

Nº 6, dez/96, p.1-4

USO DA MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA PARA VISUALIZAÇÃO DE BACTERIÓFAGOS FILAMENTOSOS.

Rubens Bernardes Filho¹

Denise Osiro²

Paulo Sergio P. Herrmann³

Luiz Alberto Colnago⁴

Jane E. Frommer⁵

Dentre as várias ferramentas que possibilitam o conhecimento das estruturas das moléculas biológicas, em nível atômico, a técnica de Difração de Raios X por monocristais tem tido papel preponderante. Até o momento, a maior parte das informações acumuladas sobre o arranjo tridimensional de átomos em proteínas, ácidos nucleicos (DNA e RNA) e vírus foi obtida através de métodos cristalográficos.

Outra técnica muito usada para determinar a estrutura tridimensional de biopolímeros e as estruturas supramoleculares é a Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Ela apresenta algumas vantagens sobre a Difração de Raios X por não precisar de cristais, porém seu uso se limita a moléculas relativamente pequenas, de até 100KDa.

Um método mais recente que é capaz de obter detalhes de superfície em nível atômico/molecular são os microscópios de varredura por tunelamento (STM) e de força atômica (AFM) (Morris, 1994).

Na análise por microscopia de força atômica, a imagem da amostra é gerada pela varredura da sua superfície com uma agulha ultrafina. Por isso as amostras têm que estar muito bem presas na superfície de um substrato sólido, para não serem arrancadas durante a varredura. Este é um problema crítico para amostras biológicas, que são frágeis e têm fraca interação com os substratos.

Os métodos propostos na literatura para fixação têm sido o de fixação química ou física. A química envolve, principalmente, a fixação da amostra ao substrato com ligações covalentes. Esse procedimento não é simples, uma vez que envolve reações químicas entre a amostra e o substrato. A ligação física se baseia principalmente, na fixação eletrostática, que pode ocorrer entre a amostra e o substrato com cargas opostas.

¹ Físico, MSc, EMBRAPA-CNPDI, Caixa Postal 741, CEP 13560-970, São Carlos, SP

² Pós-graduando, IQSC-USP, Caixa Postal 780, CEP 13560-970, São Carlos, SP

³ Eng Eletrônico, MSc, EMBRAPA-CNPDI, Caixa Postal 741, CEP 13560-970, São Carlos, SP

⁴ Farmacêutico, PhD, EMBRAPA-CNPDI, Caixa Postal 741, CEP 13560-970, São Carlos, SP

⁵ Física, PhD, Almaden Research Center - IBM, 650 Harry Road, CEP 95120-6099 San Jose, CA

PA/6, CNPDIA, dez/96, p.2

Esta sendo desenvolvida uma metodologia de preparação de amostras, que envolve purificação de bacteriófagos filamentosos e depósito destes em superfície plana para posterior análise por microscopia de força atômica (AFM).

O M13 adquirido da Gibco BRL foi o M13KO7, que é um mutante, com inserção do gene de resistência à kanamicina.

As amostras de vírus foram preparadas de modo similar ao "Self Assembling" (Herrmann, 1996). Após preparação, a amostra foi analisada com um microscópio de AFM, nos modos de contato e "tapping".

As amostras foram analisadas no microscópio de AFM nanoscope III, Digital, do Almaden Research Center da IBM, USA. As análises de AFM foram processadas pelo software do instrumento.

Na figura 1 é apresentada uma imagem de 2,56x2,56µm de dois bacteriófagos filamentosos M13KO7, usando o modo de contato (à esquerda) e "tapping" (à direita). No modo contato, a varredura é feita com a ponta da agulha tocando continuamente a superfície da amostra. No modo "tapping" a agulha vibra com frequência na ordem de dezenas de KHz, o que é um método de menor interferência com a amostra .

Como se pode ver nessas imagens, há dois bastões, com aproximadamente 1000 nm de comprimento por 50 nm de diâmetro. O comprimento está bem próximo ao obtido por microscopia eletrônica (ME), que é de aproximadamente 900 nm. O diâmetro das partículas estão em torno de 50 nm, bem superior ao observado por ME, que é de aproximadamente 10 nm. A maior largura observada por AFM é um artefato da técnica, devido à interação da ponta da agulha com a amostra.

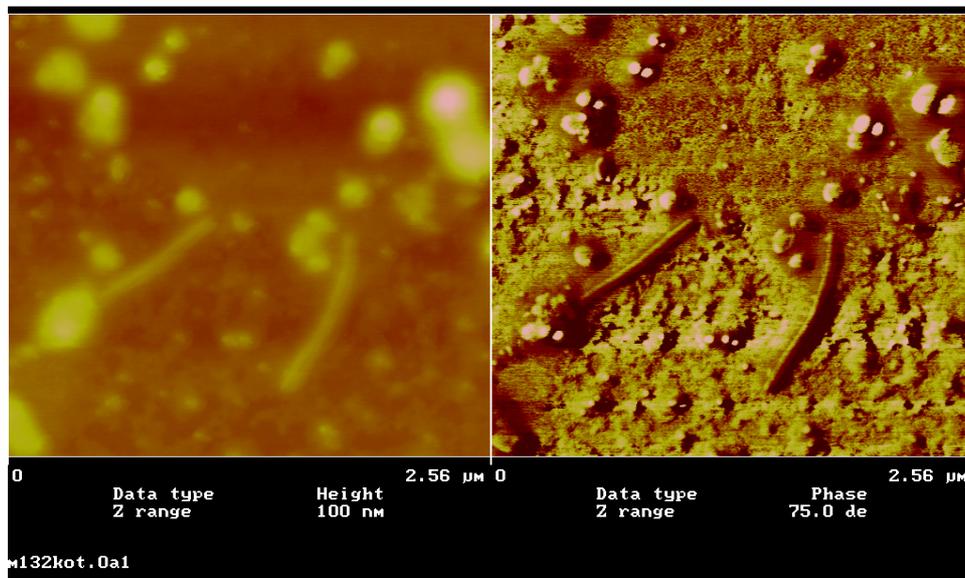


Figura 1. Imagens de AFM do bacteriófago filamentosos M13KO7 depositado sobre lâmina de vidro hidrofílica. A imagem à esquerda, no modo contato e à direita, no modo "tapping".

PA/6, CNPDIA, dez/96, p.3

Nessas imagens é possível observar os vírus, tanto nos modos de contato como de "tapping". No entanto, foi observado que no modo "tapping" as imagens têm maior contraste, o que facilita a inspeção visual.

Na figura 2, tem-se outra imagem de bacteriófagos depositados em lamínula de vidro. Neste caso, observa-se que vários vírus estão ligados entre si pelas extremidades. Esse fenômeno também tem sido observado em ME, com a união de dois ou três vírus. Também se observa que o modo de "tapping" apresentou melhor contraste que o modo contato.

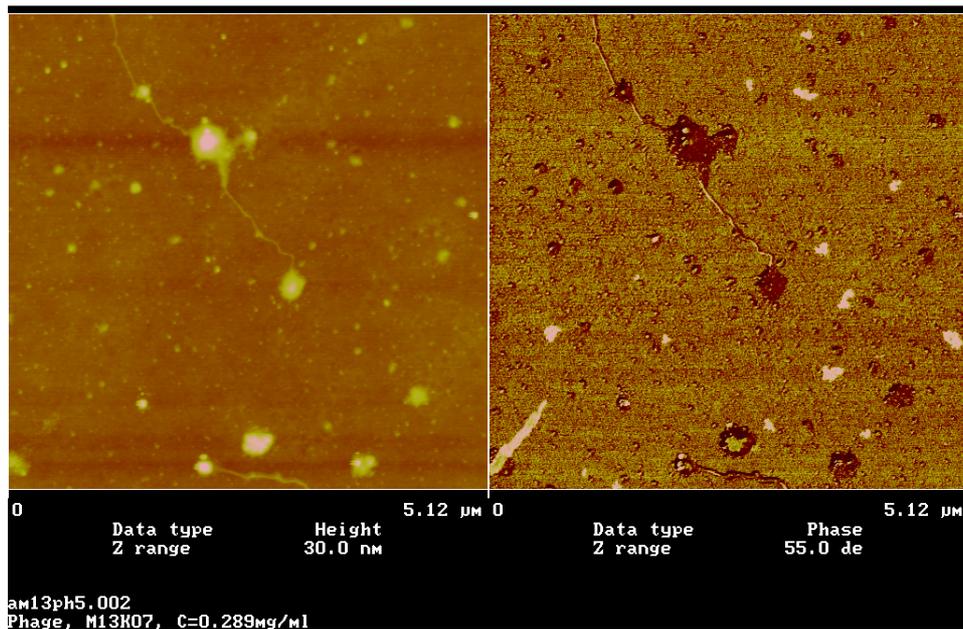


Figura 2. Imagens de AFM do bacteriófago M13K07 no modo contato (esquerda) e "tapping" (direita).

Nessas imagens, assim como nas publicadas na literatura (Morris, 1994), há grande quantidade de materiais estranhos nas lamínulas. Ainda assim, os bacteriófagos podem ser identificados.

Apesar do trabalho estar ainda na etapa inicial, pode-se ver a potencialidade do AFM no estudo de vírus. Em comparação aos microscópios eletrônico e de força atômica, tem como vantagens: o custo relativamente baixo em relação ao microscópio eletrônico de varredura, e a facilidade de preparação de amostras.

Com o desenvolvimento da técnica espera-se obter imagens de alta resolução e que possibilite de se observar detalhes da superfície do vírus como o arranjo das proteínas de cobertura.

Esta metodologia vem sendo aplicada na análise de alguns tipos de vírus bacteriófagos filamentosos de plantas (estruturalmente semelhantes ao M13), como o vírus do mosaico do Tabaco (TMV) e vírus do mosaico da abobrinha (ZMV).

PA/6, CNPDIA, dez/96, p.4

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

HERRMANN, P.S.P.; BORATO, C.E.; MATTOSO, L.H.C.; OLIVEIRA JUNIOR., O.N.; COLNAGO, L.A. Fixação de proteínas em substrato sólido por técnica de "self assembly". In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 11, São Carlos-SP, jul.-ago. 1996. **XI SINAFERM**. São Carlos: UFSCar/SBM/ABEQ, 1996, v.1, p.261-266.

MORRIS, V.J. Biological applications of scanning probe microscopies. **Progress in Biophysical Molecular Biology**, Elmsford, v.61, p. 131-185, 1994.