

RELATÓRIO FINAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA:

**Interação de proteínas com superfícies
funcionalizadas: microalavancas como
sensores biológicos**



Máira Alves Constantino
Orientadora: Profa. Mônica Alonso Cotta
Professor Responsável: Dr. José Joaquim Lunazzi

IFGW / UNICAMP
Junho / 2006

I. RESUMO

Nesse relatório parcial mostraremos que é possível detectar a presença de uma proteína (Rab GTPase 11B) em uma solução, utilizando microalavancas funcionalizadas. Essa técnica utiliza o microscópio de força atômica (AFM) no modo dinâmico, ou seja, utiliza o sistema de deflexão óptica deste equipamento para monitorar a variação da frequência de ressonância da alavanca funcionalizada na medida em que aumentamos a concentração de proteína.

II. INTRODUÇÃO

Microalavancas têm atraído muita atenção nos últimos anos nos sistemas microeletrônicos (MEMS) devido a sua aplicabilidade como sensores químicos [1] e biológicos [1, 2]. O sensor químico consiste de um transdutor físico, e de uma camada quimicamente seletiva para que sinais de saída mensuráveis possam produzir uma resposta ao estímulo químico [1]. As microalavancas utilizadas como biosensores são de extrema importância, pois permitem detectar o substrato desejado sem interferir em sua estrutura ou atividade. Eles também superam as técnicas antigas devido a sua alta sensibilidade, podendo detectar apenas uma célula [3, 4]. Neste método a detecção é observada devido à alteração da frequência de ressonância da alavanca que se deve a mudança de massa.

Utilizaremos a proteína Rab GTPase [5], escolhida pela possibilidade de ligação ao ouro, que por sua vez pode ser depositado na microalavanca. As Rab GTPases despertaram interesse de vários pesquisadores por serem importantes proteínas do transporte vesicular, ajudando na regulação de diferentes estruturas intracelulares. Algumas doenças podem ser causadas devido a mutação de uma Rab GTPase, assim como a Síndrome de Griscelli (que causa albinismo parcial), e a Choroideremia (causa cegueira) [6],

III. METODOLOGIA

1) Material

Utilizamos a proteína RAB GTPase 11B, e para mantê-la conservada, a guardamos em uma geladeira convencional. Ela foi obtida numa colaboração com o Dr. Nilson Zanchin, do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS).

A família Rab é parte da superfamília Ras das pequenas GTPases. Elas foram encontradas em todos os eucariontes já investigados e são componentes importantíssimos no transporte vesicular intracelular, que divide as proteínas Rab em dois subgrupos, um envolvido na secreção regulada e o outro envolvido em outros transportes vesiculares, sendo essenciais para essa última função.

A Rab 11B possui uma massa de aproximadamente 25kDa [7], ou $4,15 \times 10^{-5}$ fg e tem como papel específico dentro do transporte vesicular, a reciclagem de materiais [8].

A estrutura dessa proteína é bem complexa, mas é de extrema importância saber que perto da terminação -COOH, ela possui duas cisteínas (fig 3.1). Essa conformação é essencial para a ligação com membranas. Por outro lado, são as cisteínas as estruturas que podem permitir a ligação da proteína com o ouro da microalavanca metalizada.

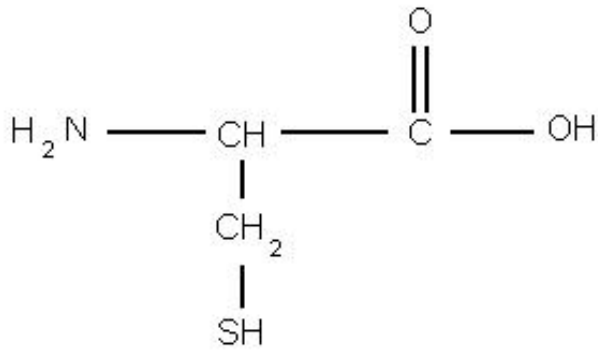


Figura 3.1: estrutura de uma cisteína. [9]

2) Técnica

As medidas foram primeiramente realizadas utilizando o Microscópio de Força Atômica (AFM) modelo AutoProbe CP, no qual apenas iniciamos a obtenção de dados. O trabalho foi interrompido por problemas técnicos no equipamento. Retomamos as medidas somente depois da chegada do novo AFM, modelo PicoPlus da Molecular Imaging (MI), sendo antes necessário aprender como utilizá-lo, juntamente com os demais elementos do grupo.

i) AFM

Com o AFM fomos capazes de monitorar a frequência da alavanca, e suas pequenas variações, utilizando um sistema de medida via deflexão óptica, também chamado de modo dinâmico. Neste modo um feixe de laser incide na microalavanca e é refletido para um detector sensível a posição. Deste modo, movimentos da alavanca implicam em movimento do feixe laser sobre o detector, que podem ser monitorados com a eletrônica de controle do microscópio.

Microalavancas atuando nesse modo são essencialmente osciladores mecânicos, cujas características de ressonância dependem da massa anexada. Em suma, a adsorção de moléculas na alavanca resulta na diminuição de sua frequência de ressonância devido ao aumento de massa.

A frequência do sinal que é aplicado na alavanca, fornecida pelo equipamento, varre um intervalo que definimos e com um número de pontos que pode ser de 300 a 2000 (fig 4.1).

Para calcularmos a quantidade de massa aderida, temos a equação (1) [2]

$$\Delta m = \frac{k}{4n\pi^2} \left(\frac{1}{f_1^2} - \frac{1}{f_0^2} \right) \quad (1)$$

Onde Δm = variação da massa, k = constante da mola da alavanca, f_1 = frequência após a adição de massa, f_0 = a frequência inicial de ressonância antes da adição de massa e $n = 0.18$ para alavancas triangulares de silício.

ii) Microalavanca e metalização

Nós utilizamos as alavancas triangulares UL20C, Non-Contact Ultralevers, da ThermoMicroscopes, feitas de silício, com constante de mola $k \sim 13\text{N/m}$. Cada *chip* comporta quatro alavancas, A, B, C, D, diferentes em tamanho e espessura. Para que a proteína se ligasse com a alavanca foi antes necessário metalizá-la.

Para este procedimento utilizamos a técnica de evaporação térmica, depositando primeiramente uma camada de cromo de espessura 20 nm para fazer a ligação entre o material da alavanca (Si) e o ouro, e posteriormente uma camada de espessura de 20nm de ouro. Para evitar que a alavanca entortasse devido ao *stress* do filme de Cr, a metalização foi feita dos dois lados. As metalizações foram realizadas utilizando a infraestrutura de sala limpa do LPD / IFGW / UNICAMP.

iii) Procedimentos de medidas

Ao colocar a microalavanca funcionalizada em contato com a proteína diluída, esperamos um aumento de massa devido a ligação das cisteínas da GTPase com o ouro (S-Au), o que resulta em uma diminuição da frequência de ressonância da alavanca. Deste modo podemos detectar a presença da proteína.

Utilizamos inicialmente uma concentração de $10\mu\text{g}/300\mu\text{l}$ de proteína / água .A preparação é simples: com uma pipeta colocamos $10\mu\text{l}$ de proteína, de concentração $1\text{mg}/1\text{ml}$, no suporte de amostras e em seguida $290\mu\text{l}$ de água, trocando de pipeta para evitar a contaminação de qualquer uma das substâncias. Misturamos a proteína na água utilizando outra pipeta, para que a amostra fique uniforme.

Para economizar tempo e proteína, ao invés de refazermos o processo anterior em outra concentração, utilizamos a mesma amostra aumentando a quantidade de proteína, de maneira que a quantidade total de líquido permaneça a mesma, $300\mu\text{l}$.

Para começarmos as medidas, colocamos a microalavanca no AFM e ajustamos o laser e o detector em uma das quatro pontas (escolhemos a mais perfeita aparentemente). Utilizando o *software* PicoScan, de controle do AFM, medimos a amplitude de vibração da alavanca em função da frequência do sinal a ela aplicado. Com isso verificamos a frequência de ressonância natural da alavanca.

Muitas vezes, devido à metalização ou a um defeito da própria ponta, não encontramos uma boa frequência, então temos que escolher uma outra ponta e refazer os passos anteriores.

Obtendo uma boa frequência de ressonância, já temos o primeiro dado experimental. Em seguida colocamos o suporte de amostra (já com a proteína diluída) e aproximamos a ponta do líquido até que a ponta esteja imersa, deixando 15 minutos para que haja tempo da proteína se ligar ao ouro. Depois desse tempo emergimos a ponta e a deixamos secar por 30 minutos; deste modo a água evapora e só permanece na ponta a proteína aderida. Um experimento controle, onde a alavanca é exposta somente à água, foi realizado. Neste caso, a frequência de ressonância volta ao seu valor inicial após o tempo de 30 minutos para a evaporação da água.

Com a ponta completamente seca, retiramos o suporte de amostras e aumentamos a concentração de proteína. Colocamos novamente a amostra no AFM e repetimos o procedimento descrito. Repetimos esse procedimento algumas vezes, para obtermos mais medidas com diferentes concentrações.

IV. RESULTADOS

Com o procedimento descrito na técnica (seção III.2) pudemos obter os seguintes resultados:

	Frequência [kHz]	Concentração $\pm 8 \times 10^{-5}$ (proteína / água) [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]
1	363,650 \pm 0.001	-
2	363,626 \pm 0.001	1 / 30
3	363,598 \pm 0.001	1 / 21,05
4	363,591 \pm 0.001	1 / 16
5	363,587 \pm 0.001	1 / 10,8

Tabela 4.1: frequência obtida com cada concentração.

O erro da concentração foi obtido por propagação de erros, sendo o erro da pipeta de $\pm 0.025 \mu\text{l}$. O erro da frequência foi obtido dividindo o intervalo de frequência da medida pelo número de pontos, demonstrado na figura 4.1. A resolução do AFM para a medida da frequência é de 0.5Hz e o máximo é identificado pelo software.

Pode-se observar pela tabela que há uma diminuição da frequência de ressonância à medida em que aumentamos a concentração de proteína, o que seria esperado caso a proteína se ligue à alavanca.

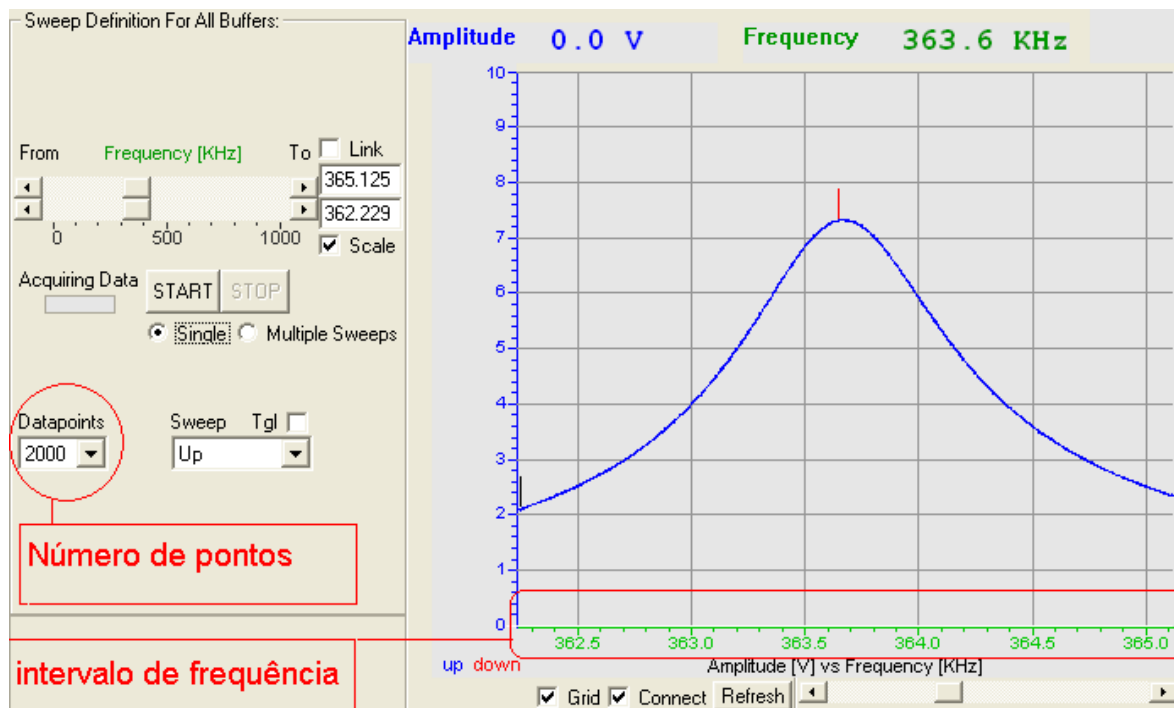


Figura 4.1: janela para medida de frequência no software PicoScan.

Para plotarmos um gráfico da concentração pela variação percentual de frequência, temos a seguinte tabela:

	Variação percentual da frequência [kHz]	Concentração [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]
1	$6,6 \times 10^{-3} \pm 4 \times 10^{-4}$	$3,333 \times 10^{-2} \pm 8 \times 10^{-5}$
2	$1,43 \times 10^{-2} \pm 4 \times 10^{-4}$	$4,740 \times 10^{-2} \pm 8 \times 10^{-5}$
3	$1,62 \times 10^{-2} \pm 4 \times 10^{-4}$	$6,250 \times 10^{-2} \pm 8 \times 10^{-5}$
4	$1,73 \times 10^{-2} \pm 4 \times 10^{-4}$	$9,259 \times 10^{-2} \pm 8 \times 10^{-5}$

Tabela 4.2: variação percentual da frequência e concentração.

Para plotarmos um gráfico da massa aderida pela variação percentual de frequência, temos a seguinte tabela, cuja massa foi calculada com a equação (1) e seu erro através de propagação [10].

	Massa adicionada [fg]	Variação percentual de frequência [kHz]
1	1,8 \pm 0,1	$6,6 \times 10^{-3} \pm 4 \times 10^{-4}$
2	4,0 \pm 0,1	$1,43 \times 10^{-2} \pm 4 \times 10^{-4}$
3	4,5 \pm 0,1	$1,62 \times 10^{-2} \pm 4 \times 10^{-4}$
4	4,8 \pm 0,1	$1,73 \times 10^{-2} \pm 4 \times 10^{-4}$

Tabela 4.3 Massa adicionada

Observando a tabela é possível perceber que à medida que aumentamos a concentração de proteína, a massa aderida na alavanca aumenta, o que era esperado.

Com os dados da tabela 4.2, plotamos o gráfico 4.1 utilizando o software *OriginPro 7*.

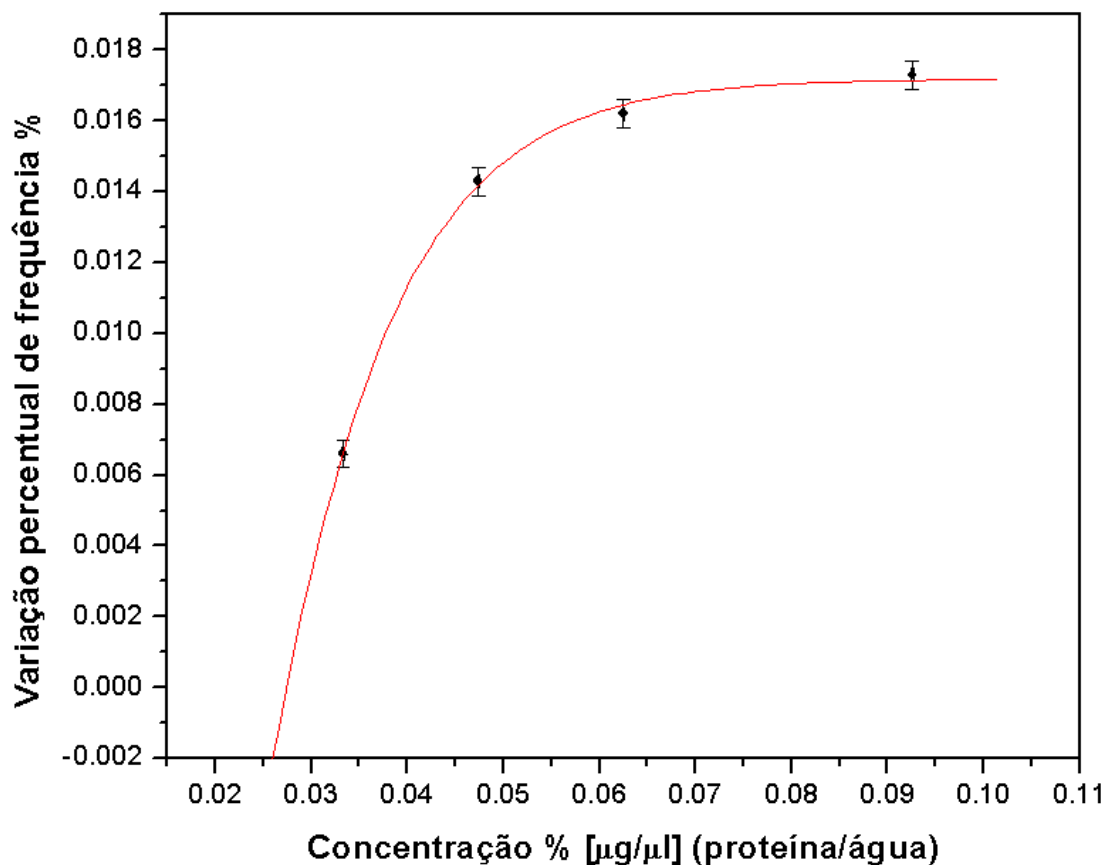


Gráfico 4.1 Variação percentual da frequência por concentração de proteína.

Para estimarmos o valor da menor concentração detectável pelo biosensor, traçamos uma curva suave que liga os pontos, utilizando o *fit sigmoidal* do Origin. Extrapolando para o valor de 1Hz, encontramos um valor de 0.02764%.

Ou seja, temos que em princípio o biosensor conseguiria detectar uma concentração mínima de aproximadamente $3 \times 10^{-4} \mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Utilizando os dados da tabela 4.3 plotamos o gráfico 4.2 da variação percentual de frequência pela quantidade de massa aderida.

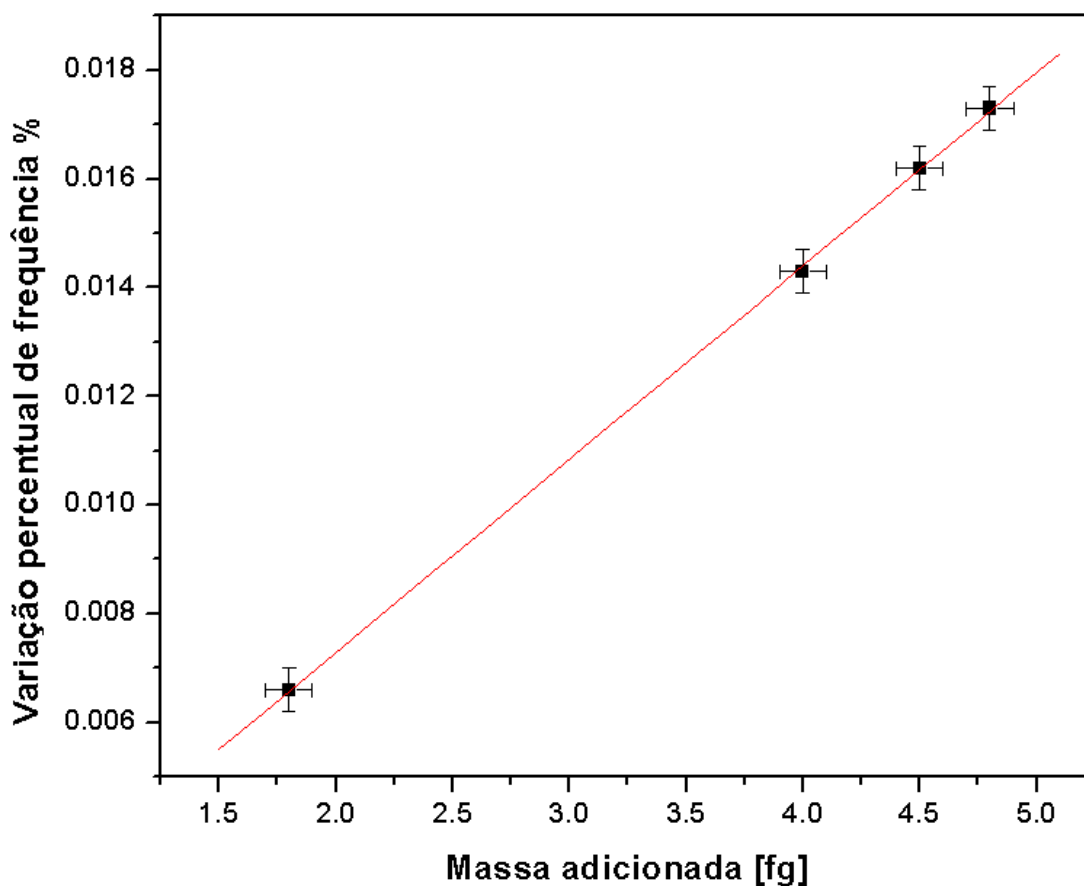


Gráfico 4.2 Variação percentual de frequência pela quantidade de massa aderida.

Utilizando a ferramenta *linear fit* traçamos uma reta ($Y = A + B * X$) e obtivemos $A=2 \times 10^{-4} \pm 1 \times 10^{-4}$ e $B=3,56 \times 10^{-3} \pm 4 \times 10^{-5}$.

Com o gráfico pudemos obter a menor variação de massa detectável; para isso localizamos na reta o valor da concentração correspondente a resolução percentual de frequência e obtivemos um resultado de 0.02861fg.

Sabendo que cada proteína Rab11B tem peso de 4.15×10^{-5} fg, calculamos que podemos detectar a adsorção de no mínimo 689 proteínas.

V. CONCLUSÃO

As principais fontes de erro se devem ao manuseio da amostra contendo proteína diluída e à evaporação da água ao decorrer do tempo.

Este primeiro semestre serviu, antes de qualquer coisa, para uma adaptação ao equipamento, assim como ao aperfeiçoamento das técnicas tanto de medidas de frequência como do manuseio da proteína. Também é relevante lembrar que houve um período em que não foi possível adquirir dados, já que estávamos sem um microscópio.

Por esse motivo, obtivemos poucas medidas até este momento.

Houve alguns problemas ao adquirir pontos em concentrações mais altas, e supomos que isso se deve a saturação da alavanca, porém já sabemos qual o intervalo que resulta em boas medidas.

Sabemos que podemos detectar variações de concentração de no mínimo 0.0003 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, o que será útil para darmos seqüência ao trabalho no próximo semestre.

Concluindo, apesar de alguns problemas, conseguimos mostrar que é possível a detecção de proteína utilizando microalavancas funcionalizadas, já que houve variações na freqüência devido ao aumento da massa.

VI - REFERÊNCIAS:

- [1] N. V. Lavrik, M. J. Sepaniak, and P. G. Datskos, *Rev. Sci. Instr.* **75**, 2229 (2004).
- [2] A. Gupta, D. Akin, and R. Bashir, *J. Vac. Sci. Technol. B* **22** (6), 2785 (2004).
- [3] B. Ilic, D. Czaplewski, M. Zalalutdinov, H. G. Craighead, P. Neuzil, C. Campagnolo and C. Batt, *J. Vac. Sci. Technol. B* **19** (6), 2825 (2001).
- [4] A. Gupta, D. Akin, and R. Bashir, *Appl. Phys. Lett.* **84**, 1976 (2004).
- [5] M. J. Tuvim, R. Adachi, S. Hoffenberg, and B. F. Dickey, *News Physiol. Sci.*, **16**, (2001).
- [6] H. Stenmark and V. N. Olkkonen, *Genome Biology* 2001, **2** (5): reviews3007.1–3007.7
- [7] D. D. MrukT, A. S.N. Lau and A. M. Conway, *Contraception* **72**, 280 (2005).
- [8] F.Lay, L. Stubbs and K. Artzt, *Genomics*, **22**, 610 (1994).
- [9] D. H. Andrews e R. J. Kokes, *Química Geral*, Ed. da Universidade de São Paulo, pág **818**.
- [10] C. H. B. Cruz, H. Fragnito, I. F. Costa e B. A. Mello, F129: Física Experimental I, Apêndices e complementos, IFGW-UNICAMP (2002), A-5.1.2 Propagação de Erros, pág **11**

VII – COMENTÁRIOS DA ORIENTADORA:

Neste período a aluna se dedicou à implementação e teste da técnica de detecção de macromoléculas utilizando microalavancas. Envolveu-se com o trabalho e mostrou bom desempenho nas atividades experimentais; com isso conseguiu bons resultados demonstrando a viabilidade da técnica.