

Nº 20, dez/97, p.1-4

PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS DE DNA EM VIDRO E MICA, PARA REALIZAÇÃO DE MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

Rubens Bernardes Filho¹
Denise Osiro²
Luiz Alberto Colnago¹

A microscopia de força atômica é um método capaz de obter detalhes de superfície em nível atômico/molecular. Esta metodologia tem atraído a atenção de químicos, físicos e biólogos, pois fornece informações sobre materiais orgânicos e inorgânicos, que até então não haviam sido obtidas.

Nessa microscopia a imagem é obtida por intermédio de uma agulha ultra fina montada sob uma haste extremamente fina (algumas micra) que percorre a amostra e responde as micro-variações da superfície. Por isso a amostra tem que estar muito bem aderida a superfície de um substrato sólido, para não ser arrancada durante a varredura, isto é problema crítico para amostras orgânicas e biológicas que são frágeis e têm fraca interação com a maioria dos substratos.

Apresentamos, aqui, alguns resultados frutos de dois tipos de preparação de amostras de DNA, de vírus M13, para realização de imagens de microscopia de força atômica. A primeira foi feita utilizando lamínulas de vidro como substrato de deposição e a outra com lamínulas de mica clivadas.

As lamínulas utilizadas passaram por processo de limpeza e hidrofilição e as lamínulas de mica foram preparadas utilizando um produto comercialmente conhecido como APTES (3-aminopropyltriethoxy silane, adquirida da Sigma Chemical), que adere fortemente a mica propiciando aumento da quantidade de DNA adsorvido na mica.

O processo de hidrofilição do vidro seguiu a método padrão que compreende o processo de limpeza por soluções ácidas e básicas e posterior uso de solventes orgânicos.

Processo para tratamento das lamínulas de vidro:

a) *Primeiro banho*: H₂SO₄ (concentrado)/ H₂O₂ (concentrado) na proporção de 7:3. Deixa-se a solução aquecer até estabilizar em T = 80°C e coloca-se as lamínulas. Em seguida coloca-se a solução com as lamínulas durante 1 hora na câmara de ultra-som.

¹ Pesquisadores da Embrapa Instrumentação Agropecuária, Rua XV de Novembro, 1452, Caixa Postal 741, CEP 13560-970 São Carlos/SP; e-mail: rubens@cnpdia.embrapa.br

² Aluno de Pós-Graduação do Instituto de Química de São Carlos - USP

PA/20, CNPDIA, dez/97, p.2

b) Lavar exaustivamente as lâminas com água (condutividade superior a 18,3 Mmhos/cm)

c) *Segundo banho:* H₂O (ultra-limpa)/ H₂O, (concentrado)/ NH₄OH (concentrado) na proporção de 5:1:1. Deixa-se as laminas durante 30 minutos neste banho na câmara de ultra-som.

d) Lavar as laminas com grande quantidade de água padrão mili-Q.

O DNA utilizado foi um "double stranded" de vírus M13 (Sigma) o qual foi diluído em 1:500 com água padrão mili-Q. Após a diluição, uma gota contendo 20ml da solução foi depositada sobre a lamina hidrofílica. O tempo de contato entre a solução e lâmina foi de 2 horas. Após este período a mesma foi lavada por gotejamento com água padrão mili-Q durante 1 minuto.

A preparação das amostras de DNA usando a mica como substrato seguiu o seguinte procedimento:

a) Clivagem da mica, para obtenção de superfície plana e limpa.

b) Após a clivagem as lâminas de mica ficaram expostas a uma atmosfera de APTES por duas horas, em placa de petri. A quantidade de APTES utilizada foi de 10 ml de solução pura.

As imagens foram obtidas em microscópio de varredura de probe (força atômica/tunelamento), Topometrix mod. TMX 2010. Foram utilizadas agulhas de Nitreto de Silício (Si₃N₄) específicas para modo não contato. As frequências de varreduras utilizadas foram variaram na faixa de 0,5 a 2,0 Hz.

Na figura 1 são apresentadas as imagens de DNA obtidas com a deposição em suporte de vidro hidrofílica. Nota-se a grande rugosidade do substrato mostrado pela granulação mais fina apresentada. O DNA circular, sobressai na imagem tridimensional (b)

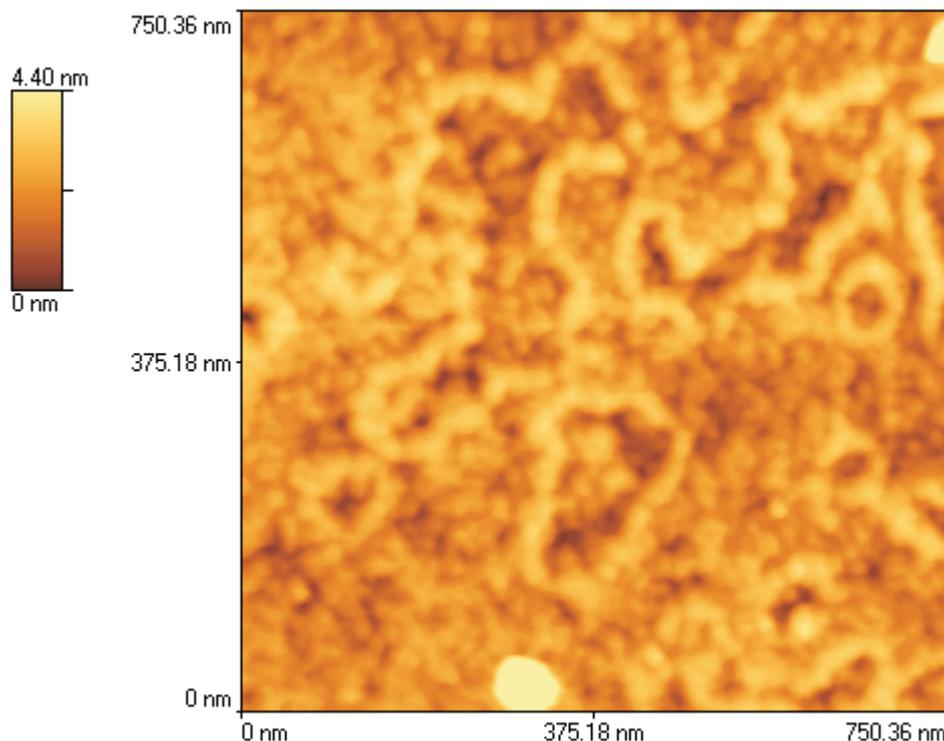


Figura 1 Amostra de DNA preparada em lamínulas de vidro hidrofílicas

PA/20, CNPDIA, dez/97, p.3

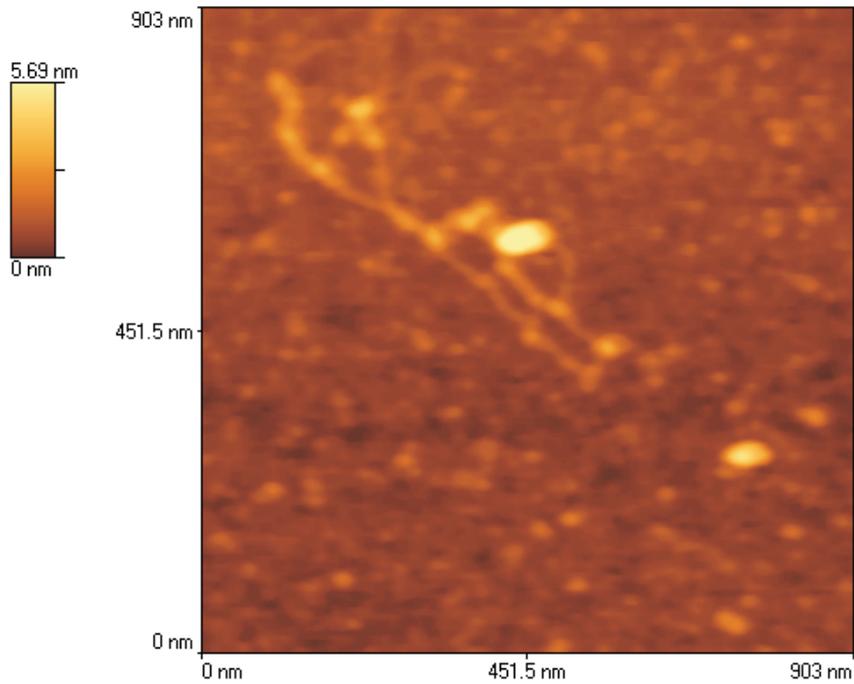


Figura 2 Amostra de DNA preparada em lâminas de mica

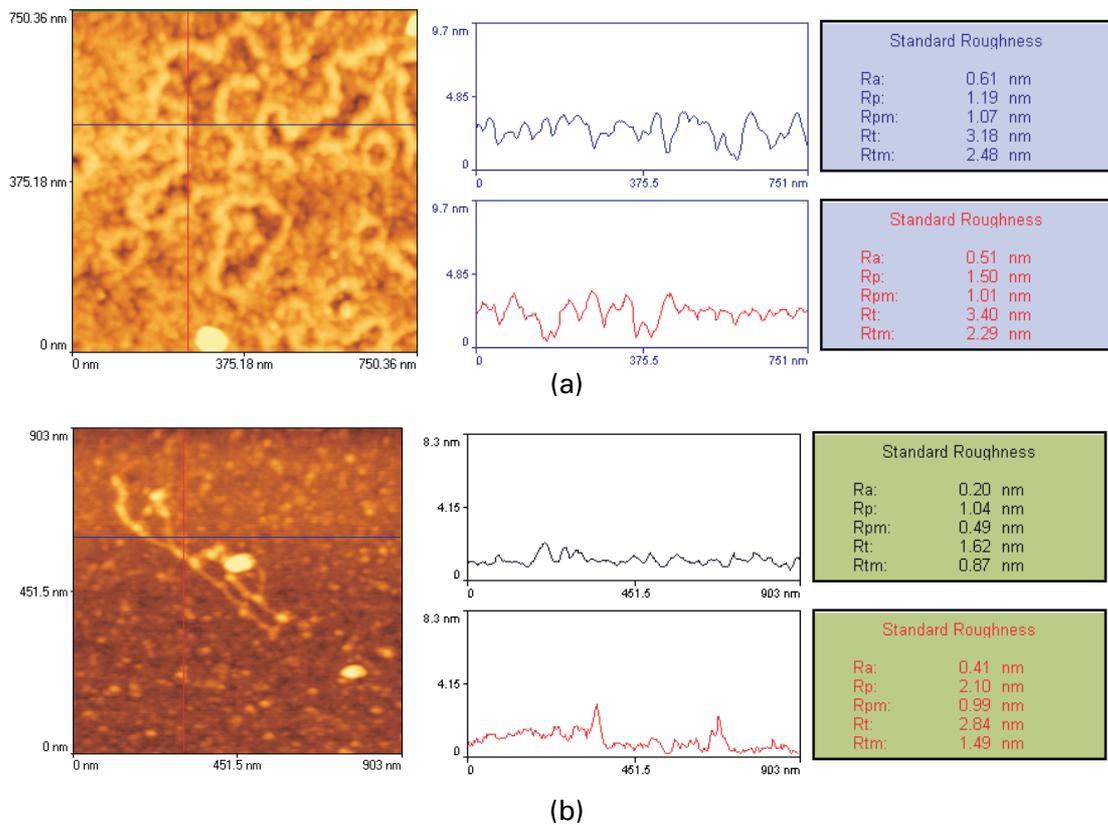


Figura 3 Comparação dos valores de rugosidade com DNA em vidro (a) e mica (b).

As linhas dos gráficos se referem as topografias das linhas assinaladas nas imagens, sendo: o primeiro referente a linha horizontal, o segundo a linha vertical e o ultimo a linha inclinada.

PA/20, CNPDIA, dez/97, p.4

Segundo Lybchencko et al, 1993, a APTES serve para funcionalizar a superfície da mica com grupos amina os quais protonam em pH neutro. Esta modificação favorece a fixação do DNA na mica.

Foram feitas medidas de rugosidade das amostras em vidro e mica. Na figura 3 são apresentados valores de rugosidade medidas nas linhas. Nota-se que o valor obtido para a mica foi inferior ao obtido com as amostras preparadas em vidro. Isto se deve a que o vidro foi polido e a mica e formada por monocamadas com dimensões atômicas. Os pontos que aparecem nas imagens realizadas em mica pode ter diversas origens: excesso de APTES na preparação do substrato, material em suspensão na solução de DNA ou contaminação da amostra.

As amostras de DNA preparadas em vidro apresentaram largura bem superior as preparadas em mica, com aumento de largura da ordem de 50%.

Referencia Bibliográfica

LYBCHENKO, Y.L., ODEN, P.I., LAMPNER, D., LINDSAY, S.M., DUNKER, K.A Atomic force microscopy do DNA and bacteriophage in air, water and propanol: the role of adhesion forces. **Nucleic Acids Research**, v. 21, n. 5, p. 1117 -23,1993.