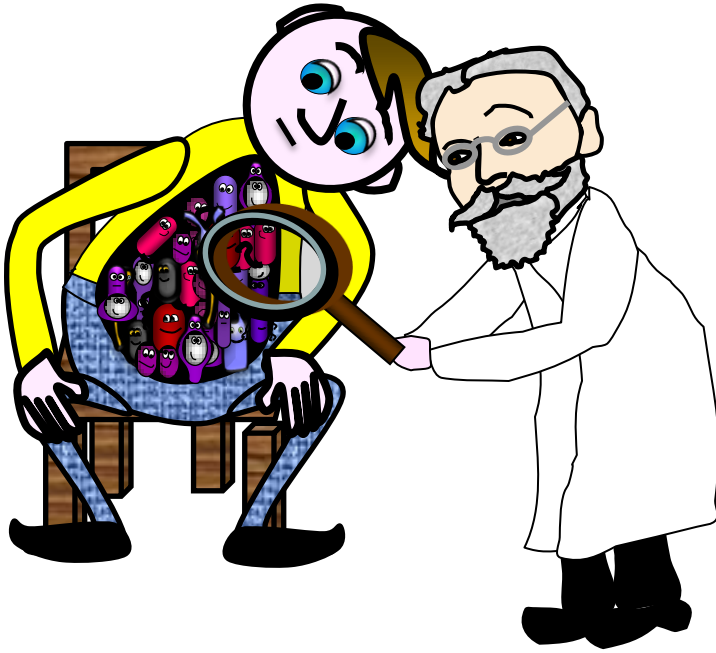


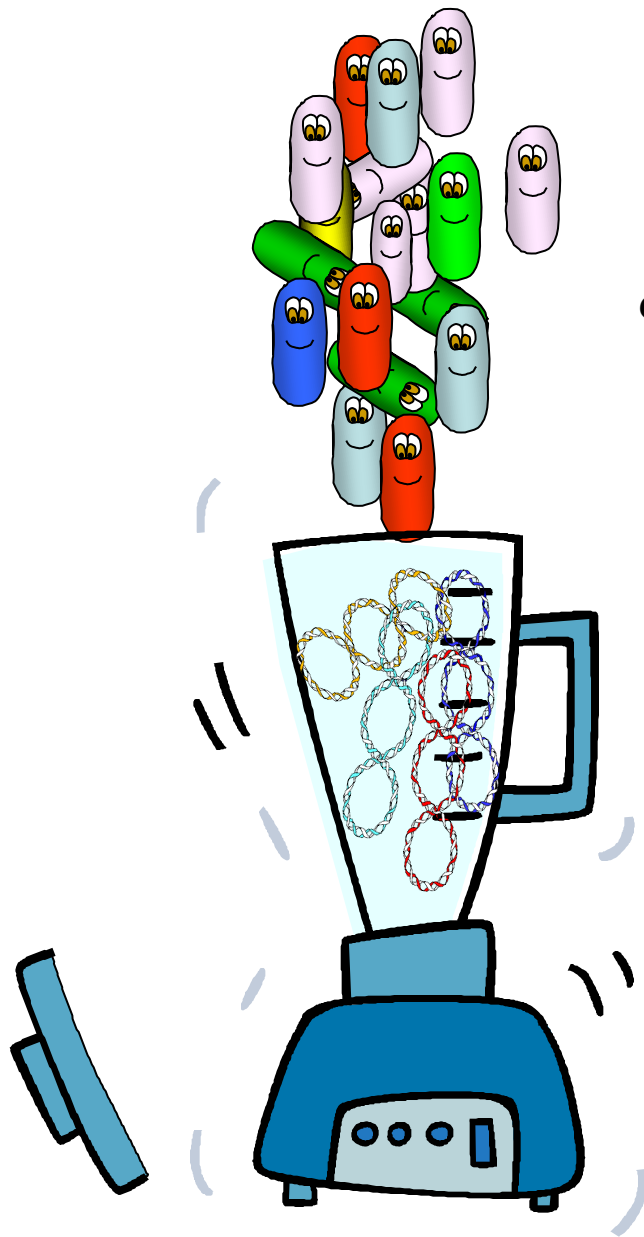
Lo studio delle comunità microbiche



È stato reso possibile dalle
Tecniche molecolari

Nella maggior parte dei casi le tecniche utilizzano
l'amplificazione di segmenti conservati

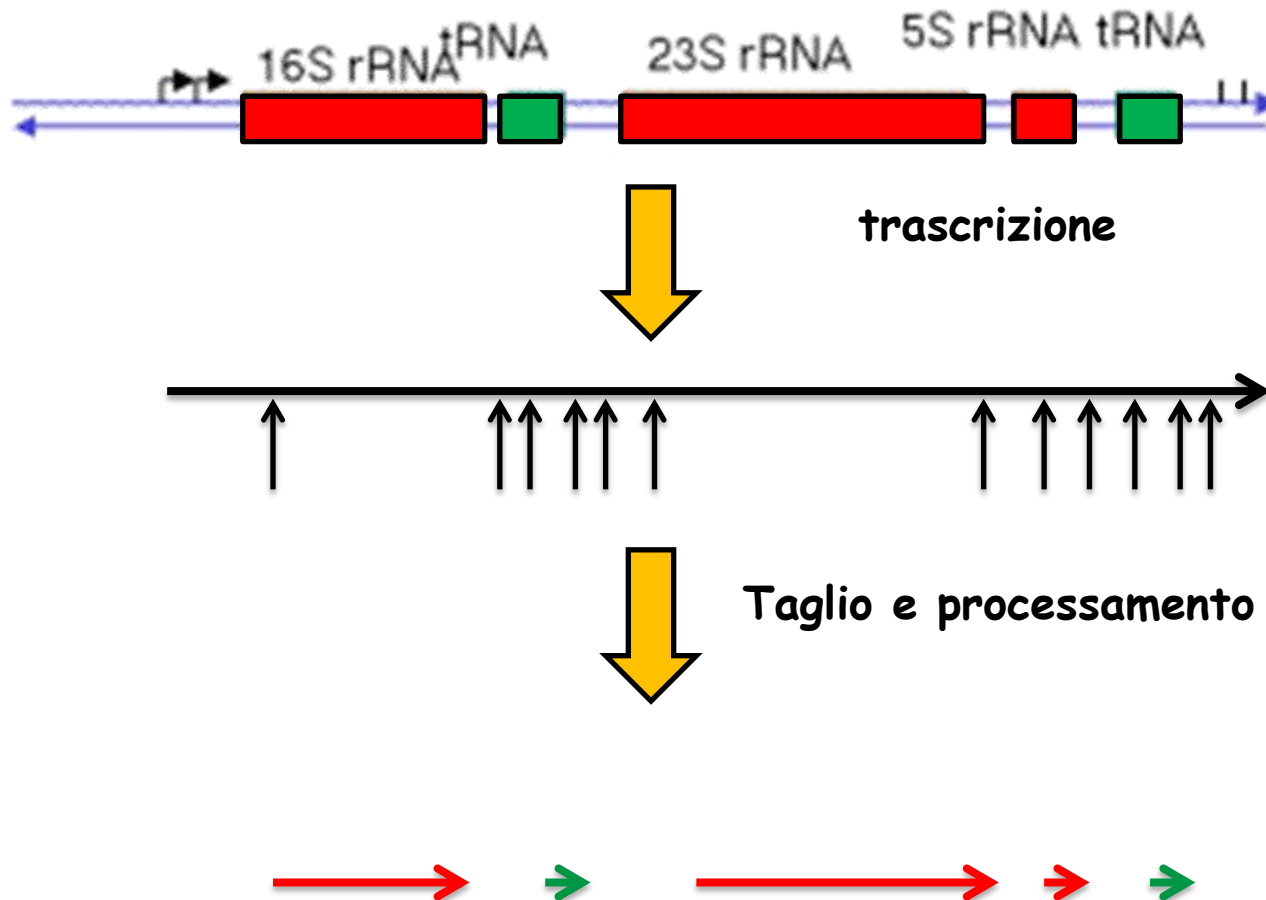
Usando come «stampo» il DNA metagenomico,
estratto direttamente dal campione in cui è
presente una comunità microbica variegata



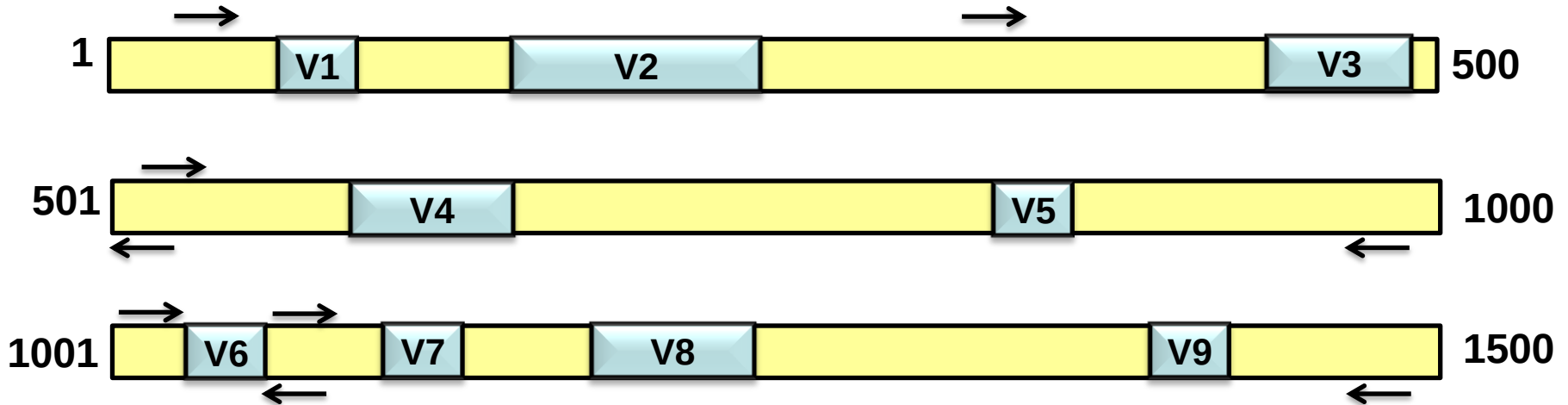
il DNA metagenomico, è quello che si estrae direttamente da un campione in cui sia presente una comunità microbica variegata

Il passo di estrazione è critico per tutte le tecniche molecolari basate sul genoma

Tra i possibili marcatori, gli operoni che codificano gli RNA ribosomiali sono i più usati



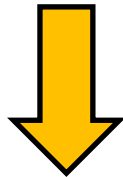
Nel 16S rDNA



Coesistono regioni ipervariabili, caratteristiche, e regioni conservate che permettono di disegnare primer universali

I limiti di questo marcatore sono:

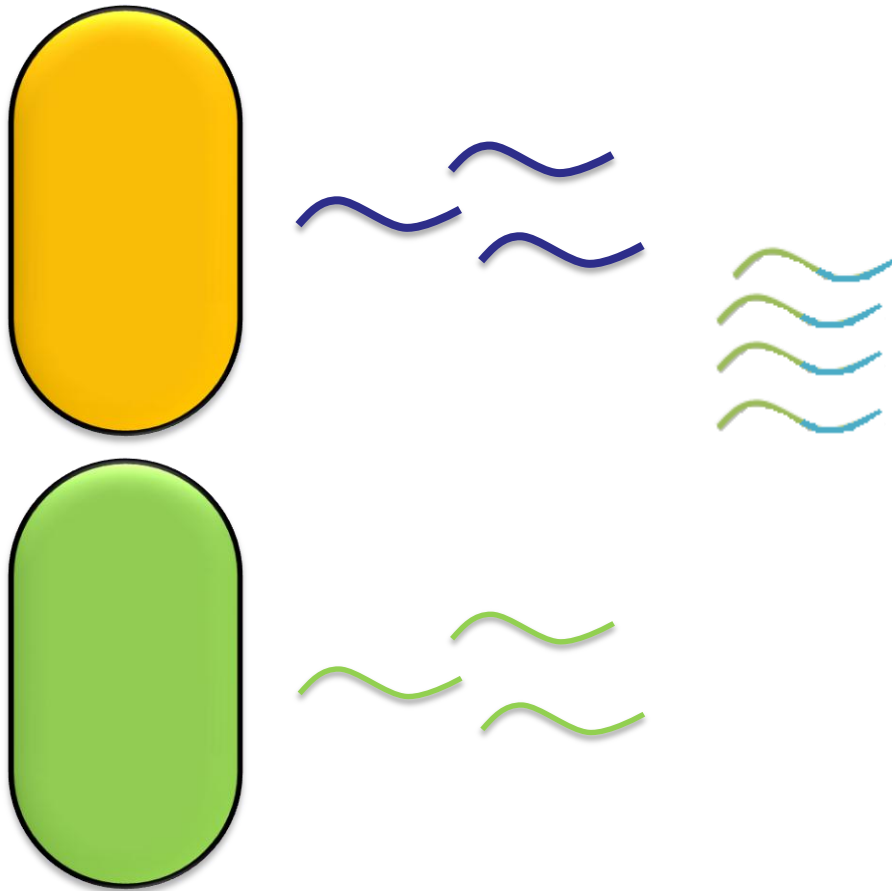
Presenza di copie multiple del gene, con una divergenza fino al 5% nello stesso genoma



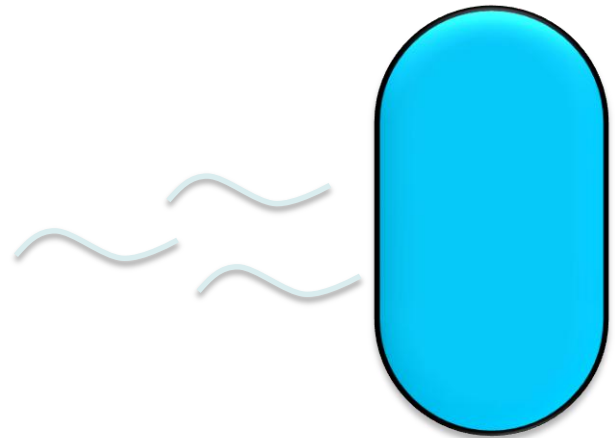
Basso potere di discriminazione a volte anche a livello di genere

Possibile sovrastima della diversità

**Possibile formazione di chimere grazie
alle regioni di omologia tra geni diversi**



**Le chimere poi amplificano con la
stessa efficienza delle sequenze reali**



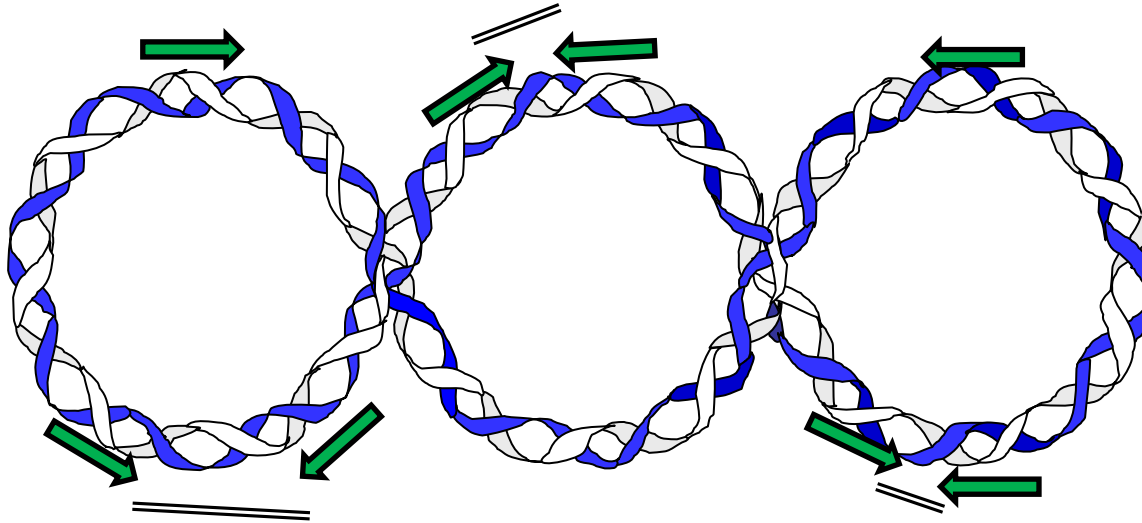
Una valida alternativa è l'amplificazione e il
sequenziamento degli ITS
Ribosomal RNA intergenic spacer analysis-RISA



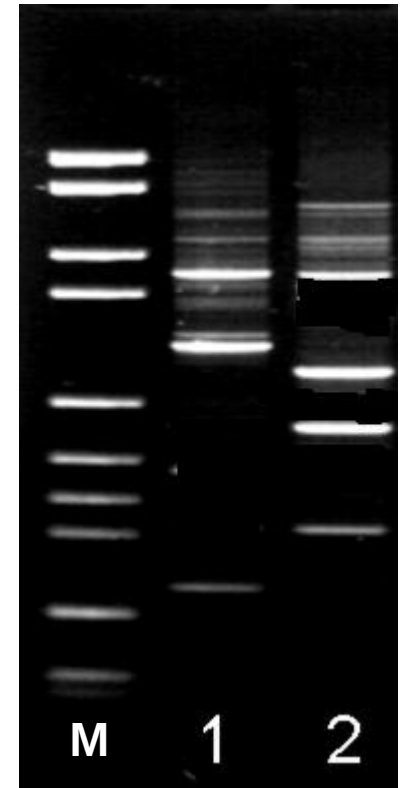
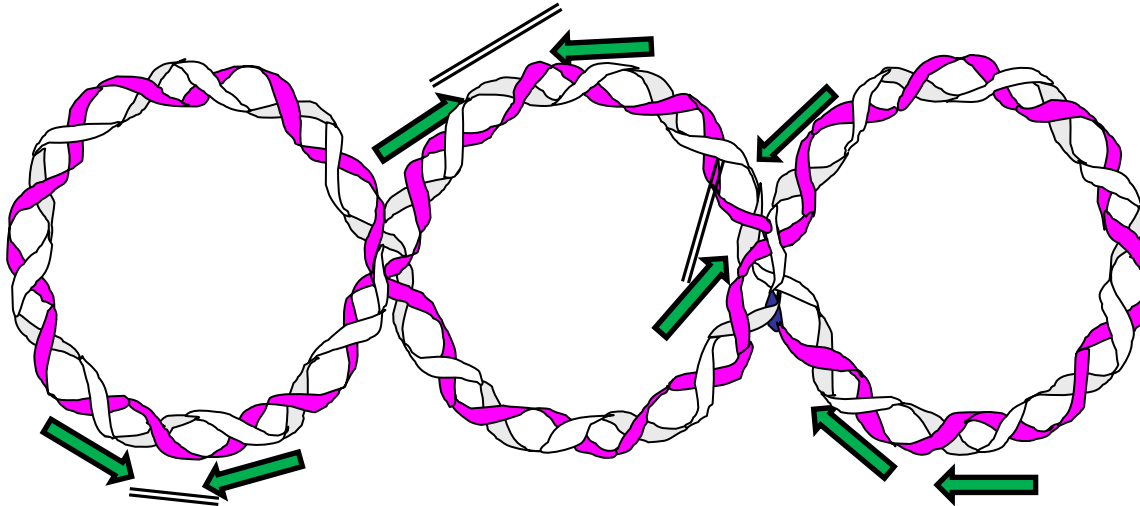
Che hanno dimensioni e
sequenza molto variabili

Il limite in questo caso è dato dalla ancora scarsa
abbondanza delle sequenze disponibili nei data base

RAPD: (Randomly Amplified Polymorphic DNA-PCR)



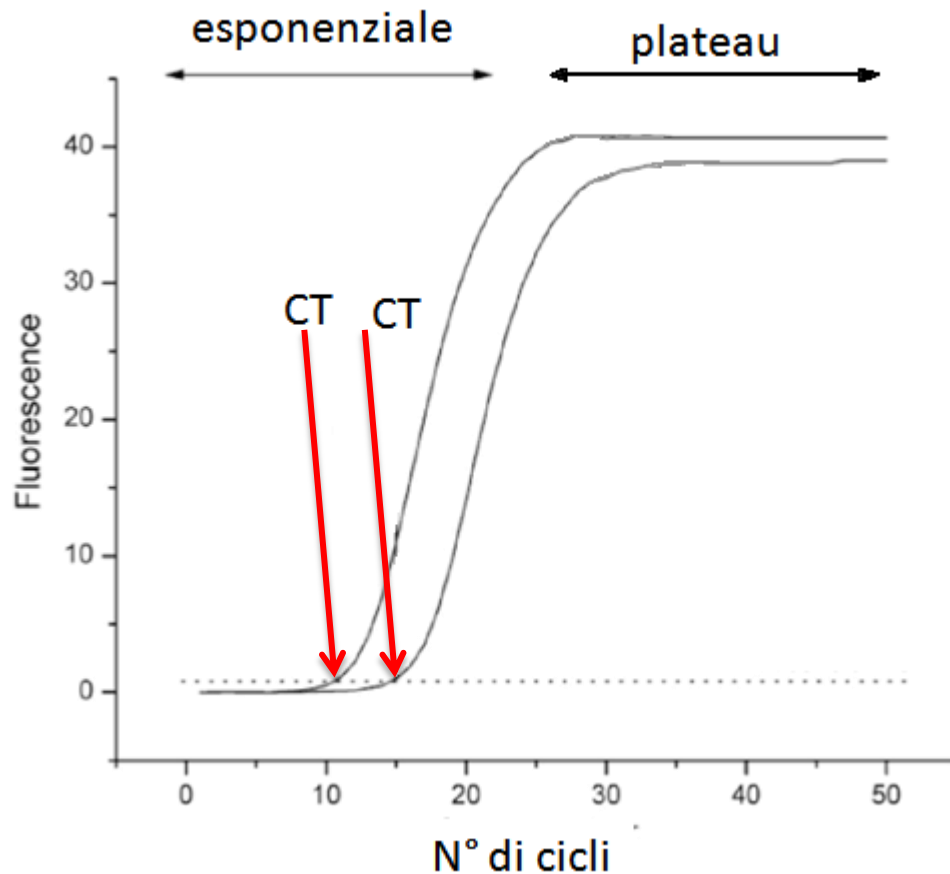
Utilizza un solo primer corto, in grado di legarsi in più punti del genoma



Real Time PCR (PCR quantitativa)

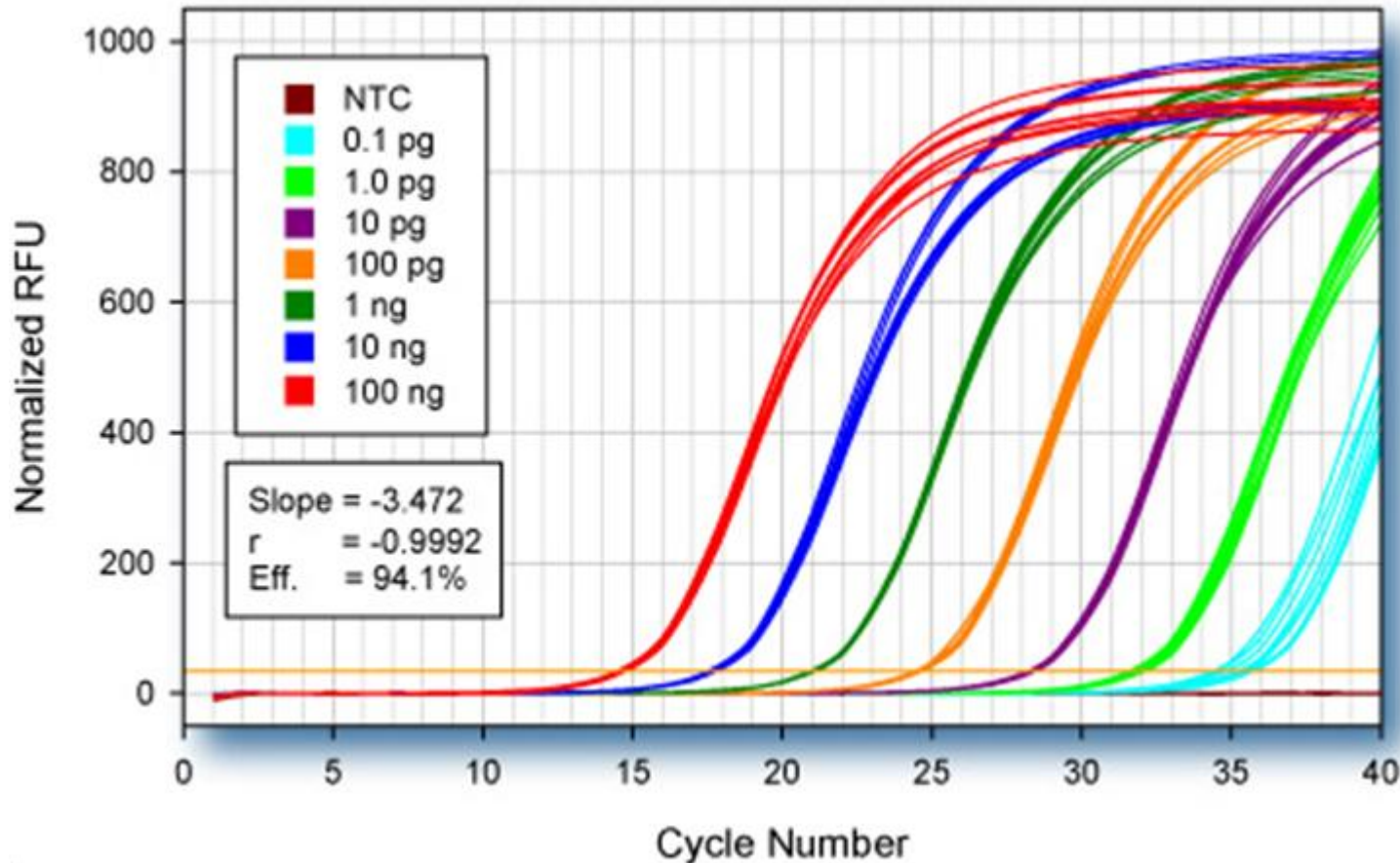
Il DNA è quantificato mentre si amplifica, attraverso il legame con un reagente fluorescente che non lo danneggia

l'intensità della fluorescenza emessa, per ogni ciclo è proporzionale alla concentrazione del prodotto di PCR



Il primo ciclo in cui si rileva un valore $>$ del «rumore di fondo» è detto «Ciclo soglia» (CT)

IL valore di CT corrisponde all'inizio della fase esponenziale della reazione ed è inversamente proporzionale alla concentrazione del template nel campione



la quantità originale del template si deduce per interpolazione con una curva "standard" ottenuta sui CT osservati amplificando diluizioni seriali di un template di concentrazione nota

**Nello studio delle comunità microbiche la qRT-PCR
può essere usata per**

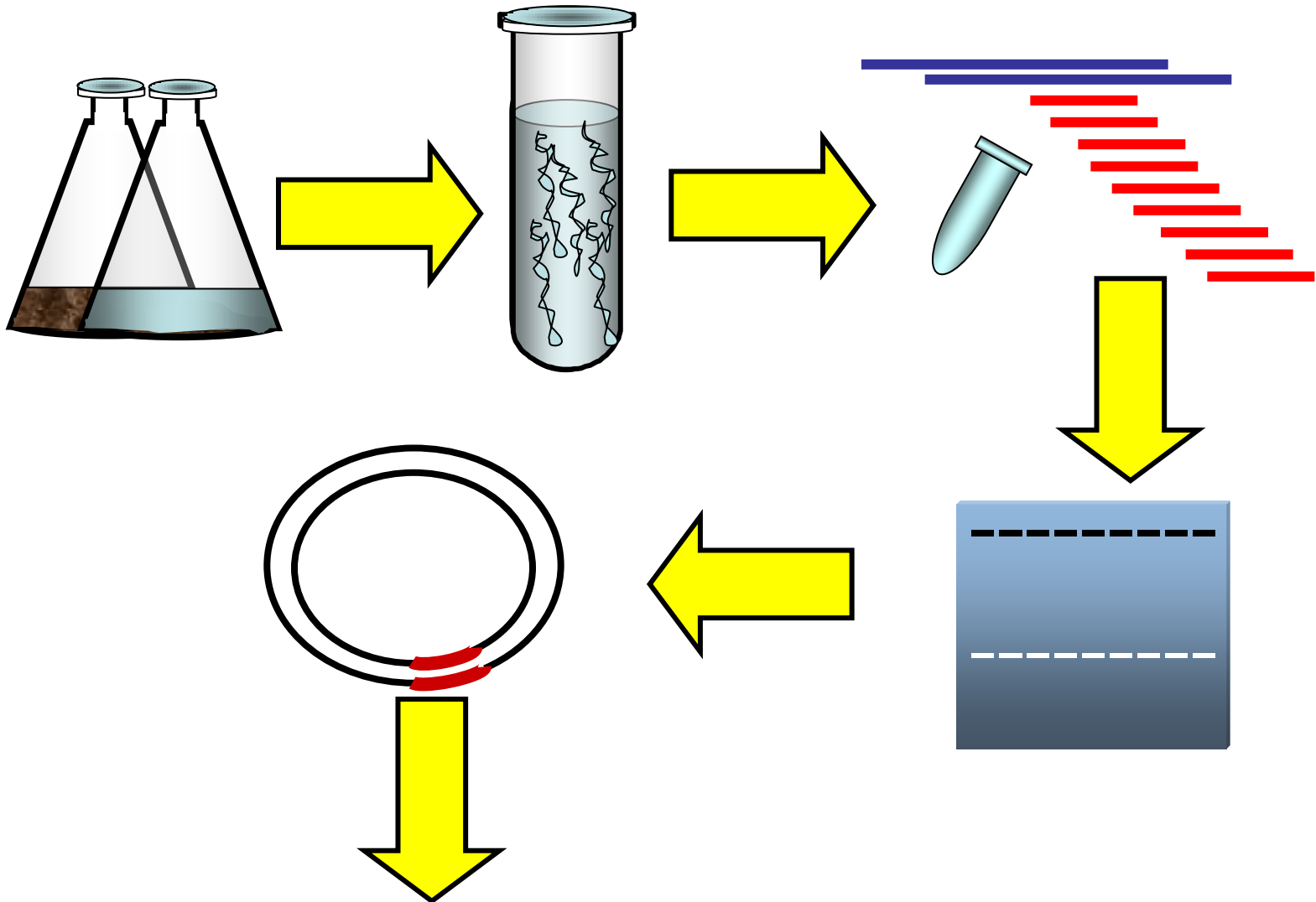
Individuare la presenza di determinate popolazioni

**Confrontare le quantità relative di due o più template
nel campione originale**

**In questo caso servono primer molto specifici e si
preferisce impiegare sequenze di geni «housekeeping»
piuttosto che i 16S rDNA, per ottenere una
selettività più elevata**

STRUTTURA DI COMUNITA'

Librerie 16S



TGCCGTATCTCCACAATCAATGCT ...

Il sequenziamento random è laborioso e costoso

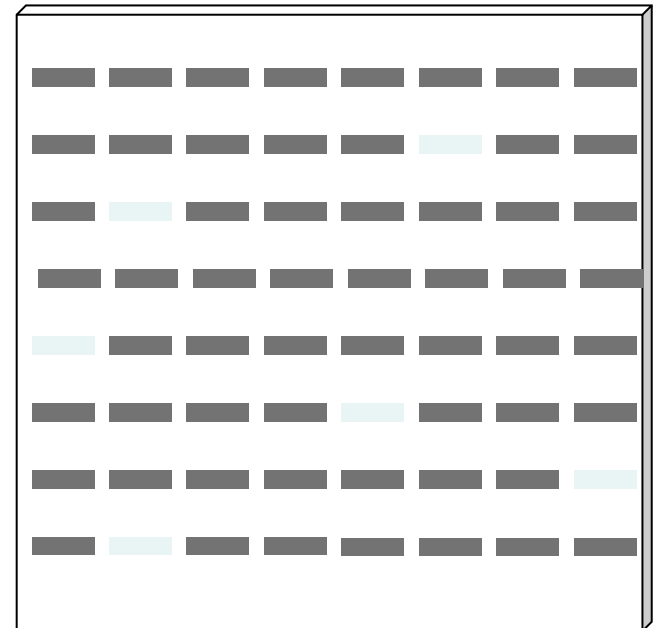
**Ha permesso di ottenere una
base dati per altre tecniche**

**Che possono ora essere usate anche
per sottoporre i cloni ottenuti a uno
screening preliminare**

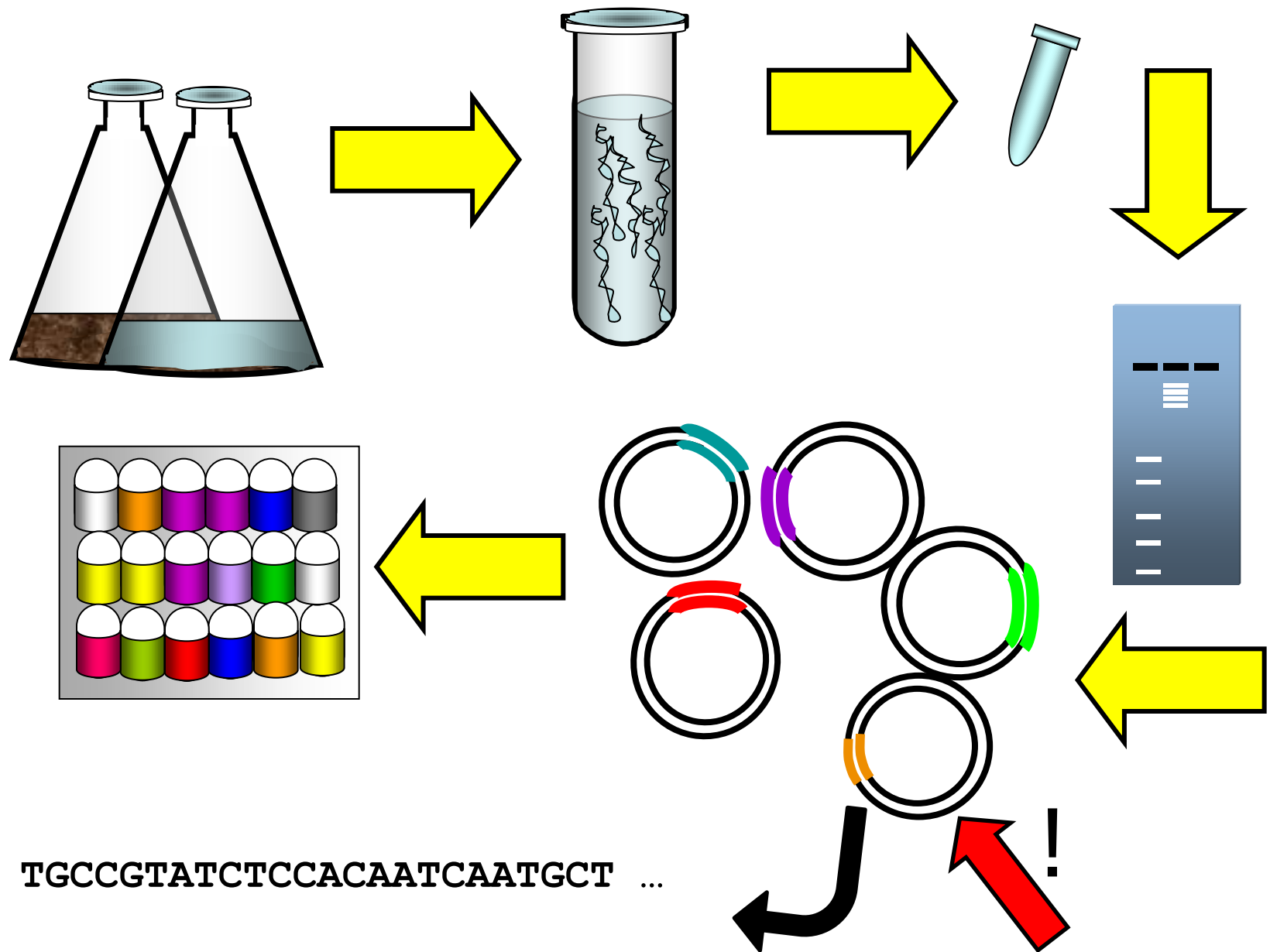
**Per evitare di sottoporre al
sequenziamento sequenze ridondanti**

Es. ARDRA

**IBRIDAZIONE CON
SONDE SPECIFICHE**



Librerie metagenomiche (attività particolari)



POLIMORFISMO DEI FRAMMENTI DI RESTRIZIONE

ARDRA

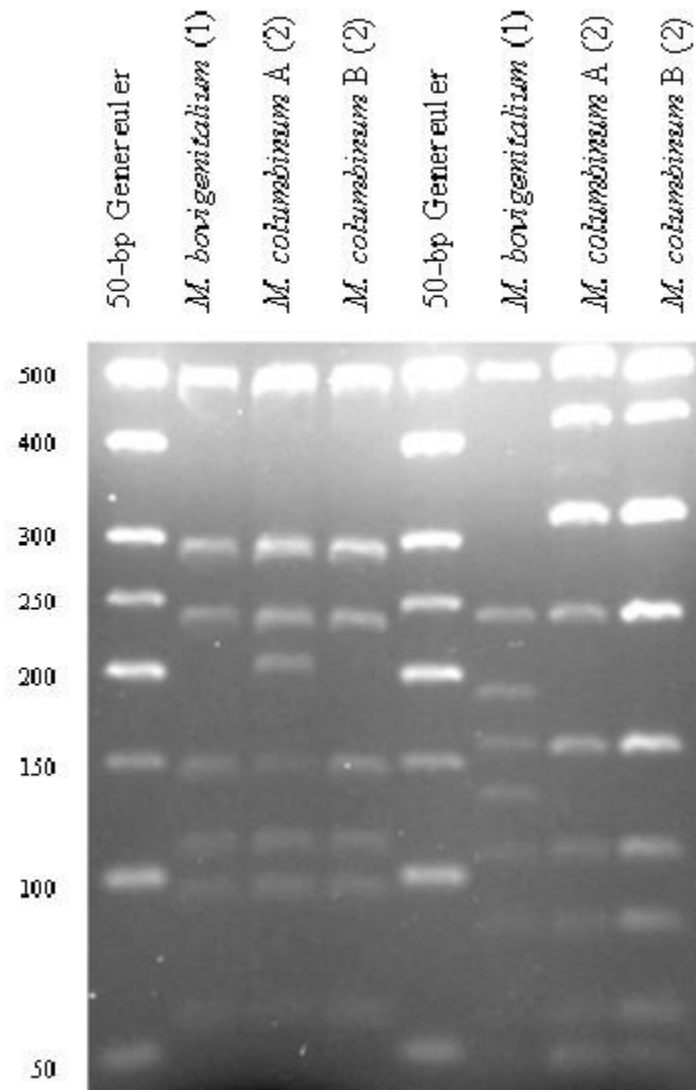
(Amplified ribosomal DNA restriction analysis)

Analisi di restrizione sugli amplimeri
dei 16S rDNA

I frammenti si fanno correre su gel

alta concentrazione
di agarosio

su poliacrilammide



RFLP
(restriction fragment length polymorphism)

Analoga all'ARDRA, ma eseguita su amplimeri di geni housekeeping, diversi dai 16S rDNA

RpoB
(subunità beta della Rna-polimerasi)

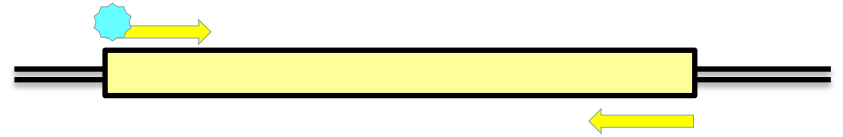
RecA
(Ricombinasi)

Hsp70
(Heat shock protein)

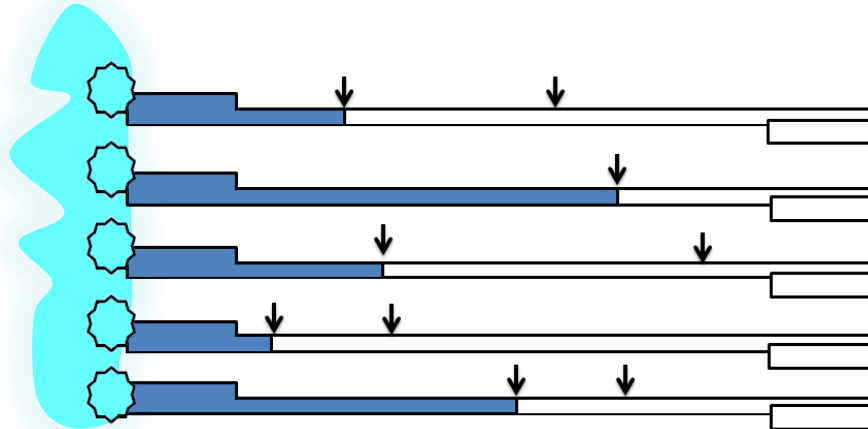
Per studiare sottoinsiemi particolari si possono analizzare geni funzionali caratteristici

T-RFLP (Terminal restriction fragment length polymorphism)

In questa variante uno dei primer è
marcato con un fluorocromo

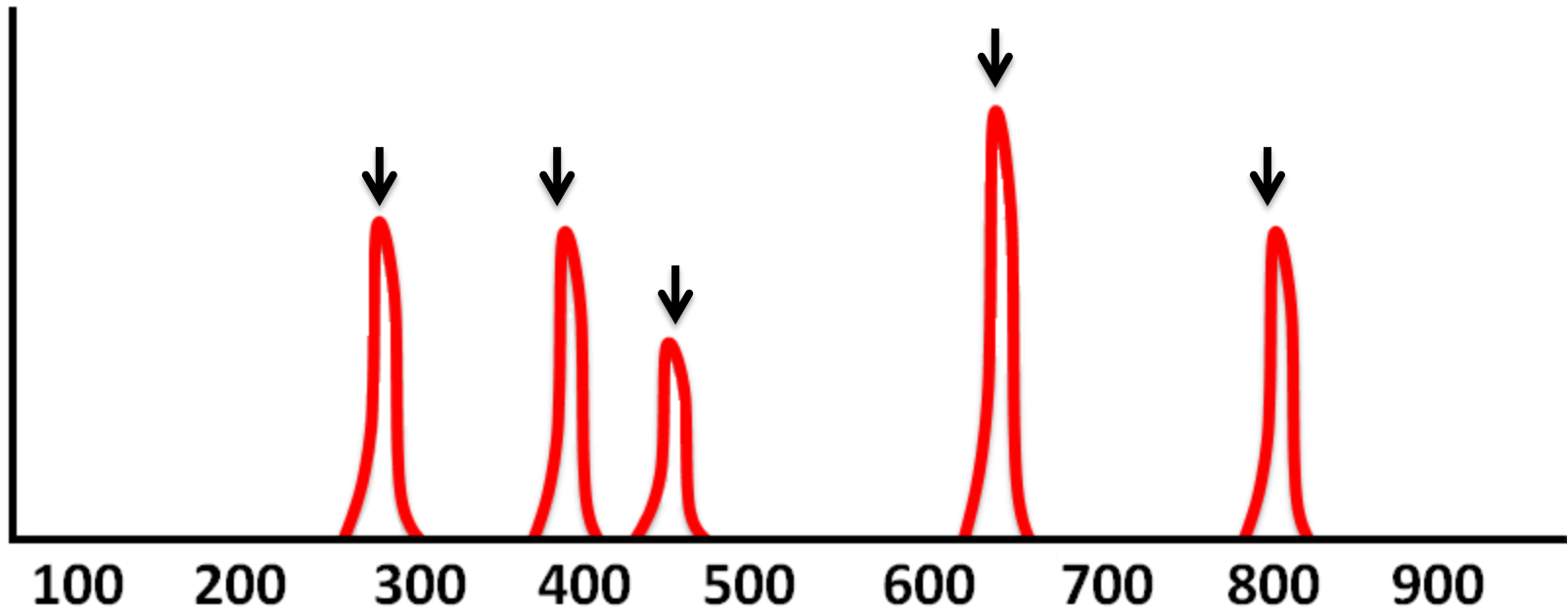


La miscela di ampliconi ottenuta dal DNA
metagenomico è purificata e digerita con
una endonucleasi di restrizione



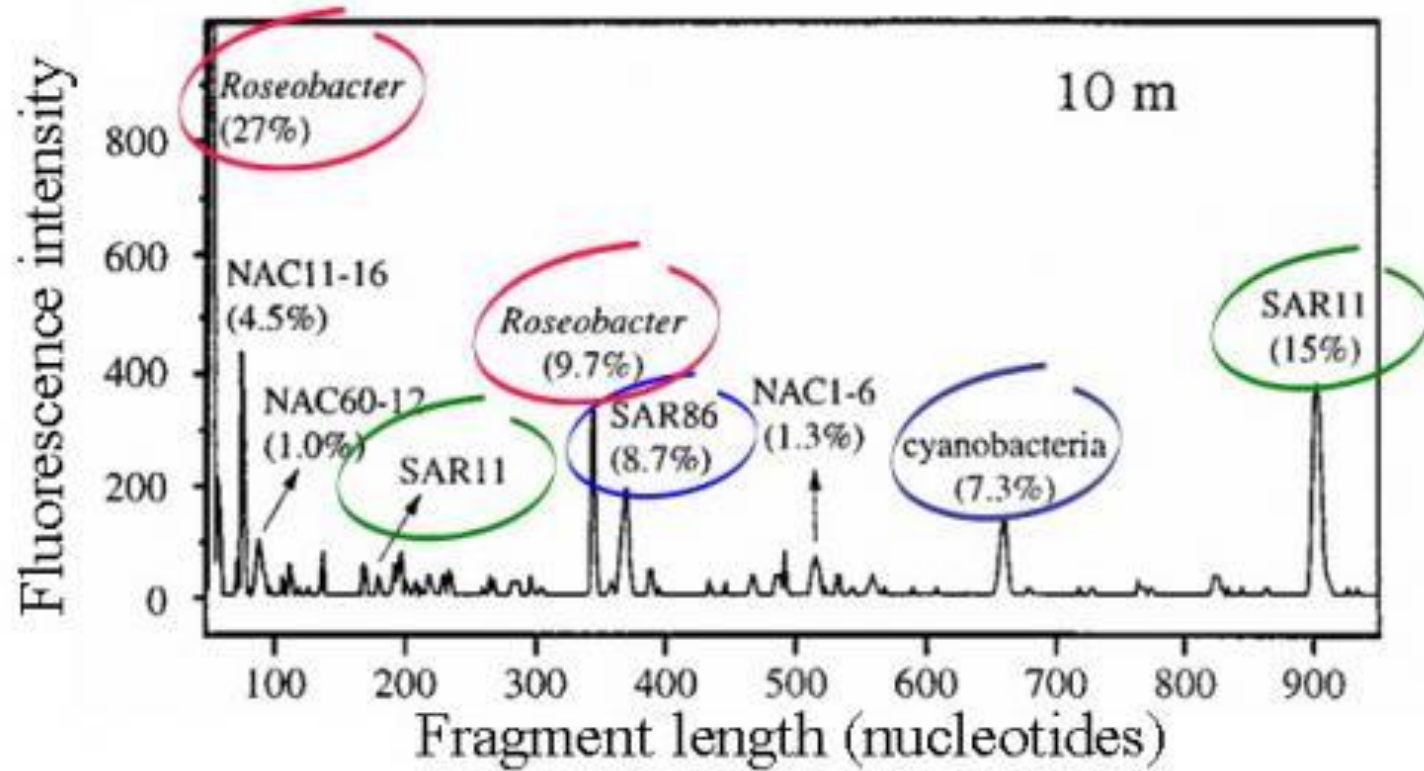
Ottenendo frammenti diversi e fluorescenti

I frammenti possono essere separati in un sequenziatore che ne registra la relativa intensità

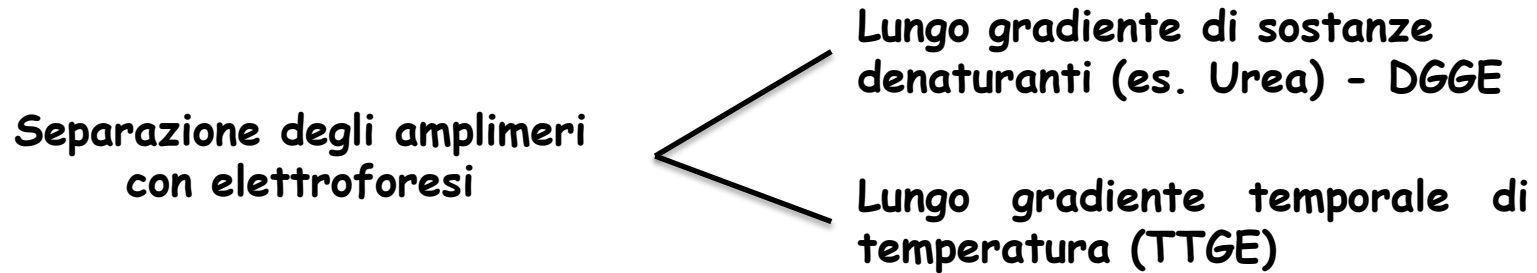


Il limite delle tecniche che studiano il polimorfismo di restrizione è che permettono di confrontare i profili ma non di identificare i picchi

A meno di non poter allestire degli standard per
identificare gruppi noti



DGGE/TTGE



Le differenze nel punto di denaturazione, chimica o termica,
dipendono dalla sequenza nucleotidica

le bande possono essere purificate
da gel e sequenziate

Gli ampliconi si separano prima in base
al peso molecolare (%G+C)

In seguito, man mano che le condizioni
denaturanti diventano più intense, i filamenti
cominciano a separarsi e la loro corsa rallenta

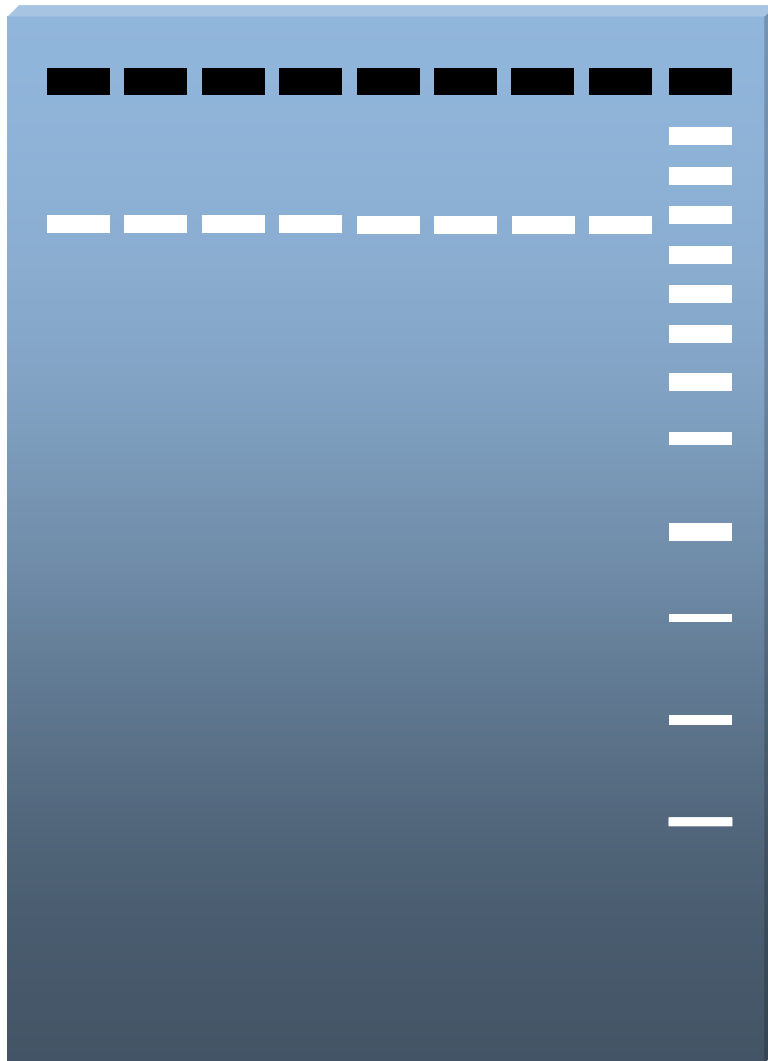
Fino ad arrestarsi quando la separazione
della sequenza naturale è completa

Il punto di arresto di ogni
frammento dipende dalla
composizione nucleotidica

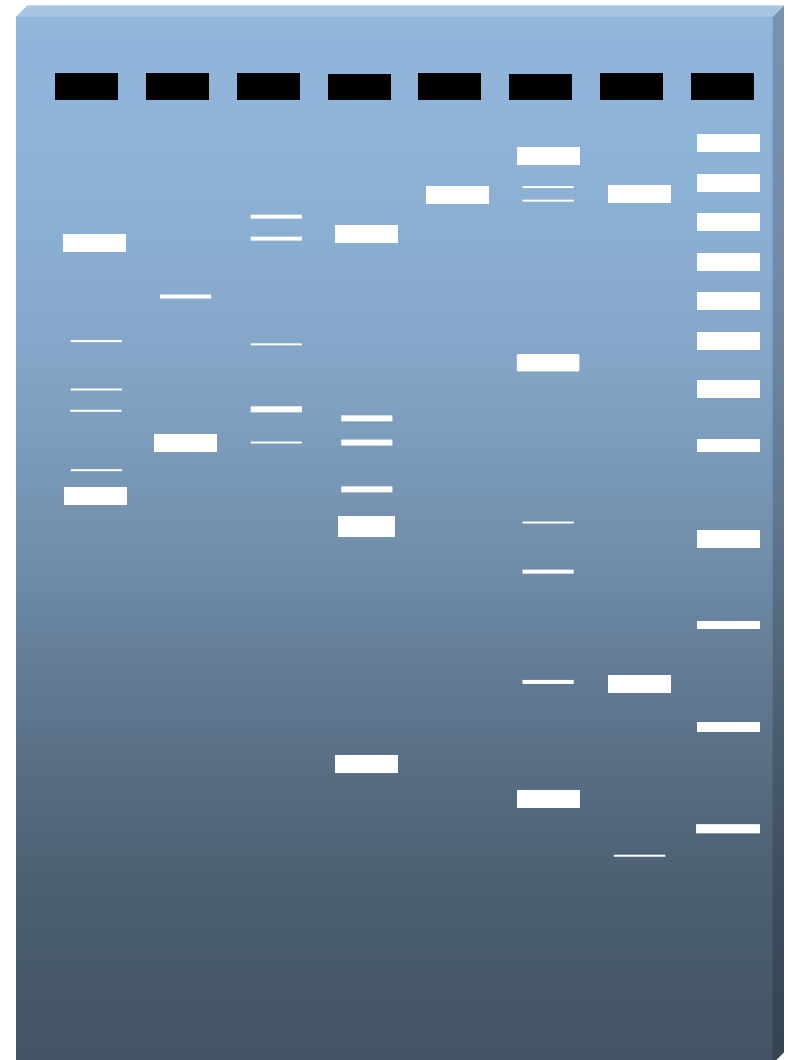
La denaturazione non è mai completa per via della presenza di una "GC-clamp"
(sequenza ricca in G+C) che viene aggiunta al primer forward

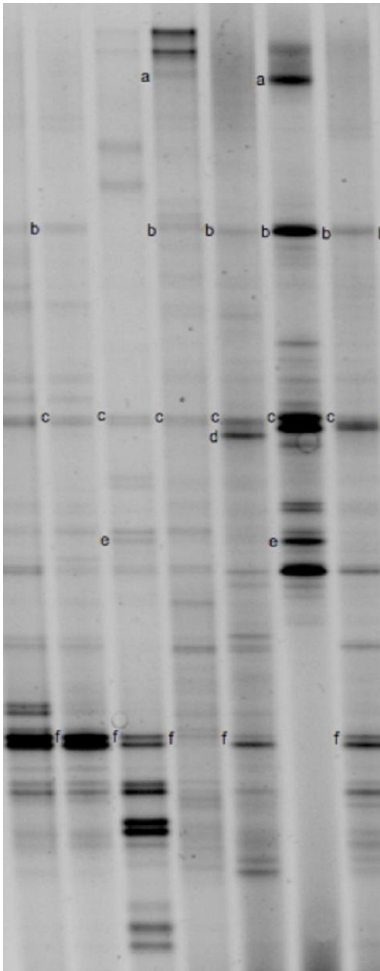
il numero di bande prodotte è
proporzionale al numero di
specie dominanti nel campione

Corsa elettroforetica convenzionale



DGGE (TTGE)





Vantaggi :

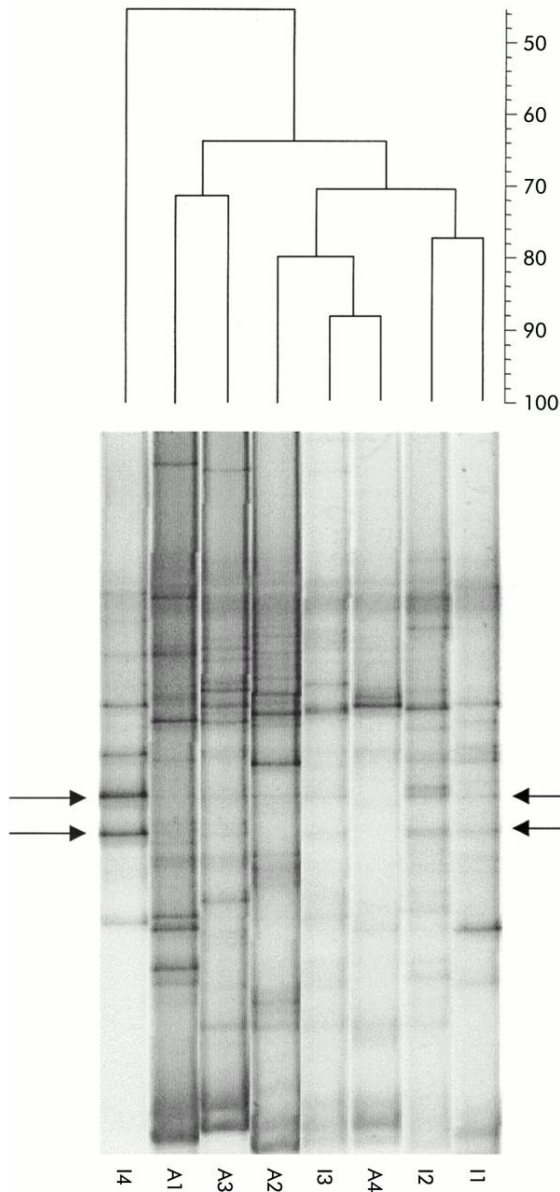
possibilità di monitorare cambiamenti strutturali o funzionali, nelle comunità batteriche analizzate (es dopo perturbazioni)

possibilità di ottenere rapidamente una stima delle popolazioni rappresentative nelle comunità

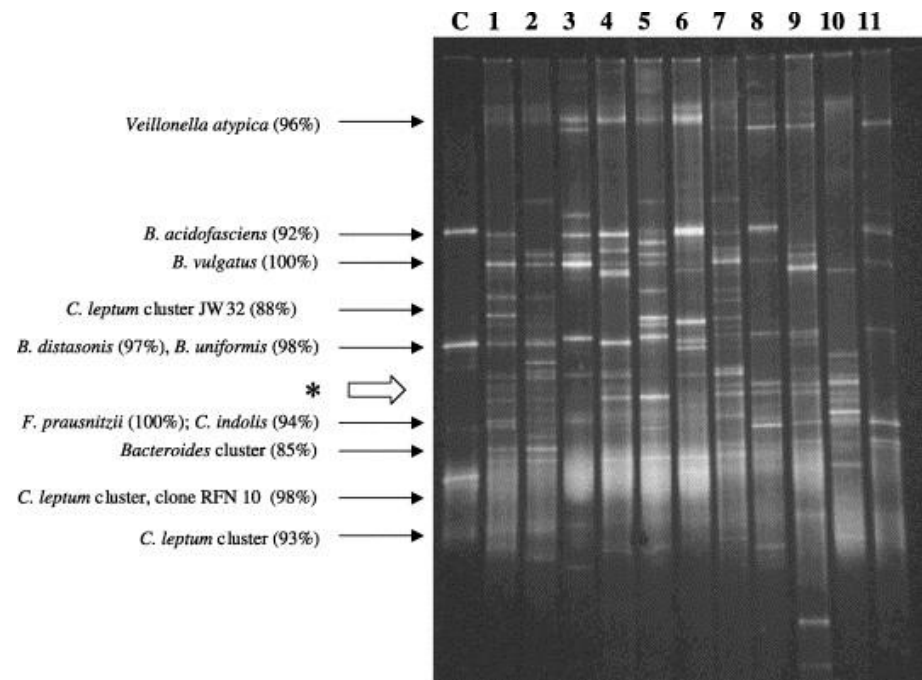
possibilità di identificare le popolazioni microbiche attraverso l'escissione ed il sequenziamento delle bande

**Limitazioni: Il profilo dipende dai primer usati.
Per la DGGE la regione V6 è quella che ha ottenuto i
migliori risultati**

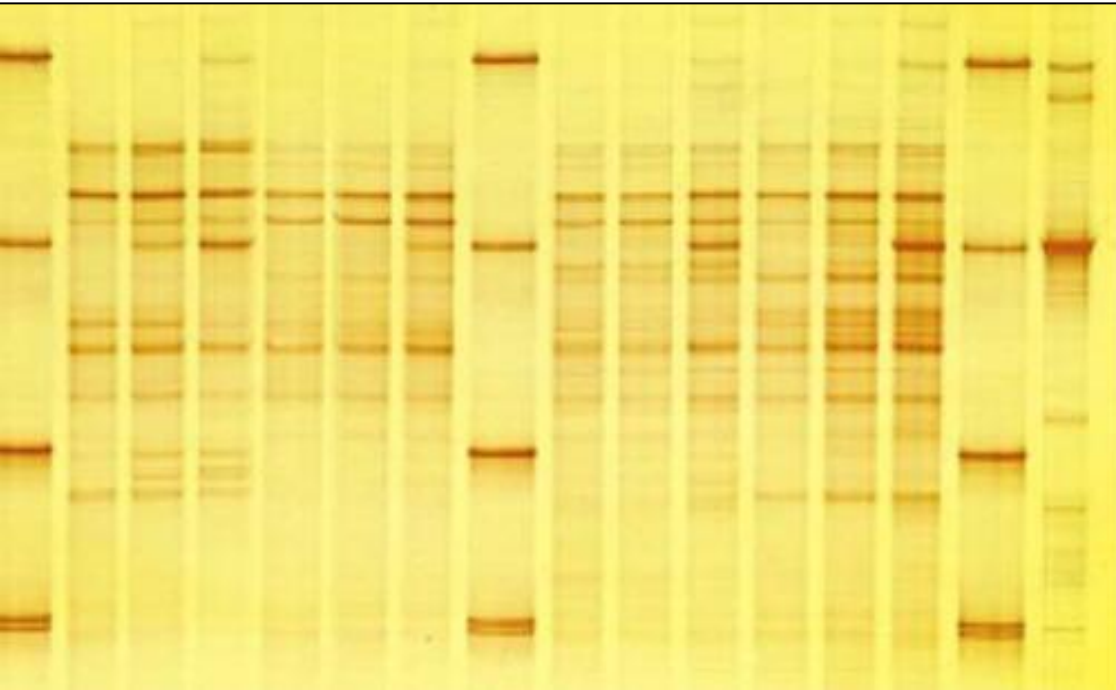
Analisi in TTGE microbiota fecale di individui con morbo di Crohn attivo e inattivo



Analisi in DGGE su microbiota fecale di pazienti ospedalizzati



SSCP-Single strand conformation Polimorphism



Estrazione metagenoma
Amplificazione regione 16S
rDNA; uno dei primer è
fosforilato al 5'

Rimozione enzimatica (esonucleasi
di λ) del filamento fosforilato

Corsa su gel di acrilamide

Escissione delle bande

Ricostituzione del doppio
filamento

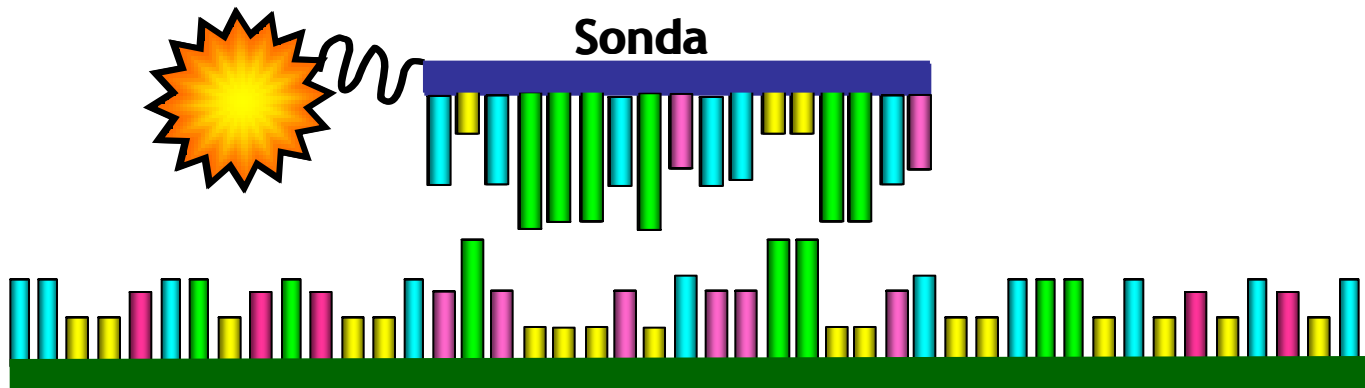
Riamplicazione

Sequenziamento

RICERCA DI GRUPPI PARTICOLARI

FISH una sonda specifica marcata con un fluorocromo permette di individuare le cellule bersaglio anche tra molte altre

SONDA → MARCATURA → DENATURAZIONE CAMPIONI E SONDA →
IBRIDAZIONE → LAVAGGI → MICROSCOPIO A FLUORESCENZA



É possibile anche usare sonde multiple, marcate con fluorocromi di colori differenti per determinare i rapporti numerici e spaziali tra gruppi diversi

CARD-FISH (Catalyzed Reporter Deposition)

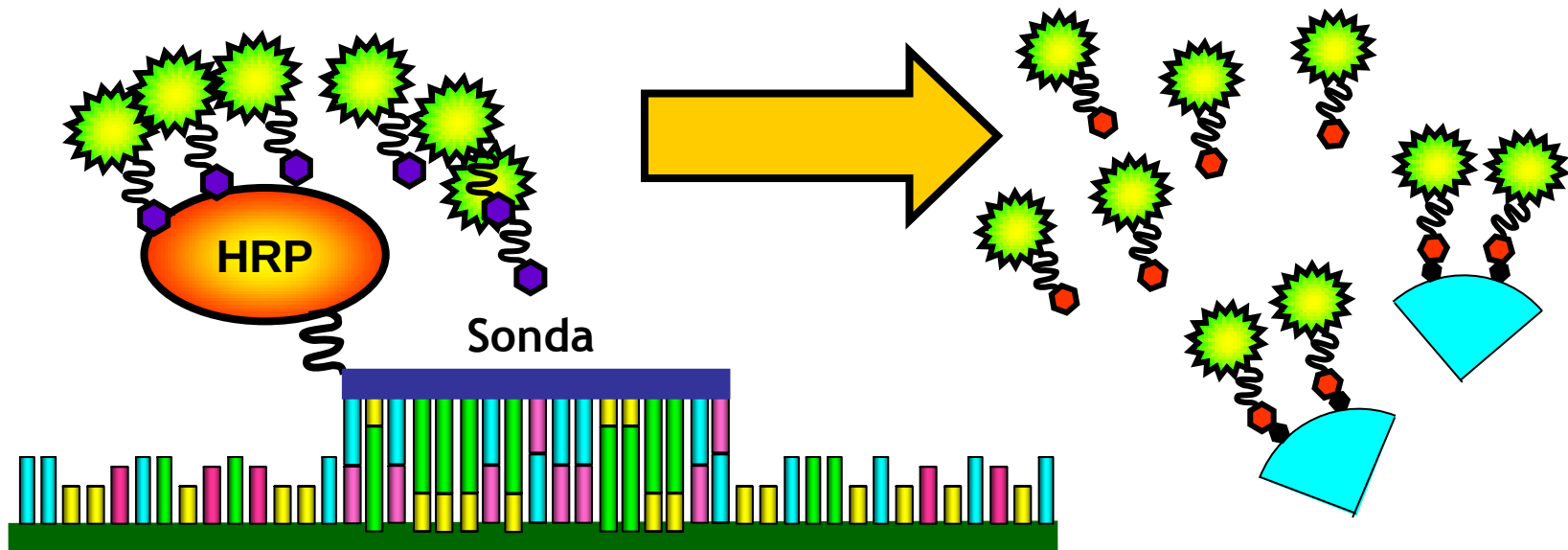
Tyramine Signal Amplification

Sonda + Horse Radish Peroxidase + tirammide marcata con fluorocromo

Una volta attivata dalla HRP, la tirammide (composto fenolico) si lega alle proteine della parete batterica (residuo di tirosina)

Dimerizzazione improbabile
(bassa concentrazione)

Intermedi reattivi reagiscono con aa
delle molecole adiacenti alla sonda



Limite: passaggio sonda di grandi dimensioni
(permeabilizzazione con Lisozima)

Possibile interferenza perossidasi
batteriche: inattivazione con H₂O₂

Attività
(es respirazione)

