

# COMENTARIO INVITADO

## Premio Nobel de Física 2018

# Pinzas ópticas y su aplicación a sistemas biológicos

Fèlix Ritort

Las pinzas ópticas son una herramienta prodigiosa para manipular y seguir la acción directa de las moléculas biológicas a nivel individual, además de medir fuerzas en el rango del piconewton y energías de una kilocaloría por mol



III. Niklas Elmehed. © Nobel Media

El premio Nobel de Física 2018 ha sido concedido a las invenciones en el campo de la física del láser: una mitad del premio al americano Arthur Ashkin, por la invención de las pinzas ópticas, la otra mitad al francés Gérard Mourou y a la canadiense Donna Strickland, por la generación de pulsos de luz de haces intensos y ultrarrápidos. El láser presenta propiedades excepcionales tales como gran monocromaticidad, coherencia de fase, direccionalidad e intensidad. Ello hace de la luz láser una herramienta extraordinaria para investigar las propiedades físico-químicas de la materia. Ashkin ha sido galardonado por inventar el atrapamiento óptico con luz (las llamadas pinzas ópticas).

### ¿Cuál es el fundamento del atrapamiento óptico?

A finales del siglo XIX, con el desarrollo de la teoría electromagnética, se sabía que la luz conlleva momento lineal y energía. Así por ejemplo, la estela de gas y polvo desprendida por los cometas en su aproximación al Sol es debido al impulso causado por la luz incidente proveniente del Sol. El atrapamiento óptico se puede entender utilizando simples argumentos basados en óptica geométrica y mecánica (Figura 1A). Cuando un frente de onda plano incide oblicuamente sobre un medio de índice de refracción diferente sufre una desviación (refracción). Tal desviación cambia la dirección del haz, lo que lleva a un cambio de momento o impulso (segunda ley de Newton: la causa de un impulso es siempre una fuerza). Si además el objeto que interacciona con la luz es suficientemente pequeño (como por ejemplo una bolita pequeña del tamaño de micras, técnicamente una microesfera) entonces éste experimenta una fuerza neta que puede ser utilizada para desplazar el objeto en la dirección opuesta a la del impulso que recibe el haz (tercera ley de Newton: dada una fuerza [acción] existe siempre una fuerza opuesta [reacción] de igual intensidad y sentido contrario). Con un único haz láser colimado no es posible realizar el atrapamiento óptico de microesferas ya que la fuerza neta que actúa sobre las mismas las dispersa. Para atrapar las microesferas es necesario contrarrestar la fuerza de dispersión que genera un frente de onda plano. Ello es posible focalizando un haz con un objetivo de suficiente apertura numérica (definida por el cociente entre el diámetro de la lente y la distancia focal) y utilizando microesferas de índice de refracción mayor que el

del medio (Figura 1B). La primera referencia al atrapamiento óptico data del año 1970 [1] cuando Arthur Ashkin en Bell Labs (New Jersey) demostró experimentalmente la posibilidad de atrapar ópticamente partículas dieléctricas en aire o agua focalizando un haz láser usando una lente de microscopio. El gradiente de intensidad de luz en el foco produce una fuerza de gradiente que compensa la fuerza dispersiva del haz de luz posibilitando el atrapamiento óptico de objetos microscópicos (Figura 1B). En buena aproximación el potencial de atrapamiento óptico es de tipo armónico. Ello

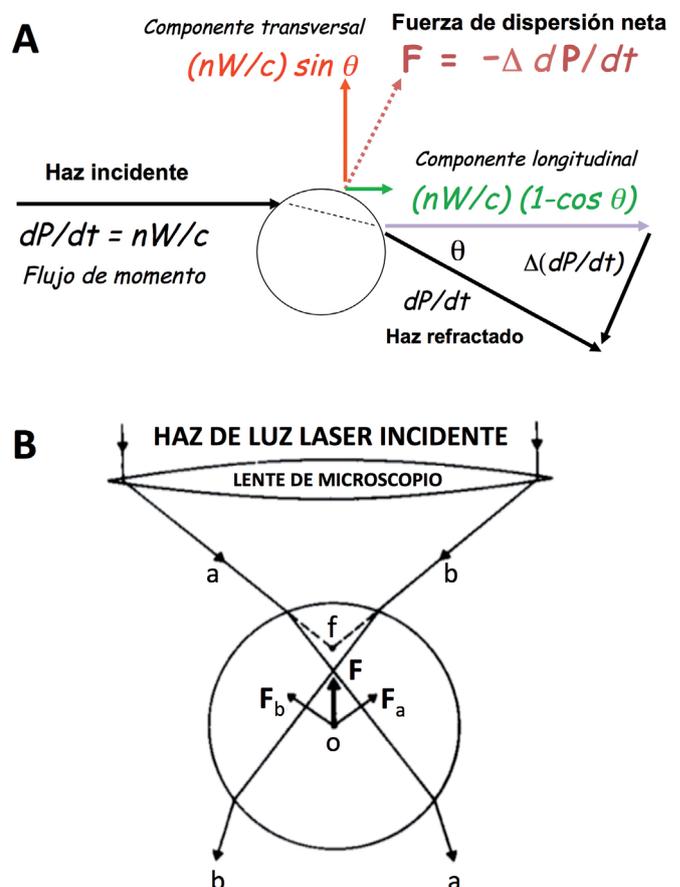
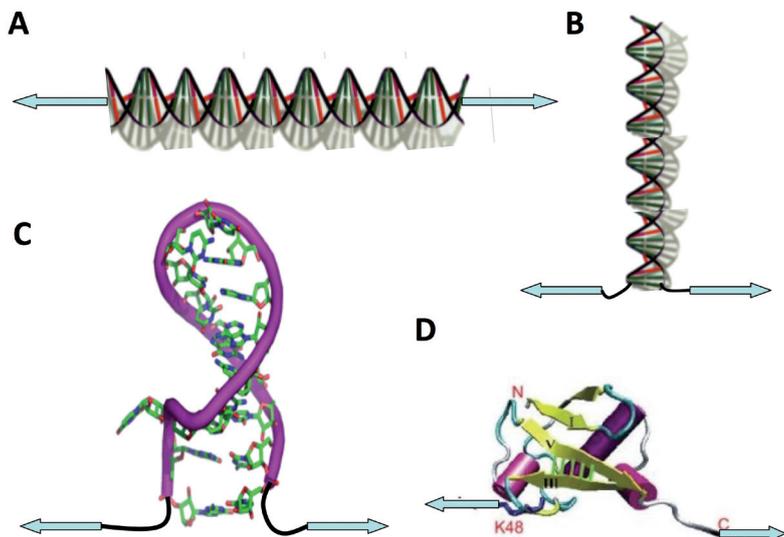


Fig. 1. (A) Esquema de fuerzas de dispersión debido a la refracción de un rayo de luz que incide sobre una microesfera de índice de refracción mayor que la del medio circundante. (B) Fuerza de gradiente producida a lo largo del eje óptico al focalizar con una lente de microscopio un frente de onda plano.



**Fig. 2.** Manipulación de moléculas individuales. (A) Estiramiento del ADN (ver figura 3). (B, C, D) Desnaturalización mecánica (*unzipping* en inglés) de una doble hélice de ADN, de una horquilla de ARN y de una proteína. Las flechas celestes indican la dirección de aplicación de la fuerza.

significa que las fuerzas que ejerce la trampa en una bolita atrapada sigue la ley de Hooke,  $f = -kx$ , donde  $f$  es la fuerza de atrapamiento,  $k$  es la rigidez de la trampa y  $x$  el desplazamiento de la bolita respecto al punto de equilibrio. La invención de la pinza óptica con sus innumerables aplicaciones en el ámbito de la biofísica es lo que le ha valido a Arthur Ashkin el premio Nobel este año.

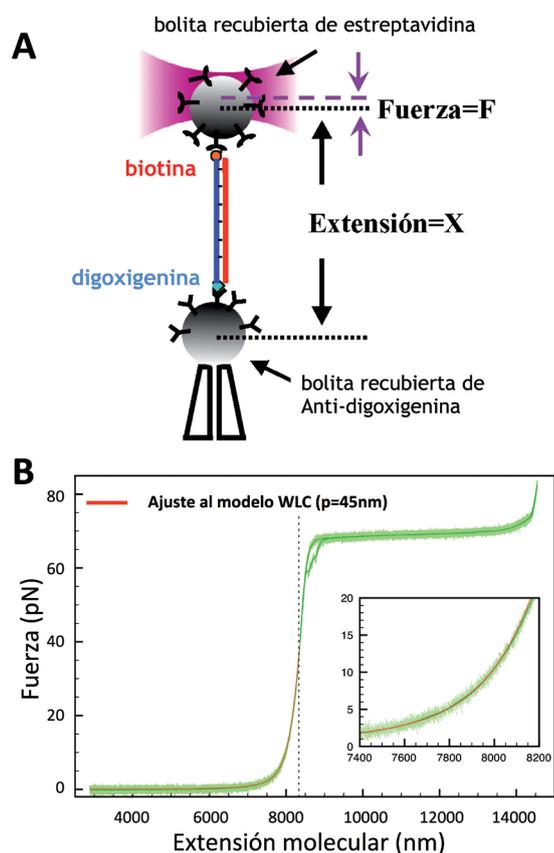
El descubrimiento de Ashkin de 1970 condujo inmediatamente a nuevos desarrollos en física, conocidos como enfriamiento por luz láser, que permiten confinar átomos y moléculas. Paradójicamente estos estudios también fueron iniciados por Ashkin [2] y ya reconocidos con el premio

Nobel de Física 1997 concedido a Steven Chu, Claude Cohen Tannoudji y William Phillips. Las pinzas ópticas permiten capturar, además de objetos tales como bolitas de plástico o sílice, sistemas biológicos del tamaño de una micra como células, orgánulos, bacterias, etc. [3]. La mayor parte del trabajo de Ashkin durante los años 80 se dedicó a esta investigación, aunque con un impacto relativo en el campo de la biofísica.

### Aplicaciones de las pinzas ópticas a la biofísica

Muy probablemente, el ámbito donde el descubrimiento de Ashkin ha tenido más impacto sea en el ámbito de la manipulación de moléculas individuales y más concretamente en el campo de la espectroscopia de fuerzas (para artículos de revisión ver [4-6]). La manipulación de moléculas individuales (Figura 2) permite estudiar sus propiedades físico-químicas así como la función biológica. Ello es posible gracias al reciente desarrollo no sólo de las pinzas ópticas sino también de otros instrumentos (pinzas magnéticas, pinzas acústicas, microscopio de fuerza atómica, etc.) dotados de la suficiente sensibilidad y precisión para manipular moléculas y medir fuerzas y distancias en la nanoescala. Las pinzas ópticas miden fuerzas entre 0.1 pN y 100 pN con una resolución del orden de la décima del pN y del orden de varios Angstrom en distancias lo cual las convierte en herramienta ideal para estudiar interacciones débiles en biofísica molecular y procesos donde intervienen ácidos nucleicos, enzimas y otros complejos macromoleculares.

A inicios de los años 90, el biofísico peruano Carlos Bustamante, actualmente profesor en la Universidad de California en Berkeley, se preguntó si sería posible estirar mecánicamente una molécula de ADN. Juntamente con Steve Smith y Laura Finzi de la Universidad de Oregón midieron la primera curva de extensión de fuerza del ADN utilizando pinzas magnéticas [7]. Este experimento proporcionó la primera manipulación de una sola molécula controlada mecánicamente y la prueba experimental del modelo de barra elástica ampliamente utilizado en la física de polímeros. Unos años más tarde en 1996 Bustamante y sus colaboradores desarrollaron la configuración de pinzas ópticas propuesta por Ashkin de haces contrapropagantes [1] que permite medir directamente la fuerza a partir del impulso impartido por la luz a una microesfera unida a una molécula de ADN. Juntamente con François Caron y colaboradores de la ENS en París (que utilizaron microagujas), se publicaron dos artículos al mismo tiempo [8,9] donde se describe una transición conformacional en el ADN (llamada transición B-S) que se observa a una fuerza alrededor de 65 pN y donde la longitud de contorno se alarga  $\cong 70\%$ . Actualmente la transición de 65 pN se utiliza para calibrar las pinzas (Figura 3).

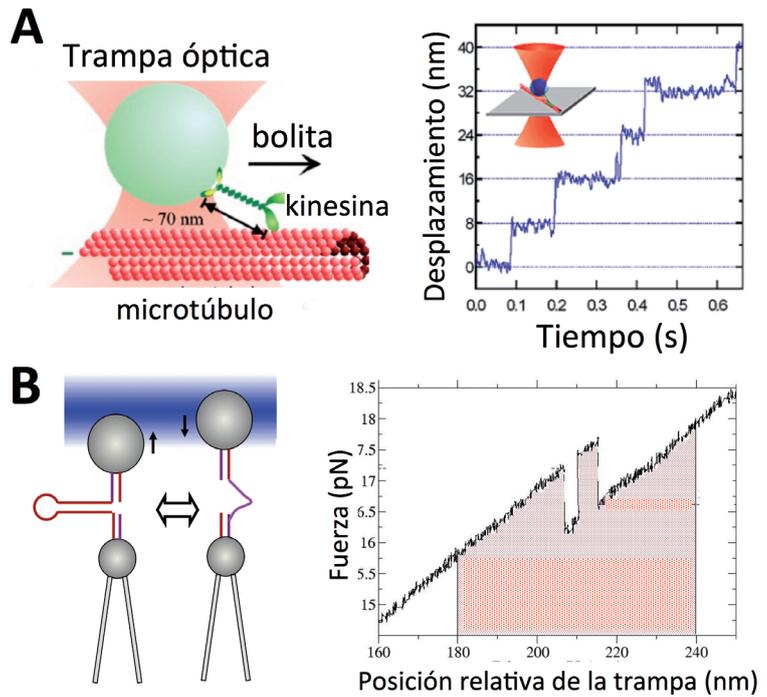


**Fig. 3.** (A) Esquema experimental de pinzas ópticas para el estiramiento de una molécula de ADN. Se indican la trampa óptica (color rosa), la molécula de ADN con los marcajes de biotina y antígeno en sus extremos, así como la pipeta que inmoviliza la bolita recubierta de anticuerpo. (B) Curva fuerza-extensión durante el estiramiento de una molécula de ADN de mitad del fago lambda (unas 24 kbases, longitud total de aproximadamente unas 8 micras). Ajuste al modelo elástico WLC (worm-like chain en inglés) que da para el ADN una longitud de persistencia de 45 nm (curva roja).

Un posible esquema experimental de pinzas ópticas se muestra en la Figura 3A, donde una molécula se une a dos microesferas (por ejemplo, a través de enlaces biotina-streptavidina). Ello requiere la modificación química de los extremos de la molécula y el recubrimiento químico de la superficie de las microesferas. Una microesfera permanece fija en la punta de una micropipeta cuya posición es fija mientras que la otra se atrapa en la trampa óptica. Moviéndose ya sea la trampa o la micropipeta se pueden efectuar estiramientos. Ello permite medir las curvas de fuerza-extensión donde se representa la fuerza que actúa sobre la microesfera en la trampa en función de la extensión molecular (Figura 3B) y así determinar propiedades elásticas de la molécula (tales como la longitud de persistencia).

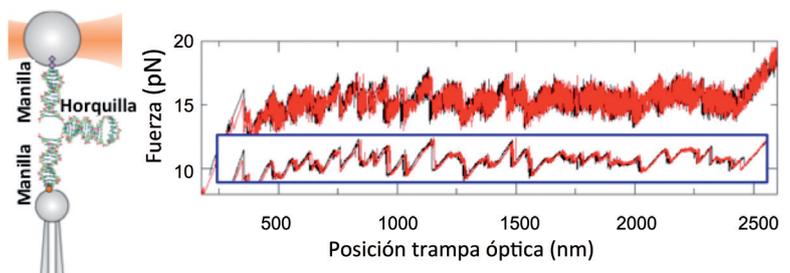
Las aplicaciones de las pinzas ópticas van más allá del ADN. Ya en 1989 Howard Berg y colaboradores midieron la fuerza ejercida por un flagelo bacteriano utilizando pinzas ópticas [10]. Unos años más tarde, en 1993, Steven Block y colaboradores de la Universidad de Stanford publicaron el primer experimento en el que se realizó un seguimiento y se midió el movimiento paso a paso de un único motor de kinesina utilizando pinzas ópticas [11] (Figura 4A). A continuación, en 1994 Hermann Gaub en Munich publicó las primeras medidas de fuerza de interacción intermolecular en pares individuales de receptor, utilizando el microscopio de fuerza atómica [12].

Actualmente las pinzas ópticas permiten manipular moléculas individuales de ADN, ARN, proteínas y motores biológicos así como medir la energética y cinética de los procesos en los que intervienen con una precisión exquisita. Por citar algunos ejemplos: desde derivar la termodinámica de la hibridación de ácidos nucleicos con alta precisión [13] (Figura 5), a determinar la trayectoria difusiva de plegamiento de una proteína a través de una barrera [14] o medir la cinética de un motor sintético que transita entre dos estados moleculares [15]. Otra de las aplicaciones más importantes de las pinzas ópticas se produce en la investigación de aspectos fundamentales de la física de los sistemas fuera del equilibrio. Durante los últimos años se ha desarrollado una importante actividad teórica y experimental en el ámbito de los teoremas de fluctuación. Éstos teoremas cuantifican la irreversibilidad de un proceso físico, relacionando la probabilidad de observar la evolución temporal de un sistema relativa a la evolución temporal invertida (es decir, como si la secuencia temporal de eventos retrocediese en el tiempo). Un corolario importante de estos teoremas es la igualdad de Jarzynski [16] que establece que la diferencia de energía libre entre dos estados de equilibrio  $\Delta G$  se puede obtener a partir de medidas de trabajo  $W$  a lo largo de procesos irreversibles. Mas concretamente,  $\Delta G = -k_B T \log \langle \exp(-W/k_B T) \rangle$  donde  $k_B$



**Fig. 4.** (A) Translocación del motor kinesina a lo largo de un microtúbulo y medida del desplazamiento de la trampa óptica a fuerza constante que muestra saltos de unos 8 nm. (B) Experimento de desnaturalización mecánica sobre una horquilla de ADN y curva de fuerza-distancia. El área roja bajo la curva es igual al trabajo mecánico ejercido por la pinza óptica sobre la molécula durante un experimento dado. Para extraer  $\Delta G$  con la igualdad de Jarzynski hay que repetir estiramientos el mayor número de veces, medir el trabajo  $W$  para cada trayectoria, y tomar el promedio la exponencial de  $-W/k_B T$ .

es la constante de Boltzmann,  $T$  la temperatura y  $\langle \dots \rangle$  es un promedio sobre múltiples repeticiones del experimento (Figura 4B). Más allá de su belleza, elegancia y simplicidad, ¿cuál es la verdadera relevancia de esta igualdad? Cualquier libro de termodinámica dirá que la medida de potenciales termodinámicos tales como la energía libre es posible únicamente en procesos reversibles, mientras que en condiciones irreversibles sólo es posible obtener desigualdades. De acuerdo a la igualdad de Jarzynski, sin embargo, ello es posible en sistemas moleculares o pequeños donde las



**Fig. 5.** Experimentos de desnaturalización mecánica (*unzipping*) de moléculas (horquillas) de ADN con pinzas ópticas. (Izquierda) Esquema del experimento (elementos no están en escala). El movimiento de la trampa relativa a la pipeta separa las dos hebras de la moléculas de ADN disociando los enlaces moleculares que estabilizan la doble hélice. La medida de las curvas de fuerza-elongación (derecha) proporcionan una estimación directa de las energías de los enlaces complementarios guanina-citosina y adenina-timina que estabilizan la molécula de ADN [13]. La curva roja (negra) representa medidas de *unzipping* (*zipping*). En el cuadro la curva fuerza-elongación filtrada a 10 Hertzios.

fluctuaciones del trabajo son experimentalmente medibles y la igualdad aplicable [17]. Este resultado, como tantos otros de la llamada termodinámica de sistemas pequeños o estocástica, ha venido para quedarse.

### Perspectivas futuras

Querría finalizar esta reseña mencionando otra aplicación importante de las pinzas de Ashkin, más allá de las medidas de fuerza, extensión y trabajo mecánico. Recientes experimentos con trampas ópticas [18] y dispositivos electrónicos [19] han realizado experimentalmente un demonio de Maxwell que convierte la información en trabajo útil, así como permiten realizar motores térmicos microscópicos en presencia de ruido browniano [20]. Por otro lado, experimentos en pinzas ópticas con retro-alimentación [21] demuestran cómo es posible asociar una información termodinámica a un sistema fuera del equilibrio. El aspecto más interesante de todos estos experimentos reside en el hecho de que, únicamente a partir de la clasificación de las trayectorias observadas y las medidas del trabajo, es posible medir el contenido de información de un sistema fuera del equilibrio con una precisión de una décima de bit.

El gran número de aplicaciones de las pinzas ópticas que van desde el atrapamiento de bacterias y células, los experimentos de manipulación de molécula única en biomoléculas, motores moleculares y un amplio espectro de sistemas activos, hasta la medida de energía y información en sistemas fuera del equilibrio, han contribuido finalmente a reconocer debidamente el largamente esperado premio para Arthur Ashkin.

### Referencias

- [1] A. ASHKIN, Acceleration and trapping of particles by radiation pressure”, *Phys. Rev. Lett.* **24**, 156–159 (1970).
- [2] A. ASHKIN, “Atomic-beam deflection by resonance-radiation pressure”, *Phys. Rev. Lett.* **25**, 1321–1324 (1970).
- [3] A. ASHKIN, J. M. DZIEDZIC y T. YAMANE, “Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams”, *Nature* **330**, 769–771 (1987).
- [4] F. RITORT, “Single molecule experiments in biological physics: methods and applications”, *J. Phys. Condens. Matter*, **18**, R531–R583 (2006).
- [5] S. HORMEÑO y J. R. ARIAS-GONZALEZ, “Exploring mechanochemical processes in the cell with optical tweezers”, *Biol. Cell.* **98**, 679–695 (2006).
- [6] I. VERDENY, A. FARRÉ, J. MAS, C. LÓPEZ-QUESADA, E. MARTÍN-BADOSA y M. MONTES-USATEGUI, “Optical trapping: a review of essential concepts”, *Opt. Pur. Apl.* **44**, 527–551 (2011).
- [7] L. FINZI, S. B. SMITH y C. BUSTAMANTE, “Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA

molecules by using magnetic beads”, *Science* **258**, 1122–1124 (1992).

- [8] P. CLUZEL, A. LEBRUN, C. HELLER, R. LAVERY, J.-L. VIOVY, D. CHATENAY y F. CARON, “DNA: an extensible molecule”, *Science* **271**, 792–794 (1996).
- [9] Y. CUI, S. B. SMITH y C. BUSTAMANTE, “Overstretching B-DNA: the elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules”, *Science* **271**, 795–799 (1996).
- [10] S. M. BLOCK, D. F. BLAIR y H. C. BERG, “Compliance of bacterial flagella measured with optical tweezers”, *Nature* **338**, 514–518 (1989).
- [11] K. SVOBODA, C. F. SCHMIDT, B. J. SCHNAPP y S. M. BLOCK, “Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry”, *Nature* **365**, 721–727 (1993).
- [12] E. L. FLORIN, V. T. MOY y H. E. GAUB, “Adhesion forces between individual ligand–receptor pairs” *Science* **264**, 415–417 (1994).
- [13] J. M. HUGUET, C. V. BIZARRO, N. FORNS, S. B. SMITH, C. BUSTAMANTE y F. RITORT, “Single-molecule derivation of salt dependent base-pair free energies in DNA”, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 15431 (2010).
- [14] K. NEUPANE *et al.*, “Direct observation of transition paths during the folding of proteins and nucleic acids”, *Science* **35**, 239–242 (2016).
- [15] T. NARANJO, K. M. LEMISHKO, S. De LORENZO, A. SOMOZA, F. RITORT, E. M. PÉREZ y B. IBARRA, “Dynamics of individual molecular shuttles under mechanical force”, *Nat. Commun.* **9**, 4512 (2018).
- [16] C. JARZYNSKI, “Nonequilibrium equality for free-energy differences”, *Phys. Rev. Lett.* **78**, 2690–2693 (1997).
- [17] J. LIPHARDT, S. DUMONT, S. B. SMITH, I. TINOCO y C. BUSTAMANTE, “Equilibrium information from nonequilibrium measurements in an experimental test of the Jarzynski equality”, *Science* **296**, 1833–1835 (2002).
- [18] A. BERUT, A. ARAKELYA, A. PETROSYAN, S. CILIBERTO, R. DILLENSCHNEIDER y E. LUTZ, “Experimental verification of Landauer’s principle linking information and thermodynamics”, *Nature* **483**, 187–189 (2012).
- [19] J. V. KOSKI, V. F. MAISI, J. P. PEKOLA y D. V. AVERIN, “Experimental realization of a Szilard engine with a single electron”, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 13786 (2014).
- [20] I. MARTÍNEZ, E. ROLDAN, L. DINIS, D. PETROV, J. M. R. PARRONDO y R. A. RICA, “Brownian Carnot engine”, *Nat. Phys.* **12**, 67–70 (2016).
- [21] J. M. R. PARRONDO, J. M. HOROWITZ y T. SAGAWA, “Thermodynamics of information”, *Nat. Phys.* **11**, 131–139 (2015).

Fèlix Ritort

Profesor de Física de la Materia  
Condensada y Ciber-BBN  
Universitat de Barcelona

