



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Centro Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento de Instrumentação Agropecuária  
Ministério da Agricultura e do AbastecimentoRua XV de Novembro, 1452 - Caixa Postal 741 - CEP 13560-970 - São Carlos - SP  
Telefone: (16) 274 2477 - Fax: (16) 272 5958 - e-mail: [postmaster@cnpdia.embrapa.br](mailto:postmaster@cnpdia.embrapa.br)

ISSN 1413-6244

# COMUNICADO TÉCNICO

Nº 20, set/97, p.1-7

## PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS DE BACTÉRIAS PARA REALIZAÇÃO DE IMAGENS DE MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA.

Denise Osiro<sup>1</sup>  
Rubens Bernardes Filho<sup>1,2</sup>  
Luiz Alberto Colnago<sup>2</sup>

O desenvolvimento da microscopia de força atômica (AFM - atomic force microscopy) (Binnig et al, 1986) a partir da microscopia de tunelamento, possibilitou grande aumento da gama aplicações de microscopia de varredura de probe, que na microscopia de tunelamento necessitava de amostras condutoras, esta necessidade foi superada com o uso dos sistema de agulhas de força atômica (cantilever). Estas são montadas sob uma lâmina delgada muito flexível que consegue "sentir" as nuvens eletrônicas dos átomos das amostras (figura 1).

A AFM tem sido usadas na visualização de característica topográficas, eletrônicas e magnéticas de superfícies na escala atômica (Magonov, 1993). O microscópio de tunelamento de elétrons e microscópio de força atômica são membros chave de uma nova classe de microscópio, denominados de microscópio de varredura de probe (SPM - scanning probe microscope).

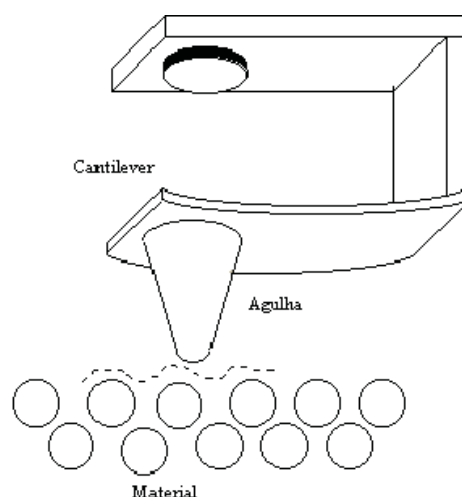


FIGURA 1- Desenho esquemático do microscópio de força atômica AFM

<sup>1</sup> Aluno de pós-graduação do Instituto de Química de São Carlos - USP

<sup>2</sup> Pesquisador da Embrapa Instrumentação Agropecuária, C. Postal 741, CEP 13560-970, São Carlos-SP

CT/20, CNPDIA, out/97, p.2

O desenvolvimento da técnica de AFM tem permitido o estudo de diversos tipos de amostras com preparação em vários tipos de substratos, pois ambos não necessitam ser condutores como no caso da microscopia de tunelamento.

Neste relato são apresentadas algumas formas de preparação de amostras de bactérias tipo E. coli que foram adaptadas da literatura e com as quais foram obtidos resultados semelhantes em várias amostras preparadas.

O equipamento utilizado para realização das imagens foi um microscópio de varredura de probe (força atômica/tunelamento), Topometrix modelo TMX 2010. Foi utilizado "scanner" de 70m. As agulhas usadas foram de silício com constante de mola de 40 N/m.

As amostras foram preparadas em lâminas de vidro, previamente submetidas ao tratamento denominado de hidrofiliação, que consiste numa série de banhos realizados em condições controladas. Este processo tem duas finalidades: realizar a limpeza da superfície do substrato e aumentar a concentração de cargas superficiais aonde as bactéria deverão se ligar. No trabalho realizado por Herrmann et all (1995), foram utilizados mais alguns banhos com tulueno e metanol, os quais não se mostraram necessários para este tipo de amostra, pois após experimentos com os dois tipos de tratamento os resultados foram idênticos.

Processo:

- a) **Primeiro banho:**  $H_2SO_4$  (concentrado)/  $H_2O_2$  (concentrado) na proporção de 7:3. Deixa-se a solução aquecer até estabilizar em  $T = 80C$ . e coloca-se as lâminas. Em seguida coloca-se a solução com as lâminas durante 1 hora na câmara de ultra-som.
- b) **Lavar exaustivamente as lâminas com água ultra-limpa (mili-Q).**
- c) **Segundo banho:**  $H_2O$  (ultra-limpa)/  $H_2O_2$  (concentrado)/  $NH_4OH$  (concentrado) na proporção de 5:1:1. Deixa-se as lâminas durante 30 minutos neste banho na câmara de ultra-som.
- d) Lavar as lâminas com grande quantidade de água ultra-limpa.

Após a seqüência de banhos e limpeza as lâminas foram acondicionadas em dissecador por 24 para remoção completa água. Decorrido este período, as amostras foram preparadas pingando-se uma gota de solução diluída de bactérias, esta permaneceu em contato com as lâminas por um período de 30 minutos, e depois a gota foi removida por processo de lavagem com água ultra-limpa. Novamente as lâminas foram colocadas em dissecador por mais 24h para secagem.

As bactérias foram crescidas em meio M9 seguindo o protocolo padrão. Este meio foi o escolhido por possibilitar a manutenção dos *sex pilus*, das mesmas.

Nas figuras 2 e 3 são apresentadas algumas imagens das bactérias preparadas como descrito acima. Em todas foi utilizado campo útil de 6 m que foi suficiente para permitir a visualização da superfície exposta da bactéria.

A imagens mostraram repetibilidade indicando a eficiência do método de preparo das superfícies. Outro fator relevante foi a pequena quantidade de material depositado, ou seja, a imagem obtida ficou limpa de material contaminante ou resíduos decorrente dos polimento das lâminas de vidro

CT/20, CNPDIA, out/97, p.3

utilizadas, este fato contribuiu para facilitar a visualização dos *sex pilus* das E coli (figura 2 (c)).

As diferenças comprimento observadas entre as bactérias da figura 3 (b) e (a) podem ser devido a esta se encontrar em processo de reprodução.

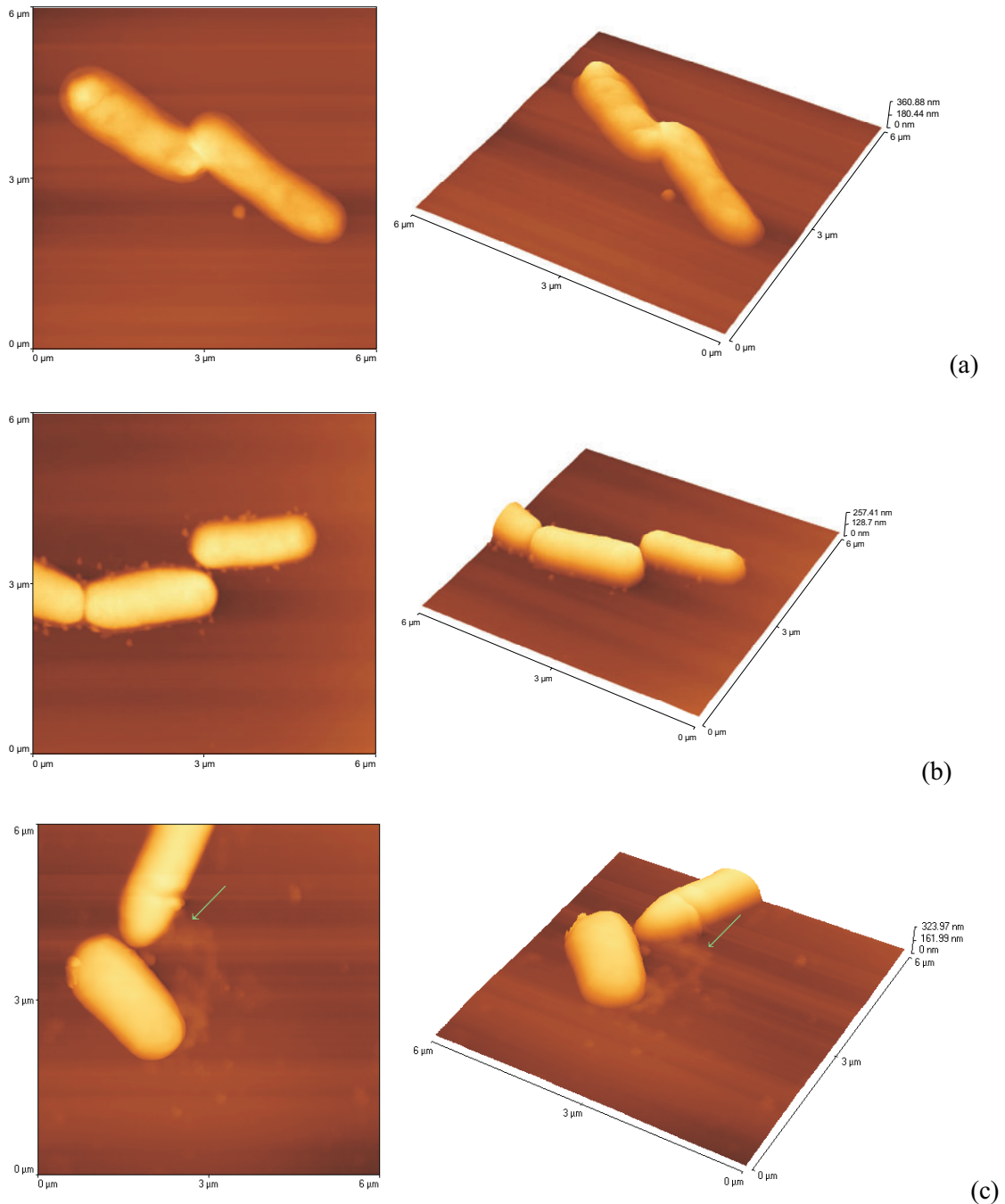
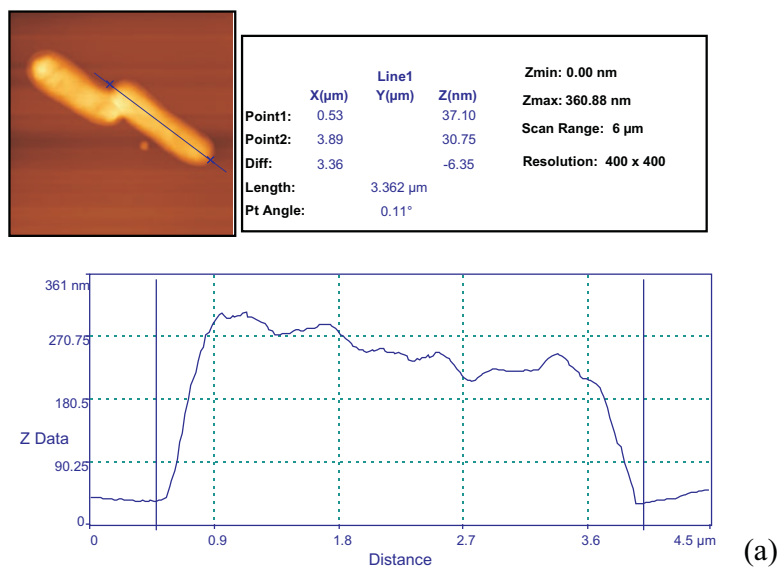
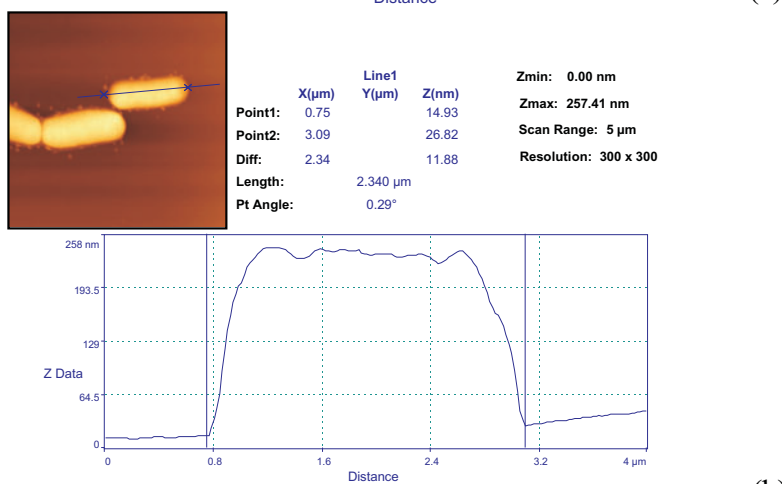


Figura 2 - Imagens de bactérias E. coli obtidas com técnica de não-contato denominada "near contact". Na imagem (c) podem ser identificados alguns filamentos laterais às bactérias (seta), estes são os "sex pilus".

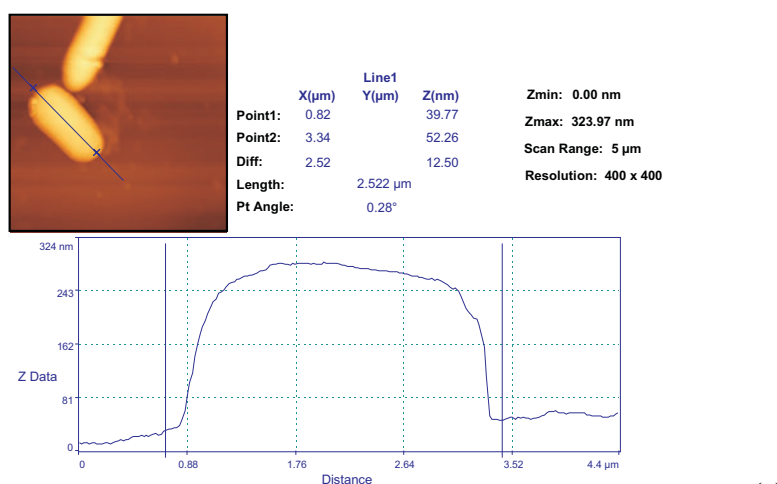
CT/20, CNPDIA, out/97, p.4



(a)



(b)



(c)

Figura 3 - Medida de comprimento das bactérias. Os valores obtidos para os comprimentos estão dentro do esperado apenas a bactéria da imagem 1 apresentou um comprimento um pouco maior que pode ser atribuído a esta se encontra em estágio de reprodução (bipartição).

CT/20, CNPDIA, out/97, p.5

### Referências Bibliográficas.

- ALLISON, D.P.; BOTTOMLEY, L.A.; THUNDAT, T.; BROWN, G.M.; WOYCHIK, R.P.; SCHRICK, J.J.; JACOBSON, K.B.; WARMACK, R.J. Immobilization of DNA for scanning probe microscopy. Proc. Natl. Acad. Sci., v.89, p.10129-10133, 1992.
- AMREIN, M.; MARTI, O.; STM and SFM in biology. London, Academic Press, 1994. p.2-85.
- BINNIG, G.; QUATE, C.F.; GERBER, C.H. Atomic force microscope. Phys. Rev. Lett., v. 56, p. 930, 1986.
- BINNIG, G.; ROHRER, H.; GERBER, Ch.; WEIBEL, E. Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy. Phys. Rev. Lett., v. 49, n.1, p. 57-61, 1982 .
- CLACKSON, T.; WELLS, J. A. In vitro selection from protein and peptide libraries. Tibtech, v.12, p.173-184, May, 1994.
- COLNAGO, L.A. Desvendando os mistérios da vida molecular. Ciência Hoje, v.13, p.24-29, 1991.
- COLNAGO, L.A.; LEO, G.L.; VALENTINE, K.G.; OPELLA, S.J. Direct comparison of the membrane bound structural forms of the coat protein of filamentous bacteriophage fd. In: SARMA, R.H. & SARMA, M.H., ed. Proceeding of the fourth conversation in the discipline biomolecular stereodynamics. New York, Adenine Press. p.147-157, 1986.
- COLNAGO, L.A.; VALENTINE, K.G.; OPELLA, S.J. Dynamics of the fd coat protein in the bacteriophage. Biochemistry, v.26, p.847-853, 1987.
- CORTESE, R.; et al. Epitope discovery using peptide libraries displayed on phage. Tibtech, v.12, p. 262-267, 1994.
- DROZ, E., TABORELLI, M., WELLS, T.N.C., DESCOUTS, P., Preparation of isolated biomolecules for STM observations: T4 bacteriophage as a test sample. Biophys. J., v. 65, p. 1180-1187, 1993.
- DUCKER, W.A.; COOK, R.F.; CLARKE, D.R. Força measurement using an ac atomic force microscope. J. Appl. Phys., v. 67, n. 9, p. 4045 - 4052.
- FRITZ, M.; RADMACHER, M.; ALLERSMA, M.W.; CLEVELAND, J.P.; STEWART, R.J.; HANSMA, P.K.; SCHIMIDT, C.F. Imaging microtubules in buffer solution using tapping mode atomic force microscopy. Proceedings Reprint, v.2384, p. 150- 157, 1995.
- GREENWOOD, J.; WILLIS, A. E.; PERHAM, R. N. Multiple Display of Foreign Peptides on a Filamentous Bacteriophage. J. Mol. Biol., v, 220, p.821-827, 1991.
- GLUCKSMAN, M.J.; BHATTACHARJEE, S.; MAKOWSKI, L. Three-dimensional Structure of a Cloning Vector X-ray Diffraction Studies of Filamentous Bacteriophage M13 at 7 Resolution. J. Mol. Biol., v.266, p.455-470, 1992.
- HAGGERTY, L. AND LENHOFF, A. M. STM and AFM in Biotechnology. Biotechnol. Prog., v. 9, p.1-11, 1993.
- HANSMA, P.K.; ELINGS, V.B.; MARTI, O.; BRACKER, C.E. Scanning Tunneling Microscopy and Atomic Force Microscopy: Application to Biology and Technology. Science, v. 242, p.209-216, 1988.

CT/20, CNPDIA, out/97, p.6

- HERMANN, P.S.P.; MATTOSO, L.H.C.; RAPOSO, M.F.; JUNIOR, O.N.O.; COLNAGO, L.A. Preparação e Caracterização de Filmes Ultrafinos de Lisozima, Automontado em Quartzo. In: Encontro Regional de Química. SBQ, 11, Araraquara, 16-17 novembro. RESUMO, p 72,1995.
- ILYICHEV, A. A.; et al. Inserting foreign peptides into the major coat protein of bacteriophage M13. FEBS LETTERS, v.310, n. 3, p.322-324, 1992.
- IMAI, K.; YOSHIMURA, K.; TOMITORI, M.; NISHIKAWA, O.; KOKAWA, R.; YAMAMOTO, M.; KOBAYASHI, M.; IKAI, A. Scanning tunneling and atomic force microscopy of T4 bacteriophage and tobacco mosaic virus. Jpn. J. Appl. Phys. v.32, p.2962-2964, 1993.
- KELLER R.W.;DUNLAP, D.D.; BUSTAMANTE,C.; KELLER, D.J.; GARCIA, R.G.; GRAY, C.; MAESTRE,M.F. Scanning tunneling microscopy images of metal-coated bacteriophages and uncoated, double-stranded DNA. J. Vac. Sci. Technol. A .v.8, p.706-712, 1990.
- KOLBE, W.F.; OGLETTREE, D.F.; SALMERON, M.B. Atomic force microscopy imaging of T4 bacteriophages on silicon substrates. Ultramicroscopy v. 42-44, p.1113-1117, 1992.
- LEO, G.C.; COLNAGO, L.A.; VALENTINE, K.G.; OPELLA, S.J. Dynamics of fd coat protein in lipids bilayers. Biochemistry, v.26, p.854-863, 1987.
- LI, M.-Q.; HANSMA, H. G.; VESENKA, J.; KELDERMAN, G.; HANSMA, P.K. Atomic Force Microscopy of Uncoated Plasmid DNA: Nanometer Resolution with only Nanogram Amounts Sample. Journal of Biomolecular Structure & Dinamics, v.10, n. 3, p. 607-617, 1992.
- LYUBCHENKO, Y.L.; JACOBS, B.L.; LINDSAY, S.M.; STASIAK, A. Atomic force microscopy of nucleoprotein complexes. Scanning Microscopy, v.9, nº 3, p.705-727, 1995.
- LYUBCHENKO, Y.L.; ODEN, P.I.; LAMPNER, D.; LINDSAY, S.M; DUNKER, K.A. Atomic force microscopy of DNA and bacteriophage in air, water and propanol: the role of adhesion forces. Nuclei Acids Research v.21, nº 5, p.1117-1123, 1993.
- MAGONOV, S.N. Surface Characterization of Materials at Ambient Conditions by Scanning Tunneling Microscopy (STM) and Atomic Force Microscopy (AFM). Applied Spectroscopy Reviews, v. 28, n. 1e2, p. 1-121, 1993.
- MORRIS, V.J. Biological applications of scanning probe microscopies. Prog. Biophys. molec. Biol., v.61, p. 131-185, 1994.
- POSNER, B.; et al..Catalytic antibodies: perusing combinatorial libraries. Techniques, v.19, p.145-150, 1994.
- ROBERTS, C.J.; WILLIAMS, P.M.; DAVIES, M.C.; JACKSON, D.E. and TENDLER, S.J.B. Atomic Force Microscopy and Scanning Tunnelling Microscopy: Refining Techniques for Studying Biomolecules., Tibtech April, v. 12, p. 127-132, 1994.
- SALMERON, M.; BEEBE, T.; ODRIEZOLA, J.; WILSON, T.; OGLETTREE, D.F.; SIEKHAUS, W. Imaging of biomolecules with the scanning tunneling microscope: Problems and prospects. J. Vac. Sci. Technol. A, v.8, n.1, p. 635 - 641, 1990.
- SARID, D.; ELINGS, V. Review of scanning force microscopy., J. Vac. Sci. Technol. B, v.9, p. 431- 437, 1991.

CT/20, CNPDIA, out/97, p.7

THIAUDIERE, E.; SOEKARJO, M.; KUCHINKA, E.; KUHN, A.; VOGEL, H. Structural Characterization of Membrane Insertion of M13 Procoat, M13 Coat, and PF3 Coat Proteins. Biochemistry, v.32, p.12186-12196, 1993.

THUNDAT, T.; ZHENG, X-Y.; SHARP, S.L.; ALLISON, D.P.; WARMACK, R.J.; JOY, D.C.; FERRELL, T.L. Scanning Microscopy, v. 6, p. 903-910, 1992.

VALADARES, E.C.; CURY, L.A.; HENINI, M. Dispositivos Eletrônicos em Escala Atômica. Ciência Hoje, v.18, n.106, p.40-49, 1995.