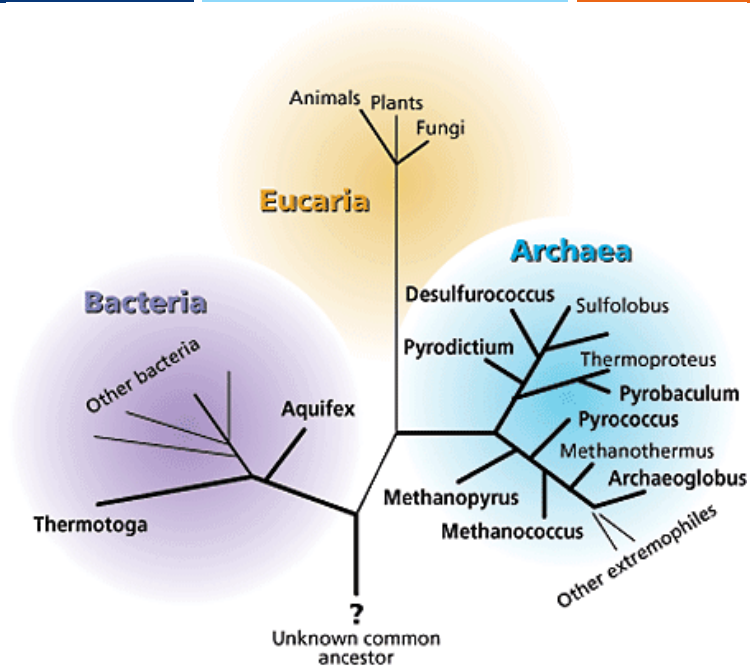


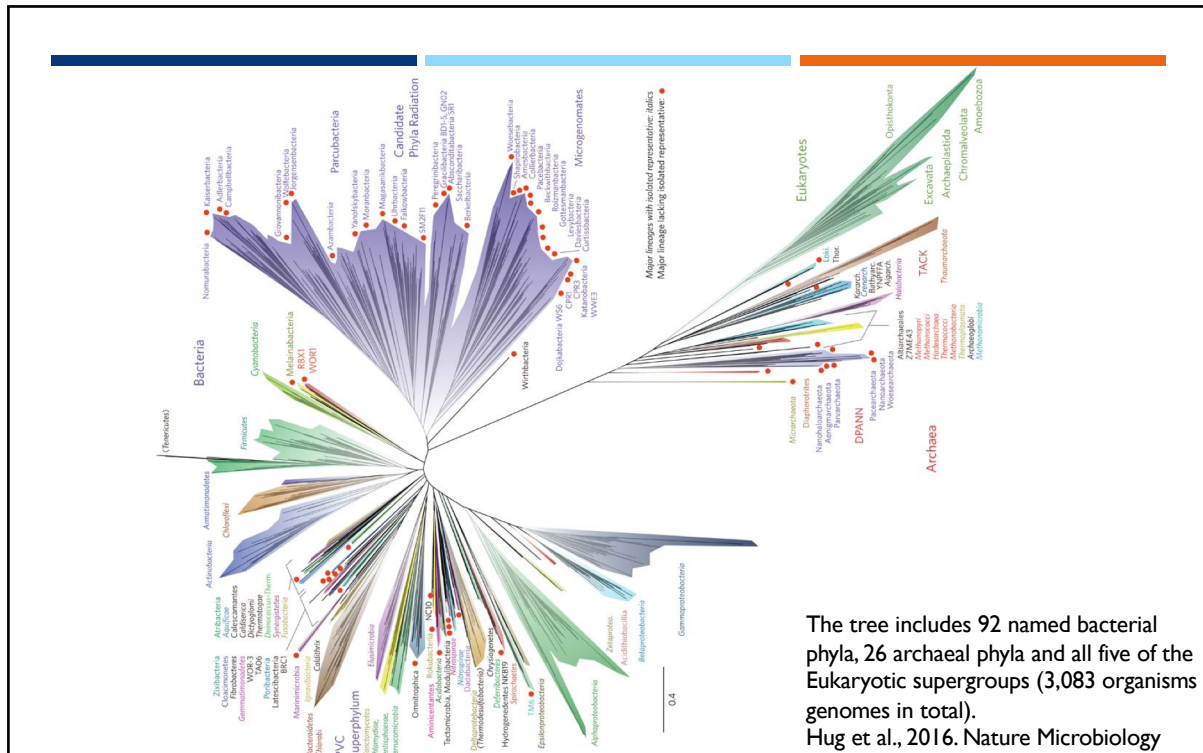
ANÁLISES MOLECULARES DE COMUNIDADES MICROBIANAS

FERNANDO DINI ANDREOTE

Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

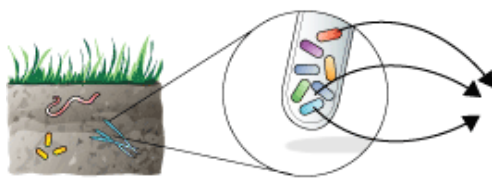
Universidade de São Paulo
Departamento de Ciência do Solo





MUDANÇA DE PARADIGMA

cultivo de células x detecção de ácido nucléicos

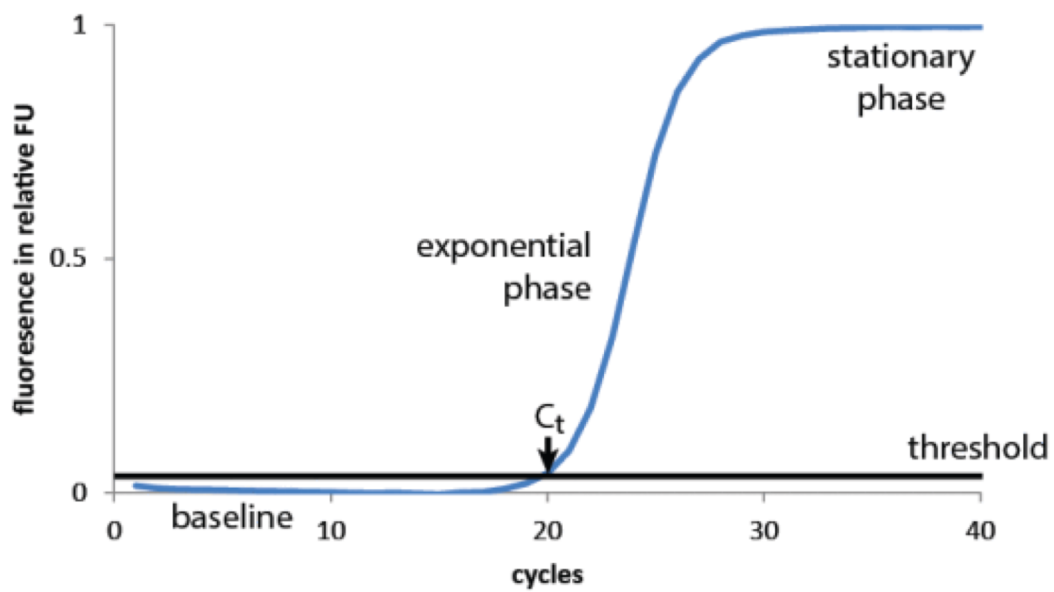
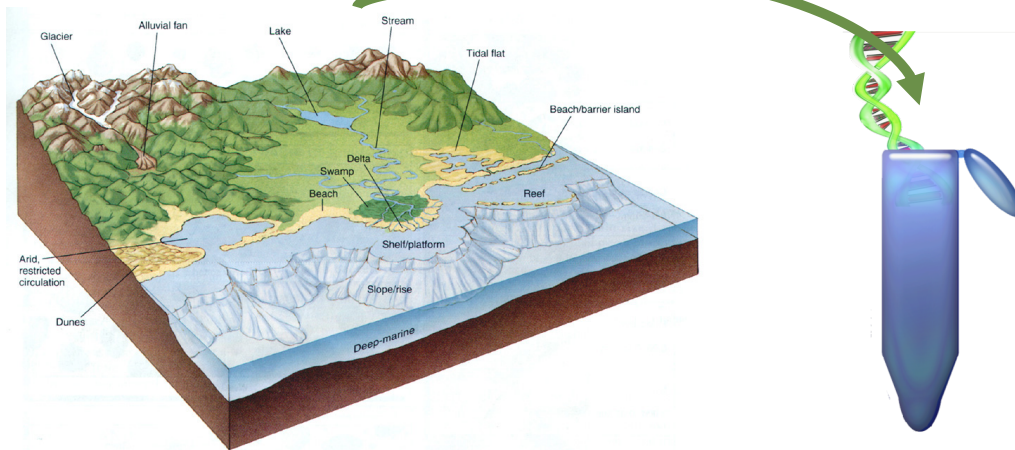


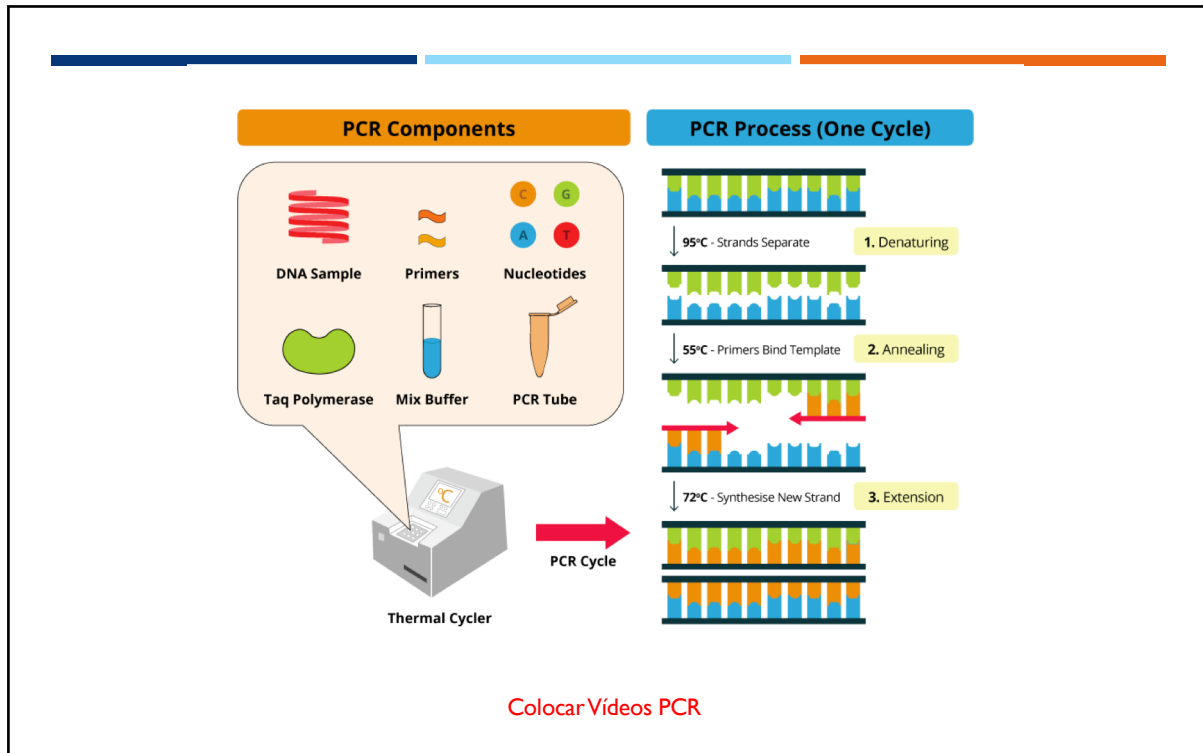
isolation of DNA from
environmental sample

Detecção e estudo de comunidades de
interesse

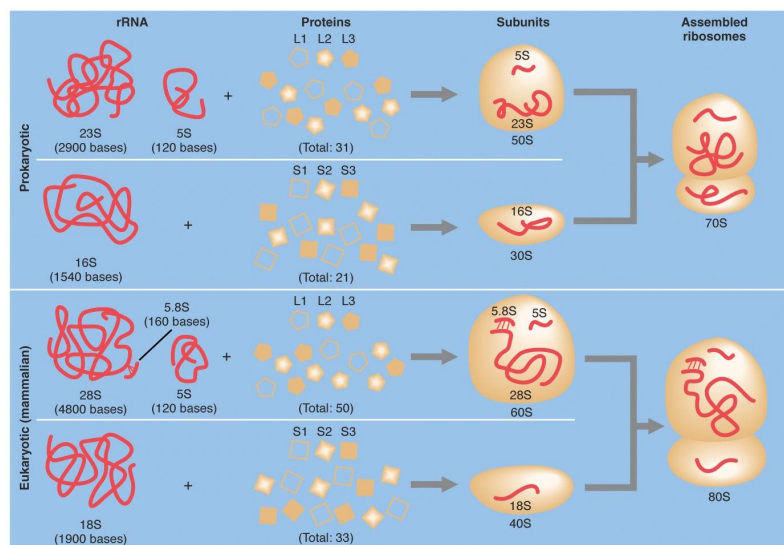
DESAFIOS METODOLÓGICOS

1. Extração dos ácidos nucleicos: DNA ou RNA





GENES MARCADORES – OS GENES RIBOSSOMAIS

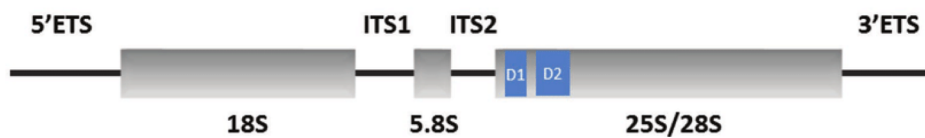


GENES MARCADORES – OS GENES RIBOSSOMAIS

Bacteria

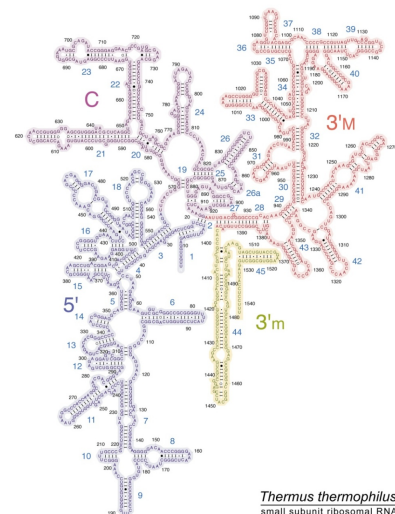


Eukaryotes



GENES MARCADORES – OS GENES RIBOSSOMAIS

- ✓ Essencial na síntese de ribossomos
- ✓ Composto de regiões conservadas e variáveis
- ✓ Ótimo cronômetro evolutivo
- ✓ Mais usado para procariotos: 16S rDNA
- ✓ Mais usados para eucariotos: 18S rDNA e ITS



Thermus thermophilus
small subunit ribosomal RNA

GENES MARCADORES – OUTROS GENES MARCADORES

Filogenéticos - baseado no 16S DNAr

Funcionais - outros gene

Alphaproteobacteria

mxnF

Paenibacillus spp.

amoA

nirK

Acidobacteria

mcrA

Betaproteobacteria

nifH

nirS

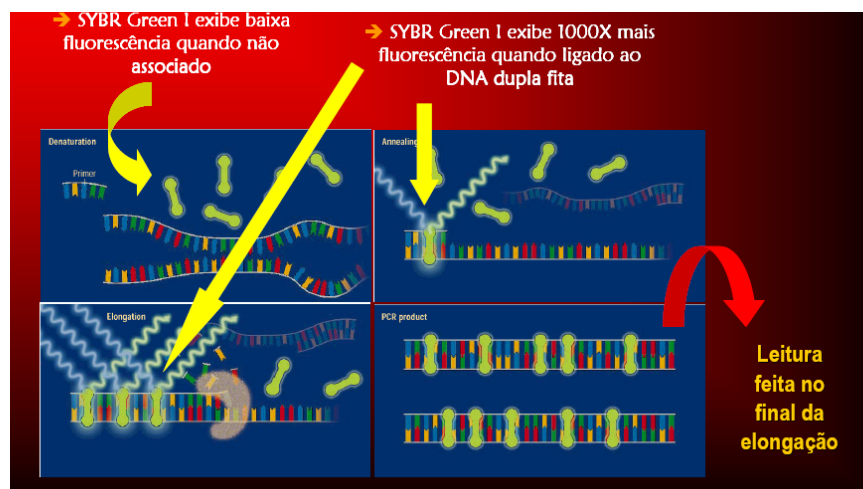
Burkholderia spp.

MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO

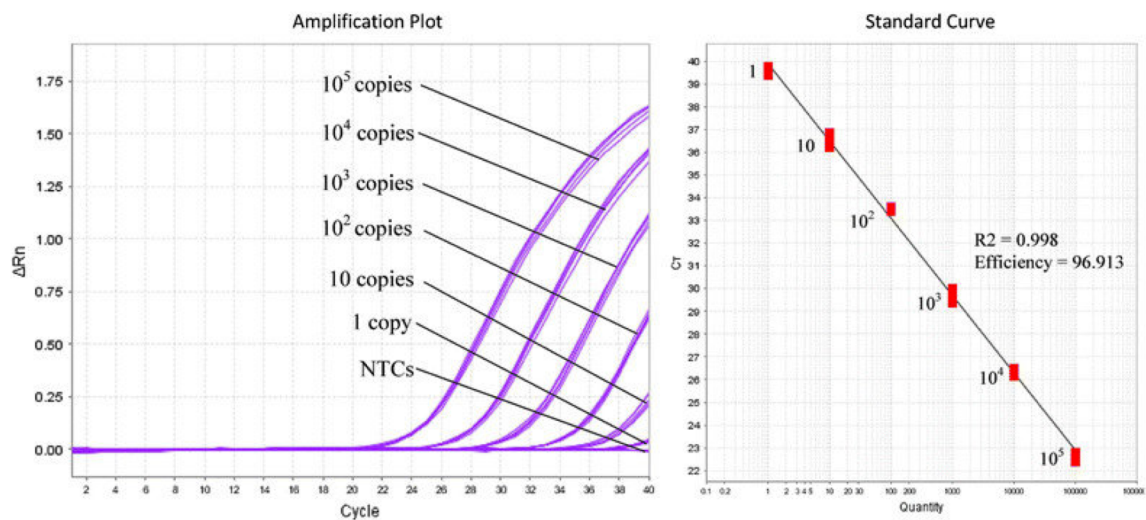
PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (QPCR)

- *Mede a geração de produtos de amplificação*
- *Baseado na emissão de fluorescência por produto de amplificação*
- *Diferentes sistemas de detecção*
- *Quantificação absoluta vs quantificação relativa*
- *Parâmetros importantes: especificidade, eficiência, R^2*

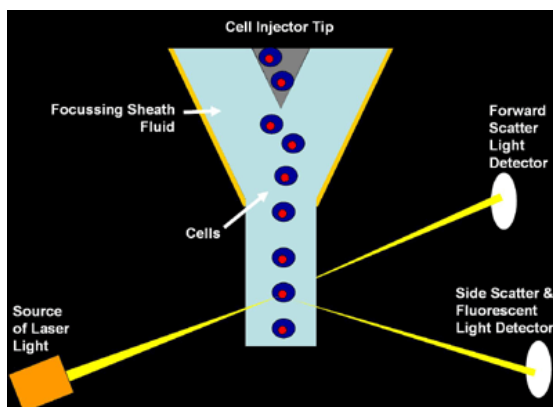
PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (QPCR)



PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (QPCR)

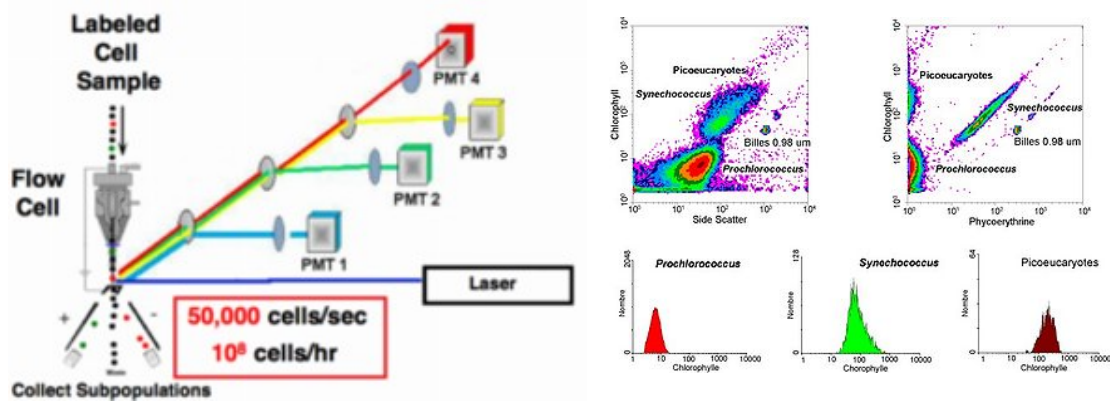


CITROMETRIA DE FLUXO



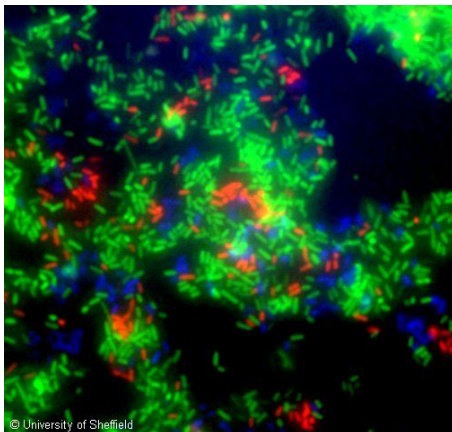
- *Contagem de células por unidade*
- *Possibilidade de separação de células individualmente*
- *Cultivo de grupos raros*
- *Single cell genomics*

CITROMETRIA DE FLUXO

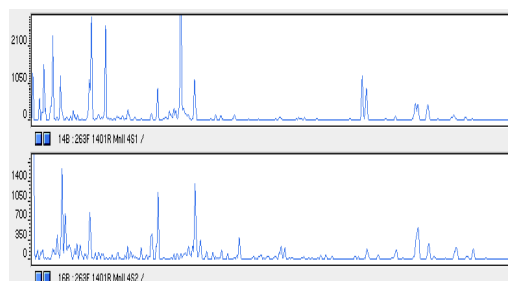
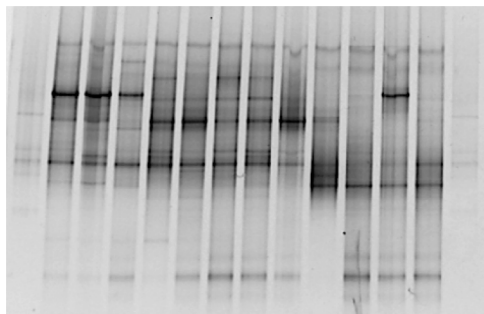


- *Contagem diferenciada*
- *Acoplamento com 'sorting'*

FISH – FLUORESCENT *IN SITU* HYBRIDIZATION

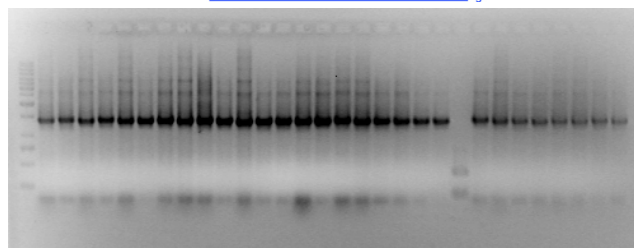
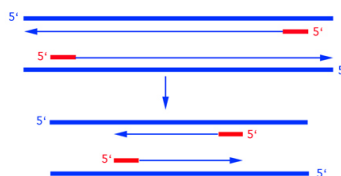


- *Marcação com sondas fluorescentes*
- *Sondas genéricas ou específicas*
- *Informação de distribuição espacial*



MÉTODOS DE COMPARAÇÃO - *FINGERPRINTING*

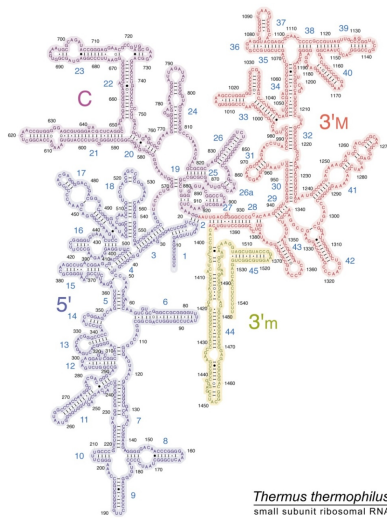
19



MÉTODOS DE COMPARAÇÃO - *FINGERPRINTING*

20

REGIÕES CONSERVADAS E VARIÁVEIS DOS GENES MARCADORES



➤ *Regiões conservadas – relacionadas a estrutura funcional do RNA ou da proteína*

➤ *Regiões conservadas – toleram ocorrência de mutação*

0 100 200 300 400 500 600 700 800 900 1000 1100 1200 1300 1400 1500 bp

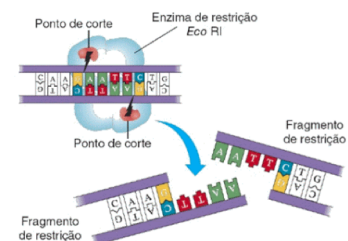


CONSERVED REGIONS: unspecific applications

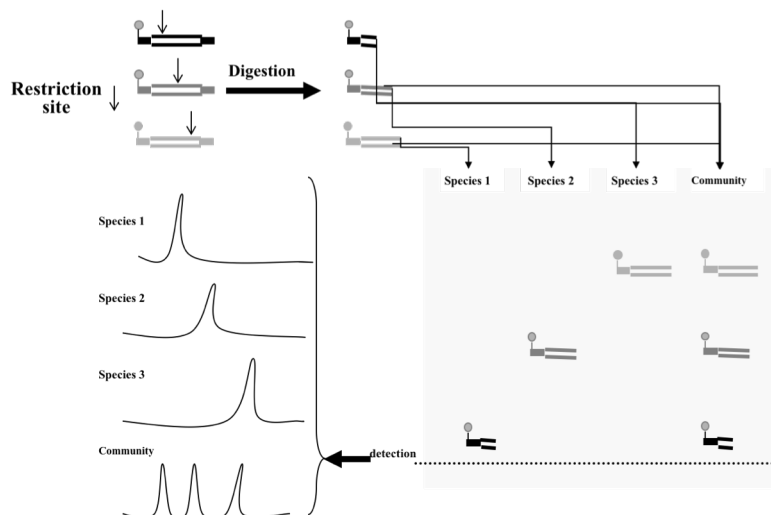
VARIABLE REGIONS: group or species-specific applications

TERMINAL RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLIMORFISM (T-RFLP)

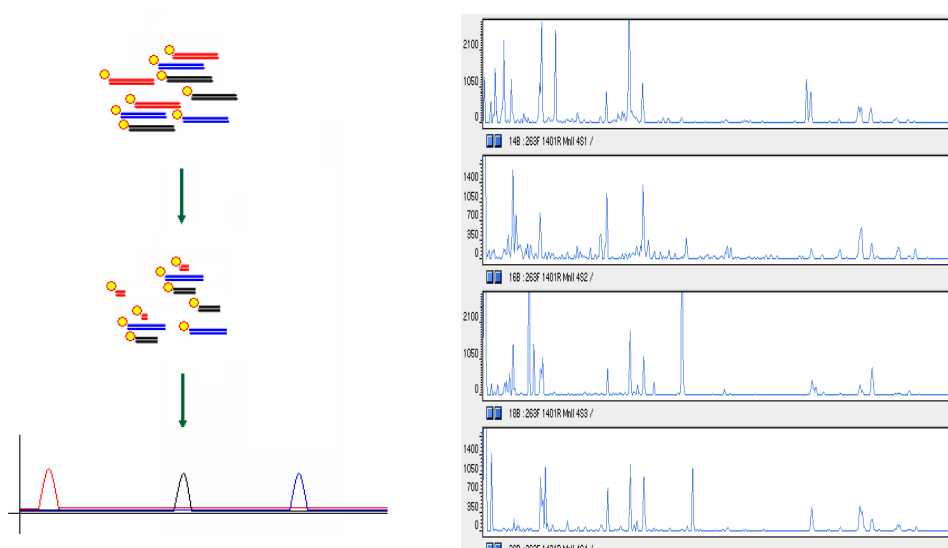
- *Fragmentação dos produtos de amplificação*
- *Uso de enzimas de restrição*
- *Quebra diferencial de acordo com as sequências*
- (origens)*
- *Geração de perfis de picos*
- *Leitura otimizada por fluorescência*



TERMINAL RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLIMORFISM (T-RFLP)



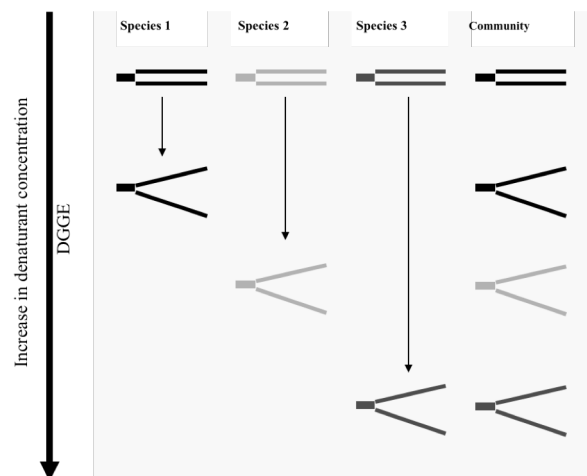
TERMINAL RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLIMORFISM (T-RFLP)



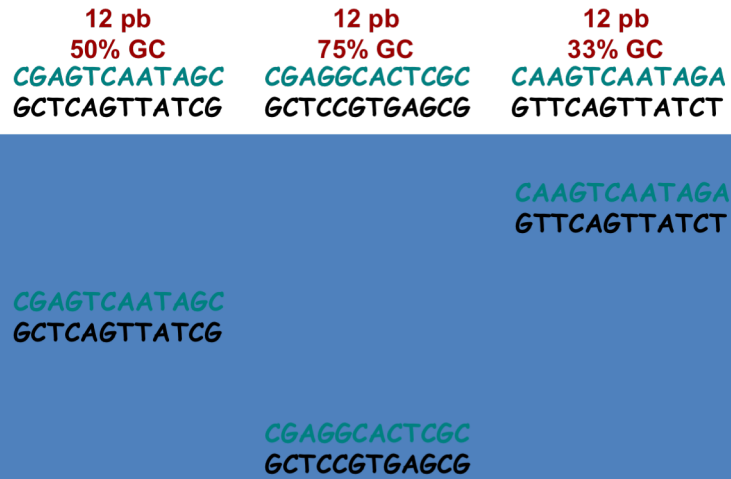
GEL DE ELETROFORESE EM GRADIENTE DESNATURANTE (DGGE)

- *Uso da força de atração entre as fitas de DNA*
- *Diferenciação pela quantidade de GC*
- *Eletroforese em condição crescente de agentes desnaturantes*
 - *uréia e formamida*
- *Geração de padrão de bandas (imagem)*

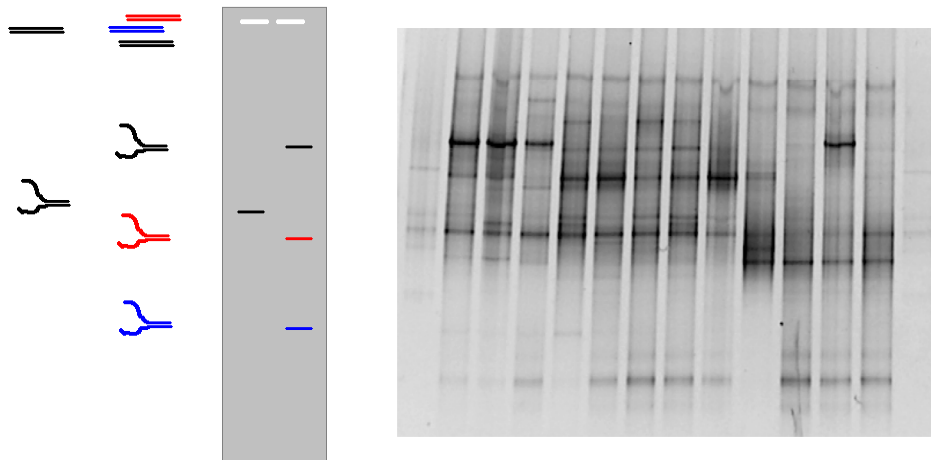
GEL DE ELETROFORESE EM GRADIENTE DESNATURANTE (DGGE)



GEL DE ELETROFORESE EM GRADIENTE DESNATURANTE (DGGE)



GEL DE ELETROFORESE EM GRADIENTE DESNATURANTE (DGGE)



PORTAL DE LIVROS ABERTOS DA USP

OBRIGADO!!!

29

|fdandreo@gmail.com |fdandreo@usp.br|