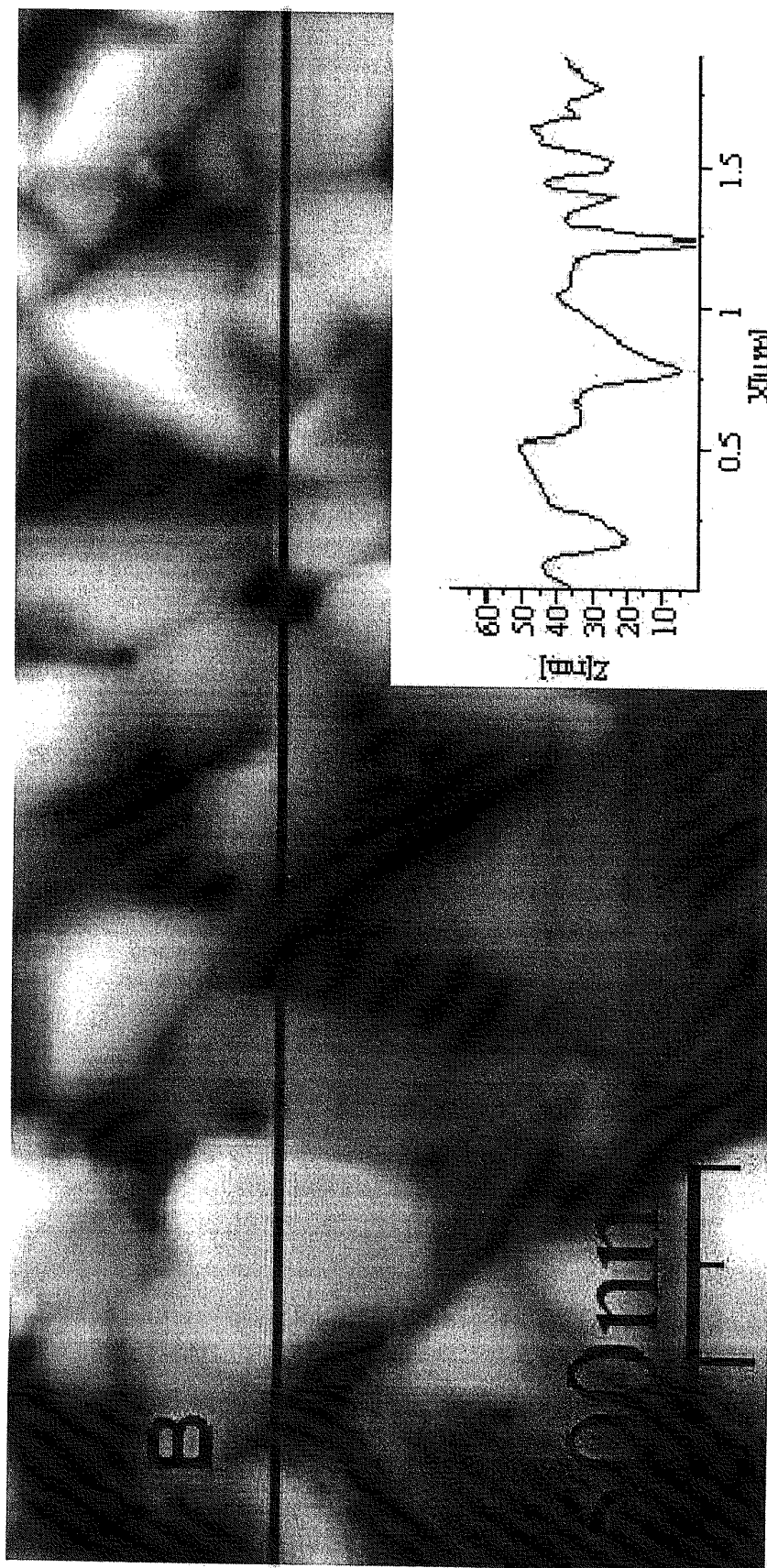


FIG. 2B

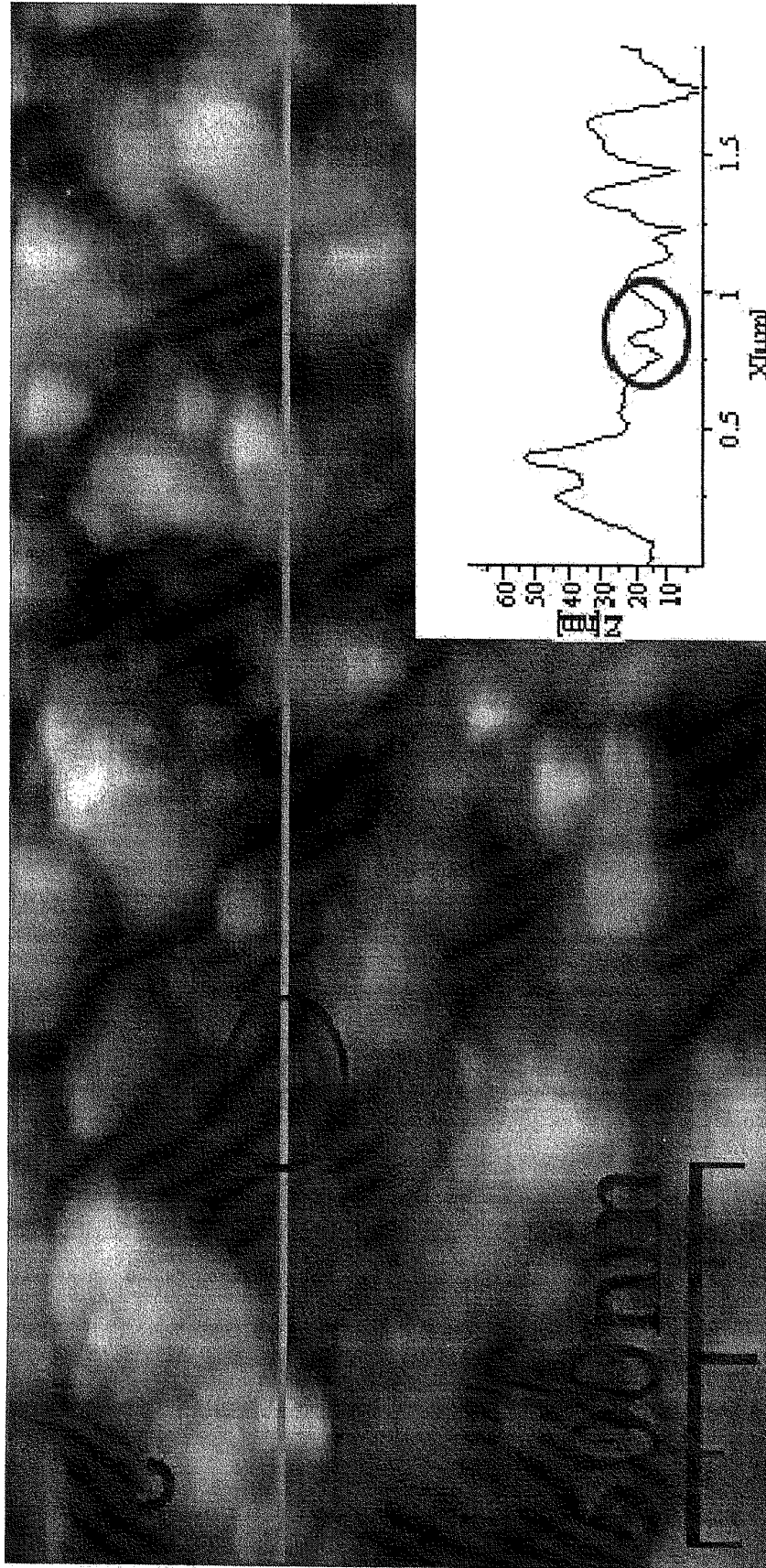


FIG. 2C

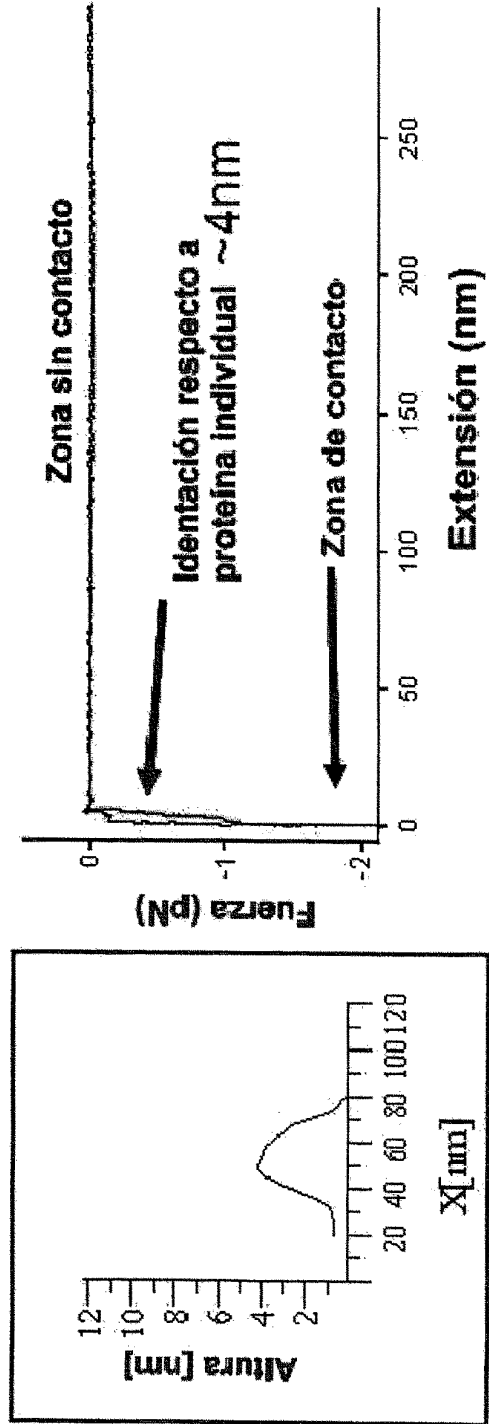
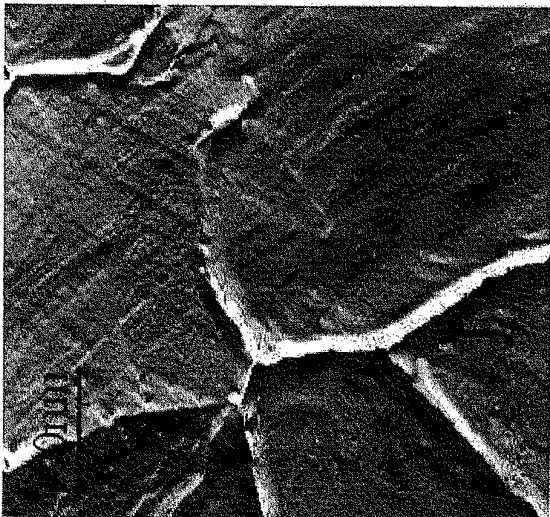
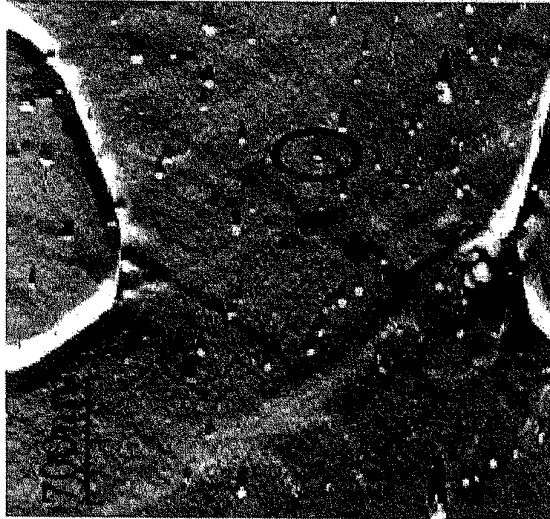


FIG. 3A

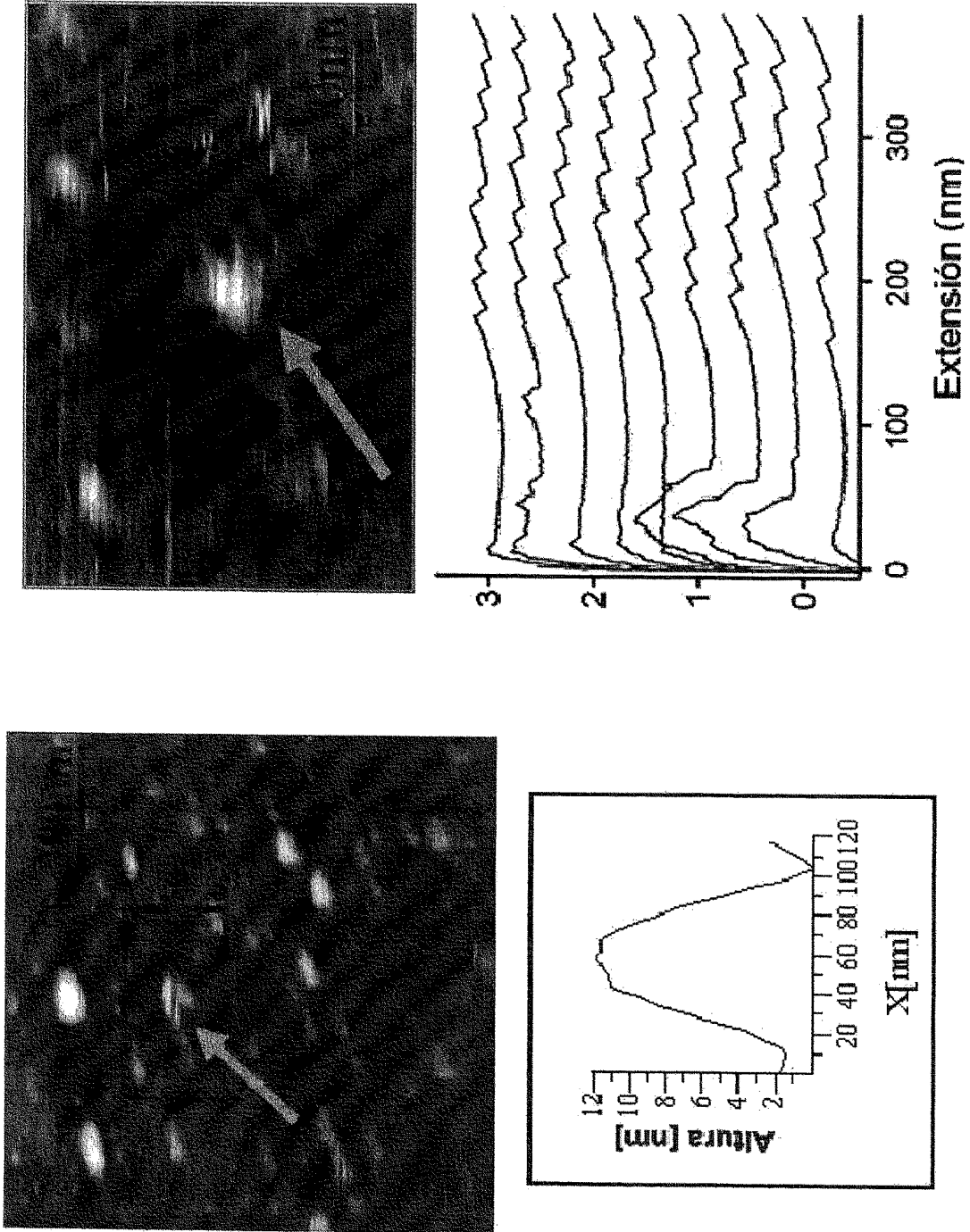


FIG. 3B



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 316 285

② N° de solicitud: 200701859

③ Fecha de presentación de la solicitud: **02.07.2007**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **G01N 13/16** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	SCHLIERF, M.; LI, H. & FERNÁNDEZ, J. M.: "The unfolding kinetics of ubiquitin captured with single-molecule force-clamp techniques". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 11 de mayo de 2004, Vol. 101, N° 19, páginas 7.299-7.304.	1-8
A	STROH, C. M. et al.: "Simultaneous Topography and Recognition Imaging Using Force Microscopy". Biophysical Journal, Biophys. Soc. USA. Septiembre de 2004, Vol. 87, N° 3, páginas 1.981-1.990, ISSN 0006-3495.	1-8
A	FERNÁNDEZ, J. M. & LI, H.: "Force-Clamp Spectroscopy Monitors the Folding Trajectory of a Single Protein". Science. 12 de marzo de 2004, Vol. 303, N° 5664, páginas 1.674-1.678.	1-8

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

02.03.2009

Examinador

O. González Peñalba

Página

1/1