

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - UNIRIO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS
INSTITUTO BIOMÉDICO – IB
LABORATÓRIO DE GENÔMICA

Ygor Parladore Silva

Avaliação de protocolos de extração, purificação e PCR de DNA de fezes humanas para estudo de microbioma.

Rio de Janeiro

2018

Autor: Ygor Parladore Silva.

Avaliação de protocolos de extração, purificação e PCR de DNA de fezes humanas para estudo de microbioma.

Trabalho de Conclusão de Curso da área de Biologia Molecular apresentado para obtenção de título de Bacharel em Biomedicina pela Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo de Matos Nogueira.

Rio de Janeiro

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

PP586 Parladore Silva, Ygor
Avaliação de protocolos de extração, purificação e PCR de DNA de fezes humanas para estudo de microbioma / Ygor Parladore Silva. -- Rio de Janeiro, 2018.
52

Orientador: Eduardo de Matos Nogueira.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Graduação em Biomedicina, 2018.

1. Microbiota intestinal. 2. Metagenômica. 3. Extração de DNA. 4. Purificação de DNA. 5. PCR. I. de Matos Nogueira, Eduardo, orient. II. Título.

Autor: Ygor Parladore Silva
Orientador: Prof. Dr. Eduardo de Matos Nogueira

Avaliação de protocolos de extração, purificação e PCR de DNA de fezes humanas para estudo de microbioma.

Trabalho de Conclusão de Curso da área de Biologia Molecular apresentado para obtenção de título de Bacharel em Biomedicina pela Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

Data de aprovação: _____/_____/_____

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Eduardo de Matos Nogueira
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

Prof. Dr. Adenilson de Souza da Fonseca
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

Prof. Dr. Rodolpho Mattos Albano
Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Dedico este trabalho a todas as pessoas que me fazem sentir especial num mundo inerentemente indiferente. Este é o resultado do sentimento de vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeira e especialmente aos meus pais, Valterci e Vera, acima de tudo por sempre me amarem. Agradeço por me darem o suporte e o incentivo de que precisei, sempre respeitando minhas escolhas, me orientando e me ajudando a seguir meus sonhos. Tenho com vocês uma dívida impagável pela qual só posso esperar recompensá-los com meu amor e meus feitos.

Aos meus irmãos, Yanna, Yuri e Carol. Yanna, apesar de nossos desentendimentos você segue sendo uma grande amiga para mim. Yuri, você sempre foi para mim um modelo a ser seguido, eu agradeço por ter me mostrado um caminho seguro e como ser uma boa pessoa como você. Agora eu sigo meu próprio caminho e avalio meus próprios interesses, mas seu direcionamento foi fundamental. Obrigado também por sua amizade incondicional. Carol, apesar de cunhada você é praticamente uma irmã, por isso quero te agradecer pelo seu amor e amizade.

À Letícia, minha Leli, meu amor. Obrigado por encarar comigo os dias mais escuros e me mostrar que ainda pode haver luz. Por me motivar e me colocar no eixo pra não desistir nunca. Por me amar e me fazer feliz. Você é o amor da minha vida. Te amo.

Aos meus amigos, os antigos e os novos, obrigado. Lucas, Bernardo e Pedro, vocês foram essenciais para não me deixar desanimar quando parecia não haver vida fora da faculdade e das obrigações. Ao pessoal da faculdade, muitas pessoas para enumerar, vocês tornaram a rotina desta jornada muito mais prazerosa e estimulante. Devo muito a vocês. À equipe do Laboratório de Genômica, todos com quem trabalhei ao longo da iniciação científica e na execução do presente estudo. Obrigado por seu companheirismo e por toda ajuda.

Ao meu orientador, Eduardo, obrigado por me iniciar na pesquisa científica, atuando como guia ao longo de quase toda minha formação acadêmica. Agradeço por toda sua paciência e dedicação em me transmitir seus conhecimentos. Agradeço também por sua amizade.

Aos mestres, cujos ensinamentos tive o prazer de receber. Todos os professores que me guiaram ao longo de minha trajetória para chegar onde estou agora. Os professores do curso de biomedicina que expandiram os horizontes de meu conhecimento e me permitiram aprender com eles. Ao professor Marcello Sampaio, por ensinar muito mais sobre a vida acadêmica e profissional do que apenas parasitologia em suas aulas. À professora Rosa por me permitir trabalhar como seu monitor, me mostrando que a melhor forma de aprender é ajudando outros a aprenderem. Aos funcionários da universidade, sem os quais não seria possível a trajetória da graduação. Reitor, coordenadores, secretários, técnicos e trabalhadores, obrigado.

Aos membros da banca avaliadora, Prof. Dr. Rodolpho Albano, Prof. Dr. Fabiano Salgueiro, Prof. Dr. Adenilson Fonseca, obrigado desde já pela consideração e pela oportunidade de aprender convosco.

RESUMO

Crescentes evidências mostram que a microbiota desempenha funções vitais para a saúde. Sua principal forma de estudo é pela metagenômica, ou seja, sequenciamento da comunidade bacteriana, análise de seu perfil e associação com condições de saúde e doença. Tecnologias atuais de sequenciamento possuem grande processividade, porém procedimentos para realização de tais pesquisas estão pouco padronizados, como desenho de estudo, método de extração de DNA, montagem de bibliotecas e análise bioinformática. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi padronizar um protocolo com melhor custo-benefício para futuros estudos da microbiota intestinal humana no Laboratório de Genômica da UNIRIO. Amostras de fezes de uma pessoa saudável da equipe foram coletadas para avaliação de métodos de extração de DNA e kits de purificação e PCR. Os métodos de extração testados foram de Zoetendal (2006), por lise celular mecânica, e de Doyle e Doyle (1987), por lise celular química, ambos com adaptações. Foram testados três kits de purificação de DNA, dois que empregam imobilização magnética e um de filtração por membrana. Estes foram usados isoladamente ou combinados entre si, em um total de 7 protocolos diferentes. Três kits de PCR foram testados para amplificação da região V4 do gene codificador de rRNA 16S com oligonucleotídeos desenhados para sequenciamento de plataforma Illumina. Ambos os métodos de extração foram eficientes em isolar DNA genômico íntegro das amostras de fezes e puderam ser adaptados para uso de grandes volumes. Essa adaptação permite obtenção de amostras mais representativas da microbiota e geração de maior massa de DNA para análises posteriores. Todos os protocolos de purificação testados mantiveram o DNA genômico, porém a maioria apresentou perda de massa. No entanto, o parâmetro de eficiência da purificação no laboratório é a viabilidade da solução de DNA para PCR. O protocolo mais eficiente foi o do kit ProNex Size-Selective Purification System (Promega) feito duas vezes. Apesar de ser o protocolo mais caro, foi o que gerou maior número de PCRs positivas. Da mesma forma, o método CTAB foi o que gerou mais extratos de DNA que funcionaram na PCR. O kit de PCR com melhor custo-benefício foi o GoTaq G2 Hot Start Colorless (Promega), que não só apresentou maior eficiência na amplificação das amostras de DNA purificadas, como também possui o menor custo dentre os kits testados. As características diferenciais do kit são sua maior concentração de $MgCl_2^{2+}$ e o uso de enzima Taq hot-start.

Palavras-chave: Microbiota intestinal. Metagenômica. Extração de DNA. Purificação de DNA. PCR.

ABSTRACT

Growing evidence shows that the microbiota plays vital roles in health. The main form of studying it is by metagenomics, which is sequencing of the bacterial community, analysis of its profile and association with health and disease conditions. Current sequencing technologies have great throughput, but procedures for conducting such research are not fully standardized, such as study design, DNA extraction method, library assembly and bioinformatics analysis. Therefore, the aim of this work was to standardize a protocol with the best cost-benefit for future studies of the human intestinal microbiota in the UNIRIO Genomics Laboratory. Stool samples from a healthy person from the lab were collected for evaluation of DNA extraction methods and kits for purification and PCR. The extraction methods tested were Zoetendal's (2006), by mechanical cell lysis, and Doyle and Doyle's (1987), by chemical cell lysis, both with adaptations. Three DNA purification kits were evaluated, two employing magnetic immobilization and one employing membrane filtration. These were used alone or in combination, in a total of 7 different protocols. Three PCR kits were tested for amplification of the 16S rRNA encoding gene V4 region with primers designed for the Illumina platform sequencing. Both extraction methods were efficient in isolating whole genomic DNA from fecal samples and could be adapted for use in large volumes. This adaptation allows obtaining more representative samples of the microbiota and generating a larger mass of DNA for later analysis. From the purification protocols evaluated, all maintained the genomic DNA, but most presented mass loss. However, the efficiency parameter of purification in the laboratory is viability of the DNA solution for PCR. In this case the most efficient protocol was the ProNex Size-Selective Purification System (Promega) kit done twice in a row. Although it was also the most expensive protocol, it generated higher number of positive PCRs. Likewise, the Doyle & Doyle method was the one that had the most viable DNA extracts for PCR. The most cost-effective PCR kit was the GoTaq G2 Hot Start Colorless (Promega), which not only presented higher efficiency in the amplification of the purified DNA samples, but also had the lowest cost among the kits tested. The differential characteristics of the kit are its higher concentration of $MgCl_2^{2+}$ and the use of hot-start Taq enzyme.

Key-words: Intestinal microbiota. Metagenomics. DNA extraction. DNA purification. PCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Funções metabólicas, estruturais e imunes da microbiota intestinal eubiótica.....	16
Figura 2: Efeito de 22 descritores de manipulação de protocolos de extração de DNA.....	20
Figura 3: Esquema de pontos de ataque de inibidores de PCR.....	23
Figura 4: As três etapas da PCR mostradas no primeiro ciclo e a amplificação exponencial do DNA alvo.....	26
Figura 5: Fotografias de DNA genômico em géis de agarose após eletroforese.....	36
Figura 6: Fotografias dos DNAs purificados em géis de agarose após eletroforese.....	38
Figura 7: Custo de protocolos de purificação de DNA.....	39
Figura 8: Fotografias dos produtos de PCR de 16S em géis de agarose após eletroforese.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Protocolos de purificação de DNA genômico para PCR.....	33
Tabela 2: Kits de PCR usados.....	35
Tabela 3: Resumo de dados de extrações de DNA.....	37
Tabela 4: Análise quantitativa do DNA após protocolos de purificação.....	38
Tabela 5: Resumo de resultados de PCR.....	39
Tabela 6: Relação custo-benefício dos kits de PCR testados.....	42
Tabela 7: Composição dos kits de PCR testados.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A – Adenina (nucleotídeo)
B4 – Binding Buffer
BSA – Albumina Sérica Bovina
C – Citosina (nucleotídeo)
CTAB – Brometo de Cetrimônio
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNA – Ácido desoxirribonucleico
dNTP – Trifosfato de Deoxinucleotídeos
EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EtOH – Etanol
g – Força Gravitacional
G – Guanina (nucleotídeo)
G-C – Guanina-Citosina
gDNA – DNA Genômico
HCl – Ácido Clorídrico
HMP – Projeto Microbioma Humano
kb – Quilobase
KCl – Cloreto de Potássio
M – Molar
mg – Miligramas
Mg²⁺ - Íon Magnésio
MgCl₂ – Cloreto de Magnésio
Deionizada – Água Deionizada
min – Minuto
min/kb – Minuto por Quilobase
mL - Mililitros
mm – Milímetros
mM – Milimolar
N/A – Não se aplica
NaCl – Cloreto de Sódio
NaOAc – Acetato de Sódio

NF – Não feito
ng – Nanograma por Microlitro
NGS – Sequenciamento de Nova Geração
°C – Graus Celsius
pb – Pares de Base
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
PFU – Polimerase de *Pyrococcus furiosus*
pH – Potencial Hidrogeniônico
PVP - Polivinilpirrolidona
rDNA 16S – Gene do rRNA 16S
rRNA 16S – RNA Ribossomal 16S
RT – Transcriptase Reversa
RT-PCR – Reação de Transcriptase Reversa seguida por PCR
SCFA – Ácidos Graxos de Cadeia Curta
SDS – Dodecil-sulfato de Sódio
SPRI – Imobilização Reversível em Fase Sólida
T – Timina (nucleotídeo)
T_a – Temperatura de Hibridização
TAE - Tris-HCl, ácido acético glacial, EDTA
Taq – Polimerase de *Thermus aquaticus*
TE – Tampão Tris-HCl e EDTA
T_m – Temperatura de Melting
Tris-HCl – Tris(hidroximetil)aminometano-hidroclorato
V – Volumes
V/cm – Volts por centímetro
v/v – Volume por Volume
W4 – Wash Buffer 4
W5 – Wash Buffer 5
µg – Micrograma
µL – Microlitros
µM – Micromolar

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	Importância da microbiota intestinal	15
1.2	Estudo do microbioma intestinal	17
1.3	Extração de DNA de amostras fecais.....	19
1.4	Reação em cadeia da polimerase	22
2	Objetivos.....	28
2.1	Geral.....	28
2.2	Específicos:.....	28
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1	Coleta de fezes	29
3.2	Extração de DNA de fezes	29
3.2.1	Método de Zoetendal e col. (2006) modificado	29
3.2.2	Método de Doyle e Doyle (1987) modificado.....	31
3.3	Avaliação qualitativa e quantitativa do DNA	31
3.4	Purificação do gDNA.....	32
3.5	Avaliação da qualidade do gDNA para PCR.....	34
4	RESULTADOS	36
4.1	Eficiência de protocolos de extração	36
4.2	Eficiência de protocolos de purificação.....	37
4.3	Eficiência de amplificação de DNA	40
5	DISCUSSÃO	43
6	CONCLUSÃO.....	47
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

1 INTRODUÇÃO

1.1 Importância da microbiota intestinal

O contato com microrganismos pode levar a três resultados: colonização transitória, permanente ou infecção. Aqueles que colonizam tecidos humanos não provocam doença, ao passo que a infecção ocorre quando a instalação do patógeno gera um processo patológico caracterizado por dano ao organismo. A microbiota comensal é composta por microrganismos colonizadores e os sítios anatômicos com microbiota mais diversa e influente no metabolismo são os intestinos, principalmente o grosso (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2011).

Com mais de 1 trilhão de bactérias, a microbiota gastrointestinal representa 70% de toda a população de microrganismos comensais no corpo humano. O microbioma, genoma agregado de toda a microbiota, é da ordem de 250 a 800 vezes maior que o genoma humano. Esse contribui para o nosso metagenoma, somatório de todos os genomas presentes no organismo, com genes cruciais para nossa saúde, na metabolização de produtos alimentares, síntese de nutrientes, vitaminas e fatores tróficos. Ademais, os microrganismos presentes na comunidade desempenham funções vitais no metabolismo (PASCALE *et al*, 2018), na maturação do sistema nervoso (FUNG; OLSON; HSIAO, 2017), na maturação e modulação do sistema imune (PALM; DE ZOETE; FLAVELL, 2015) e proteção direta contra patógenos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012) (Figura 1).

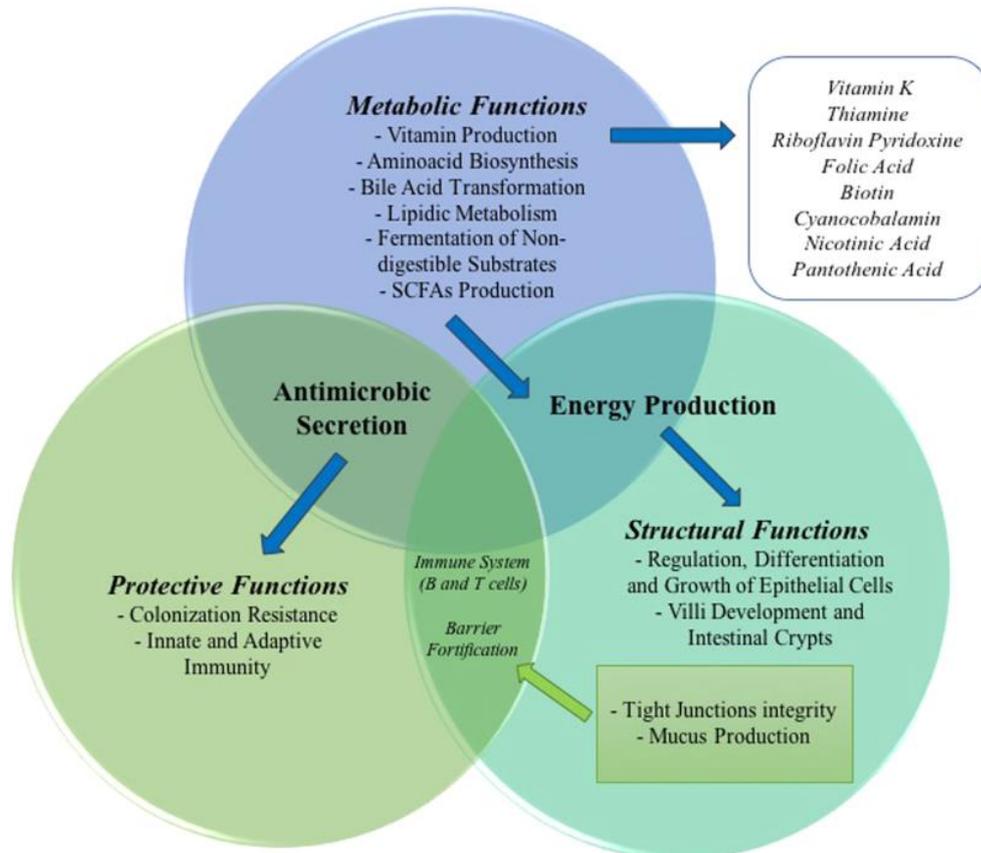


Figura 1: Funções metabólicas, estruturais e imunes da microbiota intestinal eubiótica. Pascale *et al.*, 2018.

O Projeto Microbioma Humano foi capaz de descrever os filos mais representativos da microbiota gastrointestinal, sendo eles, em ordem decrescente: *Bacteroidetes* (Gram -), *Firmicutes* (Gram +), *Proteobacteria* (Gram -) e *Verrucomicrobia* (Gram -) (HMP, 2012). Diversos fatores determinam contínuas modificações na microbiota intestinal, como modo de parto e de alimentação infantil, faixa etária, composição da dieta, origem geográfica, medicação e estresse. A princípio, todas essas variáveis apresentam modos mais ou menos vantajosos para a saúde e podem ser moduladas, umas mais que outras, para obter o máximo benefício da microbiota intestinal (CRESCI; BAWDEN, 2015).

A condição de eubiose é caracterizada por uma ampla gama de possibilidades composicionais da microbiota intestinal. Por definição, é a diversidade e equilíbrio de espécies que permitam a correta produção de metabólitos e desempenho de funcionalidades essenciais para o hospedeiro. Dessa forma, não existe um modelo de composição de espécies para definir eubiose, uma vez que a própria composição desta e sua interação com o organismo variam entre pessoas (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2011).

O desequilíbrio biótico ou disbiose está associado a diversas disfunções metabólicas e síndromes inflamatórias, como doença inflamatória do intestino, obesidade, diabetes, doenças cardiovasculares (DILLON *et al*, 2016). Assim como influencia na ocorrência de doenças, estas podem desequilibrar a microbiota, precipitando surgimento ou agravamento de sintomas. Por exemplo, doenças que gerem um quadro inflamatório subagudo, como algumas infecções virais e doenças metabólicas, rapidamente desregulam a função intestinal, tanto absorptiva quanto de barreira (CANI; DELZENNE, 2009). Isso resulta em alterações na microbiota, geralmente com seleção de microorganismos aerotolerantes e virulentos. A perda da integridade epitelial também propicia o trânsito de partículas microbianas, gerando um quadro de endotoxemia que agrava a inflamação sistêmica (TILG, H.; MOSCHEN, 2014).

Infecções virais já foram positivamente associadas a quadros de disbiose e já foi explorado o uso de probióticos para auxílio no tratamento dessas e outras enfermidades. Nem tudo está elucidado quanto aos mecanismos pelos quais a microbiota interage com o organismo em estados patológicos (ZHANG; LUN; TSUI, 2015). Dessa forma, para infecções virais com impacto sobre a microbiota é importante entender: (1) os mecanismos pelos quais influenciam a composição e diversidade da microbiota, (2) as consequências clínicas e patológicas da disbiose, (3) o impacto da supressão viral por tratamentos antivirais na homeostase entérica e (4) se é possível explorar terapeuticamente tais manifestações (DILLON *et al*, 2016).

1.2 Estudo do microbioma intestinal

Antes do Projeto Microbioma Humano (HMP), todos os dados referentes à microbiota provinham de estudos de cultivo, os quais se sabem atualmente que subestimam muito a ecologia microbiana, tanto em diversidade como em abundância (RAPPÉ; GIOVANNONI, 2003; SCHLOSS; HANDELSMAN, 2004). O estudo de 2012 foi o primeiro a analisar compreensivamente a ecologia da microbiota comensal humana por meio de técnicas de biologia molecular. Estima-se que foram encontradas 81% a 99% dos gêneros, enzimas produzidas e configurações ecológicas, gerando assinaturas microbianas nicho-específicas e correlações de variações de diversidade e abundância entre indivíduos. O projeto ressalta a

importância do uso de técnicas biomoleculares para o estudo da ecologia microbológica (HMP, 2012).

Metodologias de sequenciamento começaram a ser desenvolvidas em 1977 e, logo na primeira geração, culminaram na leitura completa do genoma humano, em 2003 (PAREEK; SMOCZYNSKI; TRETYN, 2011). Dentre as técnicas de primeira geração podem-se citar as de terminação de cadeia por dideoxinucleotídeos (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977), de degradação química (MAXAM; GILBERT, 1977) e posteriormente técnicas de sequenciamento emparelhado (EDWARDS *et al*, 1990). A metodologia de Sanger é utilizada ainda hoje de forma automatizada e com detecção de fluorescência para sequenciamento e para validação de dados de nova geração.

A partir de 2004 houve um grande crescimento no número de seqüências geradas em estudos de genoma e, posteriormente, metagenoma. Isso foi possível graças ao advento do sequenciamento de nova geração em larga escala (HT-NGS, ou apenas NGS), cujas principais técnicas empregadas são pirosequenciamento, sequenciamento por síntese, por ligação e torrente de íons. Todas as tecnologias de NGS têm em comum a produção de uma biblioteca de seqüências, seja por clivagem ou adição de adaptadores, e o uso de uma superfície sólida com ligantes dos adaptadores para formação de *clusters* (PAREEK; SMOCZYNSKI; TRETYN, 2011).

O rápido avanço nas tecnologias de sequenciamento permitiu um crescimento exponencial no número de estudos em metagenoma. No entanto, restam lacunas na padronização dos métodos de planejamento do estudo, extração de DNA, montagem de bibliotecas e análise dos dados de bioinformática. Essa padronização permite, por exemplo, a realização de metanálises dos estudos de microbioma, o que é difícil atualmente devido a erros de desenho de estudo e seleção de técnicas ou falhas no registro de procedimentos e dados (KNIGHT *et al*, 2018).

Estudos precisam ser planejados de forma a reduzir variáveis confundidoras em potencial, como idade, dieta e uso de antibióticos. A coleta de amostras deve representar completamente a comunidade microbológica, então ser conservada para impedir crescimento microbiano e degradação de DNA. O método de extração escolhido precisa ser eficiente para atuar em diversos modelos de membranas e estágios celulares com propriedades físico-químicas variadas. O DNA extraído precisa então ser transformado em uma biblioteca apropriada para o método de sequenciamento a ser utilizado. A escolha de protocolo para

análise dos resultados por bioinformática também é fonte de viés e precisa ser cuidadosamente executada (GOHL, 2017).

1.3 Extração de DNA de amostras fecais

O processo de isolamento de DNA é uma etapa crucial para a obtenção do material de partida para técnicas biomoleculares. Dessa forma, o método empregado deve levar em consideração a amostra que está sendo utilizada e o tipo celular do qual se pretende extrair. Procedimentos convencionais envolvem uma etapa de preparação da amostra, seguida por lise química ou mecânica de membranas celulares, precipitação de material orgânico (proteínas, polissacarídeos e ácidos graxos), precipitação e lavagem de material genético e eluição final (OLIVEIRA, 2015).

O uso de amostras de fezes para extração de DNA é vantajoso, por ser um método não invasivo, de fácil aderência por participantes e representar uma amostra parcialmente fidedigna da microbiota intestinal (THOMAS; CLARK; DORÉ, 2015). O isolamento do DNA da microbiota intestinal é um desafio devido à variedade de microorganismos e tipos de membranas e paredes encontradas. Este fator dificulta a implementação de um protocolo único de extração, que deve ser eficiente para bactérias Gram positivas e Gram negativas, além de, idealmente, fungos e protozoários (SINHA *et al*, 2017).

A composição das fezes também pode representar um fator dificultante para obtenção de DNA de qualidade. Por exemplo, o excesso de alguns inibidores presentes nas fezes são polissacarídeos complexos, lipídios, uratos e sais biliares não é removido por qualquer método de extração (ANGELAKIS *et al*, 2016) e estes atuam como inibidores da reação em cadeia da polimerase (PCR), devido à precipitação de ácidos nucleicos e degradação da enzima (SCHRADER *et al*, 2012).

Já foi demonstrado que, em estudos de microbioma humano, a metodologia de extração do DNA de amostras de fezes é o maior fator de viés na composição ecológica encontrada por sequenciamento. Ou seja, variações nos protocolos de processamento da amostra acabam por interferir na diversidade de espécies encontradas e, portanto, nos resultados obtidos (COSTEA *et al*, 2017; SINHA *et al*, 2017). Isso ocorre provavelmente

porque esta é a etapa do estudo de microbiota com maior variedade de métodos e menor padronização. Apenas no trabalho de Costea e col. (2017) foram avaliados 21 protocolos que variam em 22 descritores diferentes, desde uso de kits comerciais até reagentes químicos utilizados em cada etapa da extração, ou seja, lise celular, remoção de proteínas, precipitação e purificação (Figura 2).

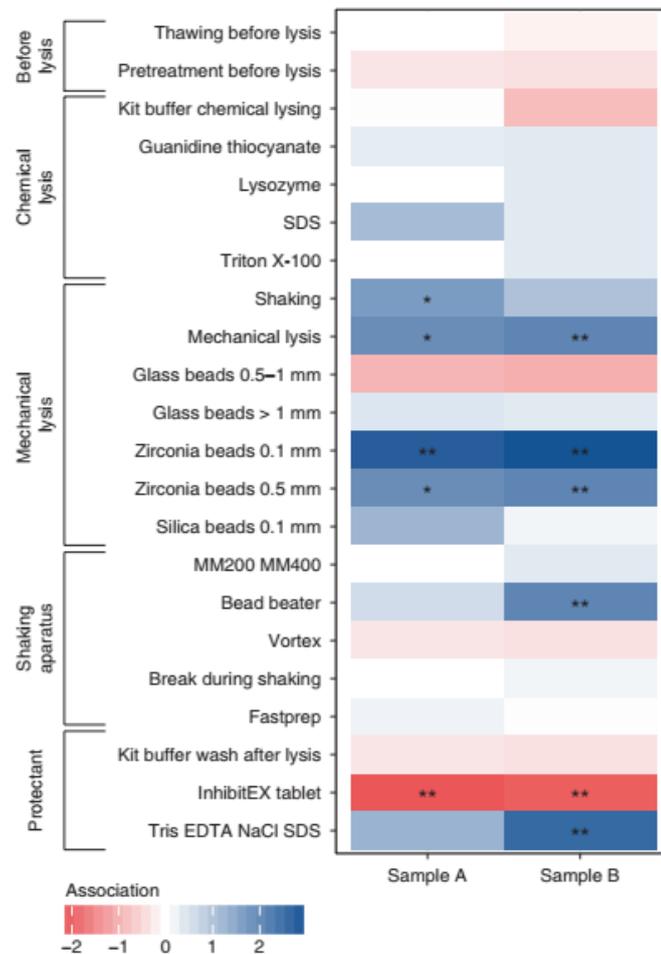


Figura 2: Efeito de 22 descritores de manipulação de protocolos de extração de DNA. Foram encontrados 7 descritores significativamente associados à diversidade de composição microbiana encontrada por sequenciamento metagenômico shotgun. Costea *et al*, 2017.

O uso de kits comerciais de extração de DNA geralmente simplifica os procedimentos de bancada e provê a garantia do fabricante quanto à eficiência e qualidade da extração. No entanto, é fato que esses kits oneram as pesquisas, o que representa um grande limitante em um país como o Brasil. Portanto, em um laboratório com orçamento limitado é preciso selecionar e padronizar cuidadosamente protocolos independentes que dispensem ao máximo

o uso de kits. Opta-se por reagentes e materiais convencionais e, preferencialmente, já utilizados no laboratório.

Métodos de extração de DNA de fezes são desenvolvidos continuamente no intuito de aumentar a eficiência de extração e possibilitar o sequenciamento metagenômico mais representativo possível. Nesse sentido, alguns métodos propostos são de tiocianato de guanidina com sílica, sistema polietilenoglicol e dextrano, fenol-clorofórmio, chelex 100. No entanto, vários desses apresentam limitações quanto à composição, quantidade e pré-tratamento necessário do material utilizado (ZHANG *et al*, 2006). Embora métodos independentes de extração de DNA possam ter etapas padronizadas e protocolos prontos, sempre é necessário testar sua reprodutibilidade no laboratório de trabalho, principalmente quando são feitas adaptações para moldá-los à realidade prática do orçamento (OLIVEIRA, 2015).

Um exemplo de protocolo independente projetado para extração de DNA de fezes é o de Zoetendal e col. (2006). Este consiste em utilizar amostras de fezes frescas que podem ser congeladas a -20 °C ou armazenadas em tampão TE (Tris-HCl e EDTA), que faz parte do protocolo de extração. São usadas pérolas de zircônio para lise mecânica das células e fenol:clorofórmio:alcoól-isoamílico para isolamento do DNA. O protocolo serve de base para execução de estudos em microbioma humano, mas tem potencial para adaptação a outras aplicações de microbioma.

De fato, o estudo de Costea e col. (2017) encontrou correlações positivas quanto ao uso de pérolas de zircônia sem que houvesse prejuízo na modificação do material por pérolas de vidro ou sílica, por exemplo (Figura 2). Essa observação condiz com a capacidade aumentada que a lise mecânica possui de romper a parede celular de bactérias Gram negativas em comparação com métodos químicos isolados.

Já um método que não é originalmente intencionado para o uso em amostras fecais é o protocolo de Doyle e Doyle (1987), que utiliza brometo de cetrimônio (CTAB) para lise celular. Este protocolo foi originalmente desenvolvido para extração de DNA de tecido vegetal, porém sua aplicabilidade já foi demonstrada para extração de DNA de microrganismos do solo (ZHOU; BRUNS; TIEDJE, 1996; JIN *et al*, 2014) e a do reagente CTAB como parte de um protocolo de extração de fezes (ZHANG *et al*, 2006). O uso de CTAB em estudos de vários tipos de solo tem relevância devido às semelhanças de

composição entre esse material e fezes e de protocolos de extração de DNA (THOMAS; CLARK; DORÉ, 2015).

O protocolo envolve uma etapa de maceração do material em nitrogênio líquido, o qual serve parcialmente como lise mecânica das células presentes. Além disso, o nitrogênio líquido desnatura enzimas que poderiam degradar o DNA, aumentando a estabilidade deste para início do protocolo. CTAB é um detergente não iônico capaz de lisar membranas celulares e precipitar polissacarídeos, os quais estão presentes na parede celular de bactérias Gram negativas e atuam como inibidores de PCR (OLIVEIRA, 2015).

Outros compostos químicos que podem substituir a etapa de lise ou serem adicionados aos protocolos de extração incluem dodecil-sulfato de sódio (SDS), tiocianato de guanidina (COSTEA, 2017) e n-lauroil sarcosina, normalmente utilizado em conjunto com tiocianato de guanidina (GODON *et al*, 1997). Esses compostos além de atuarem na lise de membranas degradam proteínas como DNase e chaperonas, permitindo melhor estabilidade e isolamento do DNA (OLIVEIRA, 2015).

1.4 Reação em cadeia da polimerase

PCR é uma técnica de biologia molecular desenvolvida em 1983 por Kary Mullis que consiste na amplificação de fragmentos de DNA *in vitro* para geração de inúmeras cópias desses e aplicação em procedimentos subsequentes, como sequenciamento (VAN PELT-VERKUIL, 2008). O método consiste em ciclos de temperaturas e de etapas de desnaturação do DNA, hibridização de oligonucleotídeos e extensão da molécula pela enzima DNA-polimerase. O resultado normalmente é avaliado em eletroforese em gel de agarose para verificar a obtenção de produtos (amplicons) do tamanho desejado (SHAFIQUE, 2012). No entanto, há muitos fatores que podem interferir na reação, dentre os quais são mais importantes: (1) o DNA molde e inibidores na amostra, (2) a DNA-polimerase, (3) o desenho dos oligonucleotídeos, (4) componentes do tampão de reação, (5) aditivos e (6) condições de termociclagem (ABM, 2017).

O DNA molde e inibidores presentes na reação são resultado direto do método de extração e purificação do DNA respectivamente. A extração precisa produzir DNA de

qualidade com pouca ou nenhuma fragmentação (COSTEA *et al*, 2017) e com o mínimo de contaminantes para ser apropriada para procedimentos subsequentes (OLIVEIRA, 2015). Esses inibidores, que estão comumente relacionados a amostras específicas, possuem mecanismos de ação variados (Figura 3), mas podem ser removidos por métodos de purificação adaptados ao protocolo de extração, por exemplo (SCHRADER *et al*, 2012).

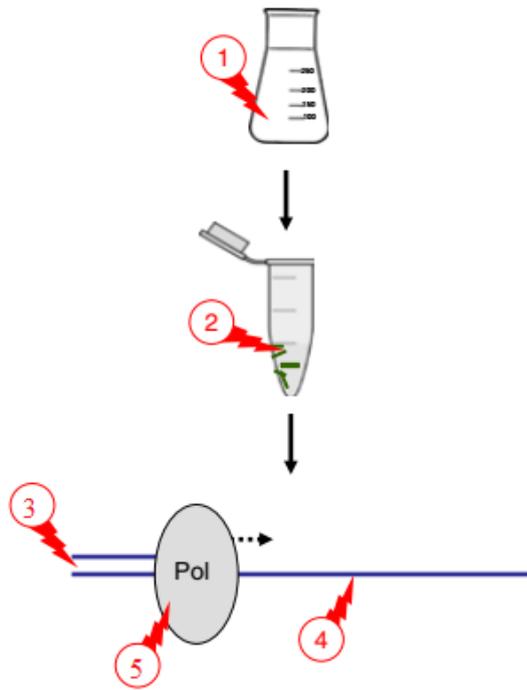


Figura 3: Esquema de pontos de ataque de inibidores de PCR. DNA pode interagir com superfícies (1), substâncias podem reagir com DNA (2), interferir na hibridização de oligonucleotídeos (3), modificar ou degradar o molde de DNA (4) e interferir na atividade da DNA polimerase (5). Adaptado de Schrader *et al.*, 2012.

Diversos métodos de purificação são aplicados para remoção de inibidores específicos para cada amostra, porém é comum o uso de kits comerciais para garantir a padronização do protocolo. Dois tipos de kits comerciais comuns são filtração por membranas de sílica e imobilização reversível em fase sólida (SPRI) (SCHRADER *et al*, 2012).

O primeiro consiste no uso de uma membrana semi-permeável de sílica que, na presença de sais, imobiliza o DNA do extrato e permite lavagens subsequentes por filtração, geralmente por meio de centrifugação. É um método utilizado com extratos de DNA de diversas matérias e aplicado por vezes em duplicata (KEMP; MONROE; SMITH, 2006). Já o segundo método utiliza purificação magnética e foi inicialmente desenvolvido para o preparo de produtos de PCR destinados ao sequenciamento, porém foi facilmente adaptado para a

purificação do molde de DNA e remoção de inibidores de PCR. É especialmente eficaz para processamento em larga escala por requerer menos reagentes e equipamentos (DEANGELIS; WANG; HAWKINS, 1995).

DNA polimerases são enzimas indispensáveis para a divisão celular utilizadas na PCR para amplificação das sequências. A enzima padrão utilizada é a Taq polimerase (taq-pol), primeiramente isolada da bactéria termófila *Thermus aquaticus*, pois apresenta atividade ótima a 75-80 °C, resistência à variação de temperaturas da termociclagem e capacidade de reutilização em vários ciclos de reação (SAIKI *et al*, 1988). Já a DNA polimerase PFU é uma enzima termoestável isolada de *Pyrococcus furiosus*, que apresenta adicionalmente à taq-pol atividade de exonuclease 3'-5', o que aumenta sua fidelidade (MCINERNEY; ADAMS; HADI, 2014). Essas enzimas não são apropriadas para ampliações de sequências longas (>4kb), pois apresentam baixa fidelidade (Taq) ou processividade (PFU), caso no qual são mais adequadas enzimas de longo alcance, uma combinação de DNA polimerase termoestável e exonuclease 3'-5' (CHENG *et al*, 1994).

Existem ainda DNA polimerases *hot-start*, que sofrem alguma modificação química para ficarem inativas a temperatura ambiente, o que reduz a hibridização inespecífica de oligonucleotídeos ao molde e aumenta a eficiência de amplificação. As modificações mais utilizadas por fabricantes são a adição de anticorpos monoclonais neutralizantes da polimerase (CHOU *et al*, 1992) e modificações químicas da enzima que a tornam inativa à temperatura ambiente. Ambos o métodos são revertidos em altas temperaturas quando o molde de DNA já está completamente desnaturado (GREEN; SAMBROOK, 2018).

Já o desenho dos oligonucleotídeos será definido pelo desenho de estudo traçado, pois dependerá dos genes sendo estudados e das regiões flanqueadoras disponíveis para inserção destes. No entanto, algumas características são desejáveis como: (1) tamanho de 18-30 nucleotídeos, (2) temperatura de fusão (T_m) de 50-65 °C com diferença máxima de 5 °C entre oligonucleotídeos senso e anti-senso, (3) temperatura de hibridização (T_a) até 5 °C menor que T_m , (4) proporção de guanina-citosina (G-C) de 40-60% para hibridização específica, (5) evitar sequências complementares entre oligonucleotídeos para evitar sua dimerização. Existem muitas ferramentas de desenho de oligonucleotídeos disponíveis online (ABM, 2017).

Existe um conjunto padrão de reagentes e componentes da PCR que normalmente são mantidos em qualquer protocolo, tendo apenas suas concentrações ajustadas para otimização da reação. Os quatro trifosfatos de deoxinucleotídeos (dNTP), sendo eles de adenina, guanina,

citocina e timina, são as moléculas primárias de construção do produto de DNA sendo amplificado, utilizadas na concentração de 20-200 μM cada. Em geral, utiliza-se a maior concentração desse espectro visando equilíbrio na fidelidade, especificidade e rendimento (INNIS *et al*, 1990).

O íon magnésio (Mg^{2+}) é essencial para a reação, pois atua como cofator para a enzima DNA-polimerase. Esta necessita de um íon divalente para anular as cargas negativas dos dNTP enquanto atua em sua incorporação na cadeia de DNA crescente (ALBERTS *et al.*, 2010). Para PCR, é usado cloreto de magnésio (MgCl_2), cuja concentração afeta, além de atividade e fidelidade da DNA polimerase, diversos fatores da reação como hibridização de oligonucleotídeos, temperatura de dissociação de DNA dupla fita, especificidade de produto, formação de dímeros de oligonucleotídeos. Assim, reações de PCR devem conter 0,5 a 2,5 μM de MgCl_2 e evitar a presença de quelantes como ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), que sequestram íons magnésio (INNIS *et al*, 1990).

Um tampão de reação é recomendado, sendo o mais utilizado o tris(hidroximetil)aminometano-hidrocloreto (Tris-HCl) (pH 8,3) a 20 mM, que garante uma faixa de pH de 6,8 a 7,8 nas condições comuns de termociclagem. Também se utiliza cloreto de potássio (KCl) a no máximo 50 mM para facilitar a hibridização de oligonucleotídeos ao molde devido à neutralização de cargas negativas de fosfato do DNA. Para produtos mais longos uma menor concentração do sal aumenta a eficiência da amplificação (SHAFIQUE, 2012).

Atualmente são utilizados kits comerciais de PCR, portanto a DNA-polimerase e os componentes do tampão de reação são inerentes ao kit de cada fabricante, o que deixa pouco espaço para ajustes em detrimento da seleção de um kit de maior eficiência. Porém mesmo os reagentes e suas concentrações são bem padronizados, de forma que os kits variam principalmente nos aditivos utilizados (ABM, 2017). A função destes aditivos é melhorar a eficiência de amplificação em situações específicas, como de moldes ricos em G-C e na supressão de inibidores da reação, ainda que por mecanismos variados. Por exemplo, dimetilsulfóxido (DMSO), betaína e formamida atuam desestabilizando estruturas secundárias da cadeia e promovendo a dissociação das moléculas de DNA. Albumina sérica bovina (BSA), proteínas estabilizantes e íons de amônio atuam reduzindo efeitos inibitórios de inibidores presentes na amostra (SHAFIQUE, 2012).

A termociclagem consiste em ciclos de temperaturas compostos pelas etapas de desnaturação da molécula de DNA, hibridização de oligonucleotídeos e extensão das fitas de DNA (Figura 4), que podem ser modificados na duração e temperatura para adaptar a cada aplicação. A desnaturação normalmente ocorre entre 90-95 °C, podendo ser maior e mais longa em casos de moldes com alta proporção de G-C, ou menor e mais curta para prevenir alterações químicas de nucleotídeos. A T_a depende dos oligonucleotídeos que estão sendo usados, pois deve estar a 5 °C da T_m , sendo que maiores T_a resultam em maior especificidade e menores T_a em maior rendimento. A extensão depende da temperatura ótima de atividade da DNA polimerase sendo utilizada, informação que normalmente é fornecida pelo fabricante bem como a processividade da enzima (ou tempo necessário para replicação de 1 kb), mas costuma estar entre 70 °C e 75 °C e durar 1 min/kb. Tipicamente, 25-35 ciclos são suficientes para formação de produtos suficiente para procedimentos subsequentes, mas esse número também pode ser ajustado caso o rendimento esteja baixo (SHAFIQUE, 2012).

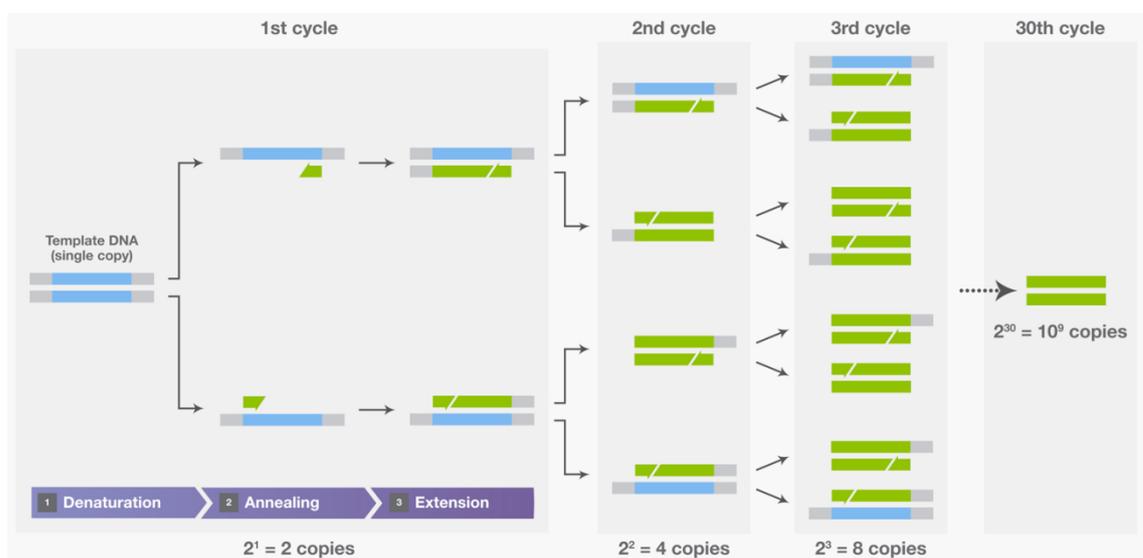


Figura 4: As três etapas da PCR mostradas no primeiro ciclo e a amplificação exponencial do DNA alvo. ThermoFisher Scientific, PCR Education.

Esta etapa em estudos de genômica nada mais é do que a preparação das amostras de DNA que serão sequenciadas. As atuais tecnologias de NGS requerem a montagem de bibliotecas que permitam a adaptação das sequências à superfície sólida do equipamento que será usada para a geração de *clusters* e leitura simultânea de milhões de sequências (ABM, 2017).

No caso de estudos de microbioma bacteriano, o método normalmente utilizado é o de gene marcador do rRNA 16S (rDNA 16S). Apesar de gerar sequências menores e, portanto, ter um poder de resolução entre espécies menor quando comparado ao sequenciamento de genoma, o gene 16S fornece um ótimo panorama da composição e diversidade microbiana em amostras. As PCR que são feitas para amplificar o gene geralmente têm como alvo apenas uma ou poucas regiões hipervariáveis consecutivas deste, entre V1 e V9, mas raramente o gene inteiro (V1-V9) (KNIGHT *et al*, 2017).

Uma etapa importante para a montagem da biblioteca é seleção apropriada de oligonucleotídeos e do método de inserção dos adaptadores. Nos sistemas de sequenciamento Illumina é possível obter oligonucleotídeos que já vêm com as sequências adaptadoras, os quais permitem a inserção destas na própria reação de PCR. Isso poupa uma etapa extra de manipulação do material e possível inserção de erro, resultando na geração de produtos de PCR que já compõem a biblioteca (LUNDBERG *et al*, 2013). Os oligonucleotídeos mais utilizados em cada aplicação de metagenômica geralmente podem ser encontrados na bibliografia ou solicitados por assessoria.

2 Objetivos

2.1 Geral

Padronizar protocolo com melhor custo-benefício para futuros estudos do microbioma intestinal humano.

2.2 Específicos:

- a) Identificar métodos de extração do DNA total de fezes humanas com melhor custo-benefício;
- b) Identificar kits de purificação e de PCR para o DNA extraído com melhor custo-benefício.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta de fezes

Para padronização dos métodos subsequentes à coleta, foram utilizadas amostras de fezes de pessoas saudáveis da equipe de pesquisa. Uma pequena amostra de fezes frescas foi coletada e armazenada em coletores comerciais a -20 °C até data do processamento (1-7 dias).

3.2 Extração de DNA de fezes

Foram utilizados dois métodos adaptados de extração de DNA: lise mecânica com pérolas de vidro (ZOETENDAL, 2006) e lise química com detergente CTAB (DOYLE & DOYLE, 1987).

3.2.1 Método de Zoetendal e col. (2006) modificado

200 mg de amostra de fezes foram suspensas em 1 mL de tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8,0). A suspensão foi pipetada para microtubo contendo 300 mg de pérolas de vidro de 0,5 mm de diâmetro e 150 µL de fenol pH 8,0. Seguiu-se lise mecânica por agitação em vortex por 3 minutos. A amostra foi resfriada em gelo por 1 min e adicionou-se 150 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Seguiu-se agitação por inversão por 1 minuto e centrifugação a 15700 g a 4 °C por 5 minutos.

O sobrenadante foi transferido para novo microtubo e repetiu-se a extração com fenol:clorofórmio:álcool-isoamílico (25:24:1 v/v) mais quatro vezes, três com centrifugação de 15700 g a 4 °C por 2 minutos e uma de 15700 g a 4 °C por 5 minutos com apenas 300 µL de clorofórmio:álcool-isoamílico (24:1 v/v). O sobrenadante foi transferido para dois microtubos, aos quais se adicionou 0,1 V (volumes) de NaOAc 3 M e 2 V de EtOH 96%

gelado. O DNA foi incubado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por uma noite. O precipitado de DNA foi obtido por centrifugação a 15700 g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 min. Este foi lavado duas vezes com $500\text{ }\mu\text{L}$ de EtOH 70% e centrifugado a 15700 g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min, descartando-se o etanol. O excesso de etanol foi aspirado e descartado, então o sedimento foi secado à temperatura ambiente por 5 min. Este foi suspenso em $100\text{ }\mu\text{L}$ de água deionizada autoclavada e incubado a temperatura ambiente por 30 minutos. O DNA foi armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para padronização do protocolo foram testadas três condições de esterilização das pérolas de vidro: autoclavação, lavagem com HCl 6 M e autoclavação, lavagem com HCl 0,1 M e autoclavação. As lavagens com HCl foram feitas com volume suficiente para cobrir as pérolas em tubo cônico de plástico de 15 mL sob agitação em vortex. Em seguida, foi removido o HCl e foram feitas cinco lavagens com água deionizada autoclavada. Após remoção da água deionizada e secagem à temperatura ambiente por 30 minutos as pérolas de vidro foram autoclavadas.

Em seguida o protocolo foi adaptado para uso de grandes volumes. Com isso, os volumes foram triplicados para que o protocolo fosse realizado em tubos cônicos de plástico de 15 mL. A suspensão e lise iniciais foram feitas utilizando-se 600 mg de fezes, 3 mL de tampão TE, 900 mg de pérolas de vidro, $900\text{ }\mu\text{L}$ de fenol pH 8,0:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1 v/v). Seguiu-se homogeneização por 5 minutos, então centrifugação a 7197 g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 min. Foram feitas duas extrações com $450\text{ }\mu\text{L}$ de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1 v/v) com agitações de 5 minutos e centrifugações a 7197 g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min. A extração final foi feita com $900\text{ }\mu\text{L}$ de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1 v/v) seguida por agitação de 5 minutos e centrifugação a 7197 g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 min.

A precipitação foi feita seguindo a proporção de volumes de 0,1 V NaOAc 3 M e 2 V de EtOH 96% gelado com incubação por uma noite e centrifugação a 7197 g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 45 min. As lavagens foram feitas com cerca de 2 mL de EtOH 70% e centrifugações de 7197 g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 min. O excesso de etanol foi aspirado e descartado, então o sedimento foi secado à temperatura ambiente por 5 min. O DNA foi suspenso em $300\text{ }\mu\text{L}$ de água deionizada autoclavada e incubado a temperatura ambiente por 30 minutos. O DNA foi armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.2 Método de Doyle e Doyle (1987) modificado

No método CTAB, 400 μ L de β -mercaptoetanol foram adicionados a tubo plástico de 50 mL contendo 20 mL tampão de extração CTAB pré-aquecido em banho-maria à 65°C (Tampão CTAB: 100mM Tris-HCl, pH8,0; 1,4M NaCl; 2% CTAB; 20mM EDTA; 1% PVP 40.000) e então cerca de 1 g de amostra macerada em nitrogênio líquido foram transferidas para a solução. Seguiu-se incubação da solução em banho-maria a 65°C por 1 hora e agitação do tubo por inversão a cada 10 minutos.

O DNA foi extraído três vezes da mistura com 12 mL de clorofórmio, álcool isoamílico (24:1 v/v), sendo a mistura agitada por inversão do tubo por 5 minutos e centrifugada a 7197 g a 4°C por 10 minutos. O extrato foi precipitado com solução de 1,2 mL de 10% CTAB, 1,4 M NaCl mais 1 volume de isopropanol à -20°C por uma noite.

A suspensão foi centrifugada a 7197 g a 4°C por 1 hora, então o precipitado foi lavado duas vezes com etanol 70%, sendo agitado por 5 minutos e centrifugado a 7197 g a 4°C por 10 minutos, descartando-se o etanol a cada etapa. Foi então lavado com etanol 96% por agitação por 5 minutos e centrifugação a 7197 g a 4°C por 10 minutos. O excesso de etanol foi aspirado e descartado, então o sedimento foi secado à temperatura ambiente por 5 min. O DNA foi suspenso em 1 mL de água deionizada estéril e incubado a temperatura ambiente por 60 minutos antes de ser conservado a -20°C.

3.3 Avaliação qualitativa e quantitativa do DNA

Para análise qualitativa do DNA extraído foi empregada eletroforese em gel de agarose 1% submerso em tampão TAE 1x (diluído 50x do estoque: Tris-HCl 4 M, ácido acético glacial 11,4% v/v, EDTA 0,1 M) a 6,7 V/cm de gel por 16 minutos. As soluções de corrida consistiram em 1 μ L de tampão de amostra (0,25% de azul de bromofenol, 0,25%, xileno cianol FF, 30% de glicerol em água), 2 μ L de GelRed® (Biotium) 1:500 e 3 μ L de amostra de DNA. A posição das bandas foi comparada com eletroforese de λ -PstI visando moléculas de peso superior a 11500 pb.

As amostras de DNA e produtos de PCR foram quantificadas por fluorimetria utilizando o aparelho Qubit 2.0 (ThermoFisher Scientific) com kit Qubit™ dsDNA HS (Invitrogen, Q32851) seguindo o protocolo do fabricante. Sucintamente, diluiu-se volume suficiente do reagente Qubit™ dsDNA HS a 1:200 em tampão do kit (solução de trabalho) para os dois padrões e as amostras. Os padrões mínimo e máximo foram preparados com 190 µL de solução de trabalho mais 10 µL de padrão, enquanto as soluções de DNA foram compostas de 198 µL de solução de trabalho e 2 µL de DNA. As soluções foram agitadas em vortex por três segundos e incubadas na bancada por 2 minutos antes da aferição. A concentração da solução estoque foi calculada pelo próprio aparelho de acordo com a fórmula abaixo (C= concentração estoque em ng/µL; QF= concentração da solução Qubit em ng/mL) e expressa em ng/µL.

$$C = QF * 10^{-1}$$

3.4 Purificação do gDNA

Soluções de DNA que apresentassem cor ou turbidez foram purificadas por combinações dos kits Agencourt AMPure XP (BECKMAN COULTER, A63880), ProNex Size-Selective Purification System (PROMEGA, NG2001), que utilizam separação magnética, e PureLink Genomic Plant DNA Purification Kit (INVITROGEN, K183001), que utiliza separação por membrana, segundo respectivos protocolos dos fabricantes. A Tabela 1 resume os protocolos de purificação utilizados.

Tabela 1: Protocolos de purificação de DNA genômico para PCR

Protocolo de purificação	Kit(s) utilizado(s)
1	Agencourt
2	ProNex
3	Purelink
4	Agencourt + Agencourt
5	Agencourt + Purelink
6	ProNex + ProNex
7	ProNex + Purelink

Sucintamente, o protocolo Agencourt foi realizado com 100 μL de solução de DNA; o reagente Agencourt AMPureXP foi agitado por inversão, então 80 μL foram adicionados à amostra e homogeneizados por pipetagem 10 vezes. A solução foi incubada à temperatura ambiente por 5 minutos, então em bancada magnética por 2 minutos até as pérolas magnéticas se aglomerarem e a solução clarear. O sobrenadante foi descartado e foram feitas três lavagens com 200 μL de EtOH 70%. Após a última lavagem as pérolas secaram à temperatura ambiente por 2 minutos, então foram suspensas em 80 μL de H_2O deionizada autoclavada. A solução foi incubada à temperatura ambiente por 2 minutos, então na bancada magnética por 1 minuto até se tornar incolor e transferida para novo recipiente.

O protocolo ProNex se assemelha ao Agencourt, apenas diferindo no volume de reagente utilizado, nos tempos de incubação e no uso de um tampão de lavagem (reconstituído em EtOH 96%). O reagente ProNex foi homogeneizado em vortex por 10 segundos, então foram adicionados 100 μL deste a 100 μL de amostra. A solução foi homogeneizada por pipetagem 10 vezes, então incubada à temperatura ambiente por 10 minutos e em bancada magnética por 2 minutos até as pérolas magnéticas se aglomerarem e a solução clarear. O sobrenadante foi descartado e foram feitas 3 lavagens com 200 μL de solução de lavagem. Após a última lavagem as pérolas secaram à temperatura ambiente por 5 minutos, então foram suspensas em 50 μL de H_2O deionizada autoclavada. A solução foi incubada à temperatura ambiente por 2 minutos, então na bancada magnética por 1 minuto até se tornar incolor e transferida para novo recipiente.

Para o protocolo Purelink foram utilizados 100 μ L de amostra de DNA, à qual foram adicionados 150 μ L de Binding Buffer-EtOH 96% (B4) e homogeneizada por pipetagem 10 vezes. Pouco depois a solução foi transferida para um PureLink® Spin Cartridge acoplado ao tubo de lavagem e centrifugada a 10000 g por 30 segundos à temperatura ambiente. O filtrado foi descartado e foi feita uma lavagem com 500 μ L de Wash Buffer 4 (W4) centrifugando a 10000 g por 30 segundos. Foi feita uma lavagem 500 μ L de Wash Buffer 5-EtOH 96% (W5) centrifugando a 10000 g por 30 segundos. As lavagens foram repetidas, sempre descartando o filtrado. Na última lavagem com W5 foi feita centrifugação a 20000 g por 2 minutos. O Spin Cartridge foi transferido para um microtubo de 1,5 mL novo e o DNA foi eluído em 100 μ L de H₂O deionizada por incubação por 2 minutos e centrifugação a 20000 g por 2 minutos.

3.5 Avaliação da qualidade do gDNA para PCR

A fim de testar a qualidade das amostras de DNA para uso em PCR, foram realizadas reações com oligonucleotídeos para amplificação da região hipervariável 4 (V4) do gene 16S rRNA de bactéria, que já possuem a sequência adaptadora Illumina para NGS conforme descrito anteriormente por Caporaso (2011), Lundberg (2013), Kozich, (2013). Com isso seu tamanho total foi de 82 nucleotídeos do oligonucleotídeo 515F 5'-3' (AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT*NNNNNGTGCCAGCMGCCGCGGTAA*) e 90 do oligonucleotídeo 806R 5'-3' (*CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTTACCGACGAGTGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGACTACHVGGGTWTCTAAT*), sendo as sequências sublinhadas os adaptadores e a sequência em itálico a posição dos 12 nucleotídeos código de barra do oligonucleotídeo reverso.

Os kits utilizados para realização das PCR constam na Tabela 2. Os produtos de PCR foram avaliados por eletroforese buscando-se amplicons de 425 pb. As condições de corrida foram como já descritas, mas em gel de agarose 2% por 22 minutos. As soluções de corrida consistiram em 3 μ L de tampão de amostra, 6 μ L de GelRed® (Biotium) 1:500 e 9 μ L de amostra de PCR.

Tabela 2: Kits de PCR usados

Fabricante	Kit	Número de catálogo
Invitrogen	PCR Supermix	10572014
Invitrogen	AccuPrime Supermix I	12342010
Promega	GoTaq G2 Hot Start Colorless	M7432

As reações e programas de termociclagem foram como seguem:

a) PCR SuperMix (Invitrogen, número de catálogo 10572014);

A reação de 55 μL consistiu em 50 μL de Master Mix 1,1x, 1,0 μL de oligonucleotídeo 515F 20 μM , 1,0 μL de oligonucleotídeo 806R 20 μM , 3,0 μL de DNA (ou água deionizada para controle negativo). A termociclagem consistiu em uma desnaturação inicial a 95 $^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 95 $^{\circ}\text{C}$ por 90 segundos, hibridização a 50 $^{\circ}\text{C}$ por 90 segundos e extensão a 72 $^{\circ}\text{C}$ por 60 segundos, seguido por uma fase final de extensão a 72 $^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos.

b) AccuPrime SuperMix I (Invitrogen, número de catálogo 12342010);

Reação de 25 μL com 12,5 μL de Accuprime Supermix I 2x, 1,0 μL de oligonucleotídeo 515F 10 μM , 1,0 μL de oligonucleotídeo 806R 10 μM , 9,5 μL de água deionizada autoclavada, 1,0 μL de DNA (ou água deionizada para controle negativo). A termociclagem consistiu em uma desnaturação inicial a 94 $^{\circ}\text{C}$ por 3 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 95 $^{\circ}\text{C}$ por 45 segundos, hibridização a 50 $^{\circ}\text{C}$ por 60 segundos e extensão a 72 $^{\circ}\text{C}$ por 90 segundos, seguido por uma fase final de extensão a 72 $^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos.

c) GoTaq G2 Hot Start Colorless Master Mix (Promega, número de catálogo M7432).

Reação de 25 μL com 12,5 μL de GoTaq Master Mix 2x, 1,0 μL de oligonucleotídeo 515F 10 μM , 1,0 μL de oligonucleotídeo 806R 10 μM , 9,5 μL de água deionizada autoclavada, 1,0 μL de DNA (ou água deionizada para controle negativo). A termociclagem consistiu em uma desnaturação inicial a 94 $^{\circ}\text{C}$ por 3 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 95 $^{\circ}\text{C}$ por 45 segundos, hibridização a 50 $^{\circ}\text{C}$ por 60 segundos e extensão a 72 $^{\circ}\text{C}$ por 90 segundos, seguido por uma fase final de extensão a 72 $^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos.

4 RESULTADOS

4.1 Eficiência de protocolos de extração

Foram utilizadas duas amostras de fezes de apenas um indivíduo da equipe de pesquisa (N=1). A primeira foi utilizada para padronização do protocolo de lise mecânica, pois este nunca havia sido realizado no laboratório. Em seguida, a segunda amostra foi utilizada nas extrações pelos protocolos Zoetendal e CTAB para volumes maiores.

A extração do DNA da primeira amostra foi feita em duplicata das três condições de esterilização das pérolas de vidro, totalizando seis experimentos, como pode ser visto na Figura 1. Os poços 1 e 2 são do protocolo realizado com pérolas autoclavadas, 3 e 4, pérolas lavadas com HCl 0,1 M e autoclavadas, 5 e 6, pérolas lavadas com HCl 6 M e autoclavadas. Não foi observada diferença na eficiência de extração nas três condições. As extrações da segunda amostra de fezes foram feitas em tubos de 15 mL em duplicata para cada protocolo, correspondendo aos poços 7 e 8 (Zoetendal) e 9 e 10 (CTAB), respectivamente (Figura 5). O método de esterilização das pérolas foi autoclavação.

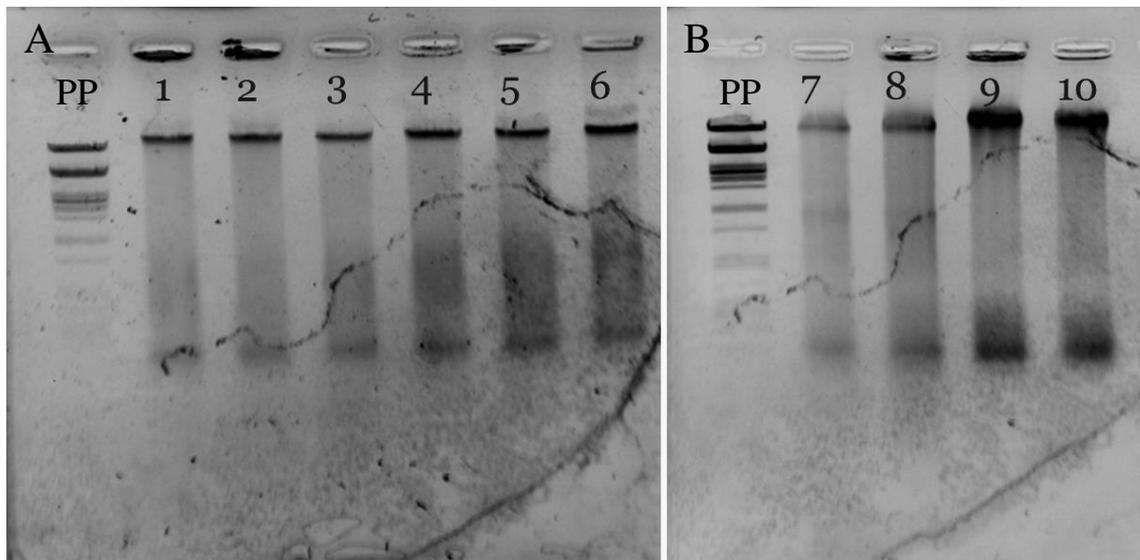


Figura 5: Fotografias de DNA genômico em géis de agarose após eletroforese. **Padrão de peso (PP):** λ -PstI. (A) Método Zoetendal para microtubo (1-2, protocolo realizado com pérolas autoclavadas, 3-4, pérolas lavadas com HCl 0,1 M e autoclavadas, 5-6, pérolas lavadas com HCl 6 M e autoclavadas); (B) Método Zoetendal (7-8, protocolo realizado com pérolas autoclavadas) e CTAB (9-10) para 15 mL.

Na eletroforese em gel de agarose foram observadas bandas de alto peso molecular em todos os experimentos de extração. Dessa forma, a eficiência qualitativa de ambos os métodos foi de 100%, mostrando que ambos podem ser utilizados para extração de DNA genômico íntegro de amostras de fezes (Figura 5). No entanto, em todos os casos a solução final de DNA apresentou cor (método Zoetendal) ou turbidez (método CTAB), indicando a necessidade de aplicação de protocolos de purificação antes de etapas subsequentes.

As massas de DNA obtidas pelos protocolos de extração foram calculadas a partir da concentração obtida por fluorimetria, para fim de normalização do conjunto de dados. Com essa normatização foi possível calcular uma estimativa de rendimento da extração ($\mu\text{g DNA/g fezes}$). Dessa forma a massa de DNA obtida no protocolo Zoetendal para microtubo variou entre 3,14 e 3,78 μg . Já o protocolo CTAB gerou uma massa média de 56,33 μg de DNA após as extrações. Dessa forma, o protocolo CTAB de grande volume foi constatado como o de maior rendimento. Não foi possível quantificar a solução original do protocolo Zoetendal adaptado. Um resumo dos dados das extrações de DNA pode ser encontrado na Tabela 3.

Tabela 3: Resumo de dados de extrações de DNA

Método de extração	Esterilização de pérolas	Cor e aspecto	Massa de fezes (g)	Massa de DNA (μg)	$\mu\text{g DNA/g fezes}$
Zoetendal 1,5 mL	Autoclavação	Marrom límpido	0,2	3,78	18,90
Zoetendal 1,5 mL	HCl 0,1 M	Marrom límpido	0,2	3,14	15,70
Zoetendal 1,5 mL	HCl 6 M	Marrom límpido	0,2	3,45	17,25
CTAB 20 mL	N/A	Incolor turvo	1,0	56,33	56,33

4.2 Eficiência de protocolos de purificação

As formas de avaliar a eficiência desses protocolos foram verificar a presença de DNA genômico em gel de agarose e a viabilidade de aplicação deste em PCR. Por eletroforese verificou-se que houve manutenção das bandas de DNA genômico em todos os protocolos de purificação, ou seja, não foi detectada perda do material genético (Figura 6). A quantificação acusou perda de massa de DNA na maioria das soluções testadas, como pode se ver na tabela 4. Porém, para nós, esta geralmente não é uma avaliação essencial para escolha do protocolo

de purificação. De fato, a análise de concentração só foi feita posteriormente no desenvolvimento do trabalho.

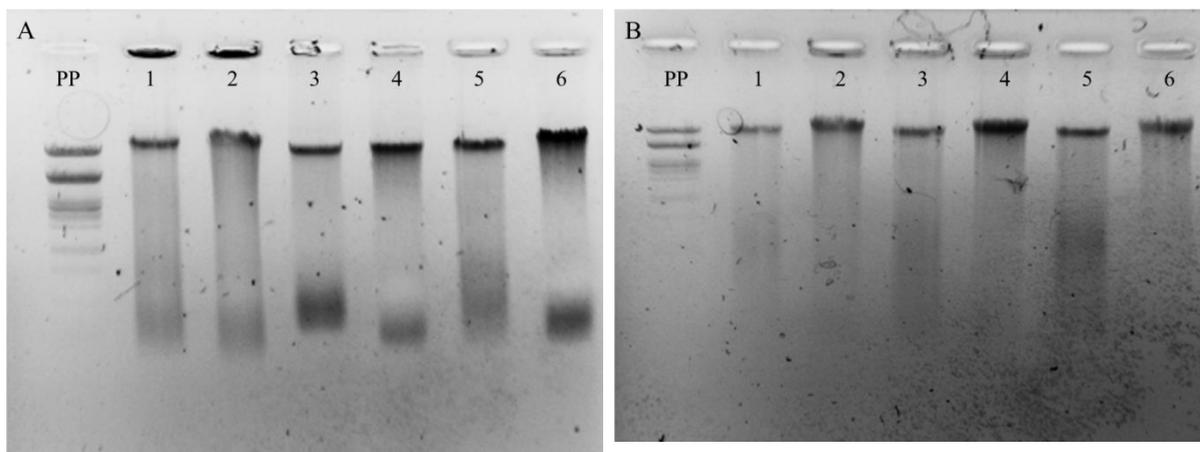


Figura 6: Fotografias dos DNAs purificados em géis de agarose após eletroforese. **PP**: padrão de peso λ -PstI. **A**: (1) extração de DNA por Zoetendal - purificação por Agencourt + Agencourt; (2) DNA CTAB - Agencourt + Agencourt; (3) DNA Zoetendal - Agencourt + Purelink; (4) DNA CTAB - Agencourt + Purelink; (5) DNA Zoetendal - Purelink; (6) DNA CTAB, Purelink. **B**: (1) DNA Zoetendal - ProNex; (2) DNA CTAB - ProNex; (3) DNA Zoetendal - ProNex + ProNex; (4) DNA CTAB - ProNex + ProNex; (5) DNA Zoetendal - ProNex + Purelink; (6) DNA CTAB - ProNex + Purelink.

Tabela 4: Análise quantitativa do DNA após protocolos de purificação

Purificações	Zoetendal		
	μg DNA partida	μg DNA final	Rendimento ($m_{\text{final}}/m_{\text{partida}}$ DNA)
Agencourt + Agencourt	9,28	4,64	0,50
Agencourt + Purelink	9,28	4,08	0,44
ProNex + ProNex	3,36	4,16	1,24
ProNex + Purelink	3,36	2,08	0,62
Purificações	CTAB		
ProNex	5,63	5,10	0,90
Purelink	5,63	4,85	0,90
ProNex + ProNex	5,10	5,20	1,02
ProNex + Purelink	5,10	4,27	0,84

A avaliação qualitativa por PCR mostrou que o kit ProNex foi superior ao Agencourt como medida inicial para protocolos de purificação (tabela 5). Dos métodos magnéticos, amostras de DNA purificados pelo kit ProNex tiveram maior sucesso na PCR do que aqueles purificados pelo kit Agencourt, porém ambos apresentaram melhor eficiência de PCR quando combinados com uma segunda purificação. O kit Purelink teve melhor desempenho como protocolo de etapa única, mas também teve melhora na eficiência quando aplicado posteriormente a um dos protocolos de SPRI.

Tabela 5: Resumo de resultados de PCR

Purificações	Zoetendal			CTAB 2		
	Supermix	Accuprime	Promega	Supermix	Accuprime	Promega
Agencourt	Negativo	Negativo	NF	Negativo	Negativo	NF
ProNex	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
Purelink	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Agencourt + Agencourt	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
Agencourt + Purelink	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
ProNex + ProNex	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
Pronex + Purelink	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo

O custo desses protocolos é uma preocupação, pois os dois melhores (ProNex e Purelink) são também os dois mais caros, custando respectivamente R\$17,85 e R\$17,20 por amostra. Além disso, o uso de protocolos de duas etapas para obtenção de melhor rendimento encarece o procedimento a até R\$35,70. Esses valores podem ser observados na figura 7.

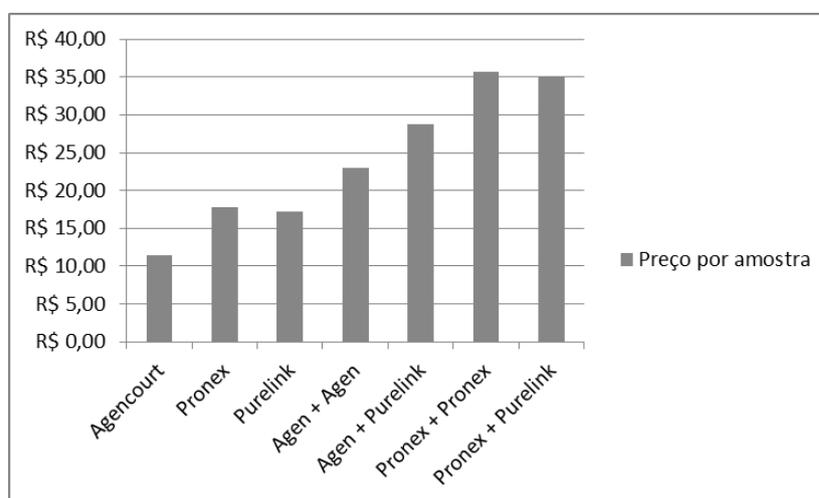


Figura 7: Custo de protocolos de purificação de DNA. Valores base obtidos nos respectivos sites dos produtos.

4.3 Eficiência de amplificação de DNA

O resultado do PCR para 16S foi avaliado qualitativamente por eletroforese em gel de agarose como positivo se apresentou banda de amplicon entre 339 pb e 460 pb, ou negativo se não apresentou a banda (Figura 8). O resultado foi usado como medida de eficiência dos métodos de extração, protocolos de purificação e kits de PCR utilizados. Eficiência foi definida como número de reações positivas dentre o número de reações testadas na mesma condição.

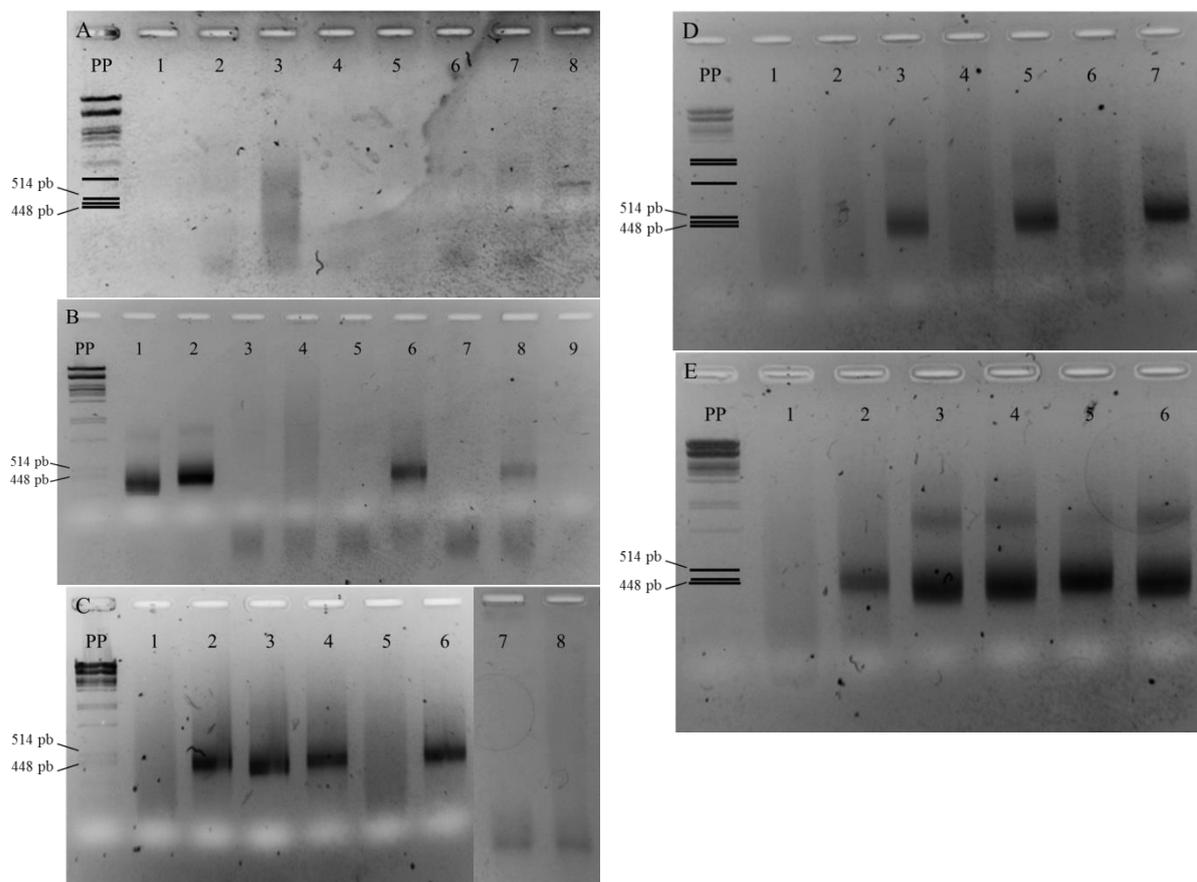


Figura 8: Fotografias dos produtos de PCR de 16S em géis de agarose após eletroforese. **PP**: padrão de peso λ -PST1. **A, PCR Supermix (Invitrogen)**: (1) extração de DNA por Zoetendal - purificação por Agencourt + Agencourt; (2) DNA CTAB - Agencourt + Agencourt; (3) DNA Zoetendal - Agencourt + PureLink; (4) DNA CTAB - Agencourt + PureLink; (5) DNA Zoetendal - Purelink; (6) DNA CTAB - Purelink; (7) Controle negativo; (8) DNA controle positivo. **B, AccuPrime Supermix I (Invitrogen)**: (1) DNA controle positivo 1; (2) DNA controle positivo 2; (3) DNA Zoetendal - Agencourt + Agencourt; (4) DNA CTAB - Agencourt + Agencourt; (5) DNA Zoetendal - Agencourt + PureLink; (6) DNA CTAB - Agencourt + PureLink; (7) DNA Zoetendal - Purelink; (8) DNA CTAB - Purelink; (9) Controle negativo. **C, AccuPrime Supermix I**: (1) DNA controle negativo; (2) DNA controle positivo; (3) DNA Zoetendal - ProNex + ProNex; (4) DNA CTAB - ProNex + ProNex; (5) DNA Zoetendal - ProNex + PureLink; (6) DNA CTAB - ProNex + PureLink; (7) DNA Zoetendal - ProNex; (8) DNA CTAB - ProNex. **D, GoTaq G2 Hot Start Colorless (Promega)**: (1) DNA controle negativo; (2) DNA Zoetendal - Agencourt + Agencourt; (3) DNA CTAB - Agencourt + Agencourt; (4) DNA Zoetendal - Agencourt + PureLink; (5) DNA CTAB - Agencourt + PureLink; (6) DNA Zoetendal - Purelink; (7) DNA CTAB - Purelink. **E, GoTaq G2 Hot Start Colorless**: (1) DNA Zoetendal - ProNex; (2) DNA CTAB - ProNex; (3) DNA Zoetendal - ProNex + ProNex; (4) DNA CTAB - ProNex + ProNex; (5) DNA Zoetendal - ProNex + PureLink; (6) DNA CTAB - ProNex + PureLink.

O método de extração que teve maior sucesso foi CTAB, cujos extratos de DNA puderam ser amplificados em todas as reações com o kit GoTaq e quase todas com o kit Accuprime. Os extratos de DNA de Zoetendal funcionaram apenas com os seguintes protocolos de purificação: Pronex feito duas vezes para ambos os kits de PCR e Pronex-Purelink para o kit GoTaq. O melhor protocolo de purificação foi Pronex-Pronex, que

permitiu a amplificação do gene 16S em todas as amostras de DNA, independentemente do método de extração ou kit de PCR. Dos protocolos de etapa única, o kit Purelink teve melhor eficácia, porém só permitiu a amplificação de DNAs extraídos pelo método CTAB (Tabela 5).

O kit de PCR mais eficiente foi o da Promega, que funcionou com todos os extratos de DNA do método CTAB em todas as condições de purificação testadas. Por outro lado o kit Accuprime não funcionou em todas as condições de purificação dos extratos de DNA CTAB e funcionou em menos reações com extratos do método Zoetendal. Já o kit de PCR SuperMix não apresentou amplificação perceptível e teve eficiência igual a zero. O kit com melhor custo-benefício foi o da Promega, que custa de R\$4,50 por reação de 25 μ L e apresentou melhor desempenho nos testes realizados. Já o kit Accuprime custa R\$8,43 por reação de 25 μ L, como pode ser visto na tabela 6.

Tabela 6: Relação custo-benefício dos kits de PCR testados

Fabricante	Nome do Kit	Número de catálogo	Preço por reação
Invitrogen	PCR SuperMix	10572014	R\$4,50
Invitrogen	AccuPrime SuperMix I	12342010	R\$8,43
Promega	GoTaq G2 Hot Start Colorless Master Mix	M7432	R\$4,50

5 DISCUSSÃO

Como evidenciado na literatura, não existe ainda um protocolo padrão ouro para extração de DNA de diversos materiais biológicos, como fezes, plantas e fungos, pois é comum laboratórios de pesquisa precisarem adequar metodologias à disponibilidade de materiais e equipamentos visando um melhor custo-benefício. Neste trabalho foram testados métodos de extração de DNA proveniente de fezes e kits para a execução de procedimentos necessários a um projeto de pesquisa sobre o microbioma intestinal humano.

Os dois protocolos testados foram selecionados de acordo com a disponibilidade de materiais para reduzir os custos dessa etapa. Desses, o método de Zoetendal foi projetado especificamente para estudos de microbiota intestinal enquanto o método CTAB é pouco utilizado nesse campo, mas possui evidências de eficácia na extração de amostras de solo (VERMA; SINGH; SHARMA, 2017), que compartilha métodos eficientes de extração com amostras de fezes (THOMAS; CLARK; DORÉ, 2015).

O primeiro método sofreu três adaptações: uso de pérolas de vidro de 0,5 mm invés de zircônio 0,1 mm, agitação em vortex ao invés de *bead-beater* e processamento de grandes volumes. Das três alterações feitas ao método, o uso de pérolas de variados materiais e diâmetros para lise mecânica e de vortex para agitação já foram estudados previamente em protocolos semelhantes, sendo constatado que não alteravam significativamente a variedade ou composição do microbioma sequenciado (COSTEA *et al.*, 2017).

Apesar da relativa simplicidade do método, mesmo em comparação com outros protocolos descritos por Costea e col. que utilizam lise por pérolas, foi obtido bom rendimento na extração de DNA (3,14-3,78 µg). No entanto, nenhuma das soluções estava própria para utilização no PCR, como evidenciado pela presença cor da solução final. Dessa forma, pode-se dizer que o protocolo testado tem razoável rendimento na obtenção de DNA, porém pouca eficiência para procedimentos subsequentes como PCR. Não foi feita a quantificação direta do extrato obtido pela adaptação para volumes maiores, mas a tendência é que o rendimento seja maior.

O método de Doyle e Doyle, apesar de ter sido originalmente criado para extração de DNA de plantas, é altamente adaptável para outros propósitos uma vez que é eficiente na lise de paredes celulares e extração de DNA de materiais com alto teor de polissacarídeos. Ao nosso conhecimento, não há evidências de seu uso para extração de DNA total de fezes, porém existem métodos semelhantes, como o descrito por Godon e col. (1997), que

empregam tiocianato de guanidina e N-lauril sarcosina, o último também um detergente e surfactante iônico. Além disso, o método já é largamente utilizado no laboratório para estudo de microbiota endofítica vegetal, o que favoreceu sua experimentação neste trabalho.

As soluções de DNA obtidas apresentavam turbidez e também tiveram que ser purificadas para utilização subsequente na etapa de PCR. Porém, o protocolo foi eficiente na extração de DNA genômico de grande volume de fezes e gerou o maior rendimento de massa de DNA por massa de fezes. A utilização de volumes maiores é uma medida adotada para obter uma amostra mais representativa da microbiota presente no material, sejam estes fezes, solo, tecido biológico. Além disso, como evidenciado nos dois protocolos, a extração de maior volume gera maiores concentrações de DNA, o que garante a obtenção de suficiente material de partida para todas as análises subsequentes.

Os kits de purificação de DNA testados consistiram em métodos de imobilização reversível em fase sólida (SPRI) magnética e separação por membrana de sílica. Os mecanismos de fixação e lavagem desses métodos diferem bastante, de forma que tem havido a preferência por protocolos de separação magnética, uma vez que estes são mais práticos, requerem menos equipamentos e servem para processar maior número de amostras (DEANGELIS; WANG; HAWKINS, 1995).

Nos testes realizados neste trabalho, foi necessária uma purificação secundária aos métodos SPRI para obter sucesso no PCR com pelo menos metade das amostras. Essa eficiência foi atingida em etapa única pelo método de membrana testado neste trabalho (Purelink, Invitrogen), que, novamente, não é originalmente projetado para uso em amostras de fezes, cujos principais resíduos são polissacarídeos, lipídios e sais biliares e de urato. Apesar disso a maior eficiência foi obtida com o uso do kit ProNex em duplicata. A necessidade de uso de kits de purificação também pode ser indicativo da necessidade de modificação dos protocolos de extração de DNA.

Apesar das diferenças de eficiência, os kits utilizados não apresentam grandes diferenças em sua composição ou grandes variações de uma reação padrão de PCR (INNIS, 1990). Algumas informações comparadas na composição dos kits podem ser encontradas na tabela 7.

Tabela 7: Composição dos kits de PCR testados

	Kit			Reação		
	Supermix	Accuprime	GoTaq	Supermix	Accuprime	GoTaq
Mix/Tampão	1,1x	2x	2x	1x	1x	1x
Tris-HCl	22 mM	40 mM	40 mM	19,8 mM	20 mM	20 mM
KCl	55 mM	100 mM	100 mM	49,5 mM	50 mM	50 mM
MgCl ₂	1,65 mM	3 mM	4 mM	1,485 mM	1,5 mM	2 mM
dNTP	220 µM	400 µM	400 µM	198 µM	200 µM	200 µM
<i>Taq</i>	0,022 U/uL	?	?	0,02 U/uL	?	?

O kit PCR Supermix é o mais barato e com menor eficiência de amplificação dentre os testados. Este possui baixa concentração de *Taq* em comparação a outros kits já utilizados no laboratório, porém não testados neste estudo (UniScience UNI-R201 e Applied Biosystems N8080160). Isso deixa a reação com o limite mínimo de uma unidade de enzima para uma reação padrão (INNIS, 1990), o que pode justificar porque foi o kit com piores resultados de amplificação até mesmo de controles positivos padronizados (não apresentado).

De fato, a baixa eficiência do kit PCR Supermix foi o que motivou as modificações da termociclagem, a única diferente dentre os kits testados. O aumento no número de ciclos e nos tempos de desnaturação e hibridização tem o objetivo de tornar a reação mais provável de ocorrer. Isso se dá pela maior repetição das etapas da PCR, maior tempo disponível para que haja completa separação das moléculas de DNA e para que haja ligação dos oligonucleotídeos nos sítios alvo, respectivamente. É comum que tais mudanças gerem produtos inespecíficos, o que requer o ajuste gradual nas temperaturas e tempos. No entanto, tais modificações não geraram qualquer amplificação pelo kit PCR Supermix.

Dos kits com melhor eficiência, AccuPrime informa em sua composição a presença de uma estabilizantes que aumentam a afinidade da hibridização oligonucleotídeo-molde (INVITROGEN, 2018). Tanto esse quanto o kit GoTaq apresentam tecnologia *hot-start* de inativação à temperatura ambiente da enzima polimerase por anticorpos específicos. Isso aumenta a especificidade da reação gerando menos produtos de amplificação inespecíficos e, em geral, aumentando a eficiência da reação (CHOU *et al*, 1992). No kit da Promega não são informadas a presença de aditivos ou a concentração de *Taq*-pol, porém a concentração final de MgCl₂ de 2 mM é a maior dentre os kits testados (PROMEGA, 2018).

Ficou claro pela taxa de eficiência (Tabela 5) e custo de reação (Tabela 6) que o kit com melhor custo-benefício é o GoTaq G2 Hot Start Colorless Master Mix (Promega). Uma possível explicação é a presença de maior concentração de íons de magnésio na reação, que atuam como cofator da enzima polimerase (WATSON, 2015). A indisponibilidade de informações na composição de kits comerciais restringe a capacidade adaptativa de desenhos de estudo. Isso se deve principalmente a questões de uso proprietário que não são divulgadas aos usuários. Porém a escolha de kits comerciais representa sim uma facilidade e a simples descrição do produto utilizado deve ser suficiente para replicação de experimentos entre laboratórios.

6 CONCLUSÃO

Métodos de extração de DNA de fezes que combinem lise mecânica com lise química são desejáveis para aplicação em pesquisas de microbiota intestinal. O método CTAB utilizado neste trabalho apresenta melhor relação custo-benefício em relação ao método Zoetendal, tendo em vista que já é amplamente utilizado no laboratório, teve maior rendimento de extração e gerou amostras de DNA mais límpidas.

Ambos os métodos testados requerem o uso de métodos de purificação. Dentre esses, o protocolo mais eficiente envolve o uso do kit ProNex Size-Selective Purification System (Promega), possivelmente combinado com uma purificação secundária, porém também é o de maior custo. Aquele com menor custo foi o kit PureLink Genomic Plant DNA Purification (Invitrogen), porém apenas se aplica aos extratos de DNA pelo protocolo CTAB. Devido à necessidade de purificação posterior à extração do DNA, outros kits podem ser testados ou o método de extração revisado para melhorar a eficiência de etapas posteriores.

O kit de PCR com melhor custo benefício neste trabalho foi o GoTaq G2 Hot Start Colorless Master Mix (Promega), sendo de fato aquele com menor custo por reação e com maior eficiência de amplificação. Por ser eficiente mesmo com uso dos oligonucleotídeos longos da tecnologia Illumina, é o recomendado para execução de projetos de pesquisa de sequenciamento de microbioma intestinal humano.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**, 7a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
- ABM, Applied Biological Materials. **ABM's Knowledge Base**. 2017. Disponível em <https://www.abmgood.com/marketing/knowledge_base.php?pk_campaign=front%20page&pk_kwd=knowledge%20base>. Acessado em 01/10/2018.
- ALBERTS, B. *et al.* **Biologia Molecular da Célula**. Artmed Editora, 2010.
- ANGELAKIS, E. *et al.* Glycans affect DNA extraction and induce substantial differences in gut metagenomic studies. **Scientific Reports**, v. 6, p. 26276, 2016.
- BECKMAN COULTER. **Agencourt AMPure XP: A63880, A63881, A63882**. Disponível em <[https://www.beckman.com/reagents/genomic/cleanup-and-size-selection/pcr#f:@category=\[Consumable%20IFU%2FSetting%20Sheet\]>](https://www.beckman.com/reagents/genomic/cleanup-and-size-selection/pcr#f:@category=[Consumable%20IFU%2FSetting%20Sheet]>)>. Acessado em 03/10/2018.
- CANI, P. D.; DELZENNE, N. M. The Role of the Gut Microbiota in Energy Metabolism and Metabolic Disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 15, n. 13, p. 1546–1558, 2009.
- CAPORASO, J.G. *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**. V. 7, p. 335–6, 2010.
- CHAVES, P.B. *et al.* DNA barcoding meets molecular scatology: short mtDNA sequences for standardized species assignment of carnivore noninvasive samples. **Molecular Ecology Resources**, v. 12, n. 1, p. 18-35, 2012.
- CHENG, S. *et al.* Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 12, p. 5695-5699, 1994.
- COSTEA, P.I. *et al.* Towards standards for human fecal sample processing in metagenomic studies. **Nature Biotechnology**, v. 35, n. 11, p. 1069, 2017.
- CRESCI, G.A.; BAWDEN, E. Gut microbiome: what we do and don't know. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 30, n. 6, p. 734-746, 2015.
- DEANGELIS, M.M.; WANG, D.G.; HAWKINS, T.L. Solid-phase reversible immobilization for the isolation of PCR products. **Nucleic Acids Research**, v. 23, n. 22, p. 4742, 1995.

- DILLON, S.M. *et al.* The gut microbiome and HIV-1 pathogenesis: a two-way street. **AIDS**, v. 30, n. 18, p. 2737-2751, 2016.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, p.11-15, 1987.
- EDWARDS, A. *et al.* Automated DNA sequencing of the human HPRT locus. **Genomics**, v. 6, n. 4, p. 593-608, 1990.
- FUNG, T.C.; OLSON, C.A.; HSIAO, E.Y. Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. **Nature Neuroscience**, v. 20, n. 2, p. 145, 2017.
- GODON, J-J. *et al.* Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 7, p. 2802-2813, 1997.
- GOHL, D. M. The ecological landscape of microbiome science. **Nature Biotechnology**, v. 35, n. 11, p. 1047, 2017.
- HMP, The Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature**, v. 486, n. 7402, p. 207, 2012.
- HOLLINGSWORTH, P.M.; GRAHAM, S.W.; LITTLE, D.P. Choosing and using a plant DNA barcode. **PloS One**, v. 6, n. 5, p. e19254, 2011.
- INNIS, M.A. *et al.* **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic press, 1990.
- INVITROGEN. **AccuPrime™ SuperMix I: 12342010**. Disponível em <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/12342010>>. Acessado em 15/10/2018.
- INVITROGEN. **PureLink™ Genomic Plant DNA Purification Kit: K183001**. Disponível em <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K183001?SID=srch-hj-K1830-01>>. Acessado em 03/10/2018.
- JIN, H. *et al.* Metagenomic analyses reveal phylogenetic diversity of carboxypeptidase gene sequences in activated sludge of a wastewater treatment plant in Shanghai, China. **Annals of Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 689-697, 2014.

- KEMP, B.M.; MONROE, C.; SMITH, D.G.. Repeat silica extraction: a simple technique for the removal of PCR inhibitors from DNA extracts. **Journal of Archaeological Science**, v. 33, n. 12, p. 1680-1689, 2006.
- KNIGHT, R. *et al.* Best practices for analysing microbiomes. **Nature Reviews Microbiology**, 2018.
- KOZICH, J.J. *et al.* Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 17, p. 5112-5120, 2013.
- KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins & Cotran Patologia-Bases Patológicas das Doenças**, 9a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.
- LUNDBERG, D.S. *et al.* Practical innovations for high-throughput amplicon sequencing. **Nature Methods**, v. 10, n. 10, p. 999, 2013.
- MAXAM, A.M.; GILBERT, W. A new method for sequencing DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 2, p. 560-564, 1977.
- MCINERNEY, P.; ADAMS, P.; HADI, M.Z. Error rate comparison during polymerase chain reaction by DNA polymerase. **Molecular Biology International**, v. 2014, 2014.
- MURRAY, P.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiología Médica**, 6a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.
- OLIVEIRA, P.N.M.A. Avaliação de protocolos de extração de DNA que sejam eficazes para orquídeas. Tese de conclusão de curso. **Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro**. 2015.
- PALM, N.W.; DE ZOETE, M.R.; FLAVELL, R.A. Immune–microbiota interactions in health and disease. **Clinical Immunology**, v. 159, n. 2, p. 122-127, 2015.
- PAREEK, C.S.; SMOCZYNSKI, R.; TRETYN, A. Sequencing technologies and genome sequencing. **Journal of Applied Genetics**, v. 52, n. 4, p. 413-435, 2011.
- PASCALE, A. *et al.* Microbiota and metabolic diseases. **Endocrine**, p. 1-15, 2018.
- PROMEGA. **ProNex® Size-Selective Purification System: NG2001**. Disponível em <<https://www.promega.com.br/products/sequencing/next-gen-sequencing-workflow/library->

preparation/pronex-size-selective-purification-system/?catNum=NG2001>. Acessado em 03/10/2018.

- RAPPÉ, M.S.; GIOVANNONI, S.J. The uncultured microbial majority. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 369-394, 2003.
- SAIKI, R.K. *et al.* Oligonucleotídeo-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, n. 4839, p. 487-491, 1988.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.
- SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Status of the microbial census. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n. 4, p. 686-691, 2004.
- SCHRADER, C. *et al.* PCR inhibitors—occurrence, properties and removal. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 5, p. 1014-1026, 2012.
- SEED, P.C. The human mycobiome. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 5, p. a019810, 2015.
- SHAFIQUE, S. **Polymerase Chain Reaction**. Ed. 1. Lambert Academic Publishing, 2012
- SINHA, R. *et al.* Assessment of variation in microbial community amplicon sequencing by the Microbiome Quality Control (MBQC) project consortium. **Nature Biotechnology**, v. 35, n. 11, p. 1077, 2017.
- THERMOFISHER SCIENTIFIC. **PCR Education**. S/D. Disponível em <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education.html>>. Acessado em 02/11/2018.
- THOMAS, V.; CLARK, J.; DORÉ, J. Fecal microbiota analysis: an overview of sample collection methods and sequencing strategies. **Future Microbiology**, v. 10, n. 9, p. 1485-1504, 2015.
- TILG, H.; MOSCHEN, A.R. Microbiota and diabetes: an evolving relationship. **Gut**, v. 63, n. 9, p. 1513-1521, 2014.

- VANDEVENTER, P.E. *et al.* DNA adsorption to and elution from silica surfaces: influence of amino acid buffers. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, n. 37, p. 10742-10749, 2013.
- VAN PELT-VERKUIL, E.; VAN BELKUM, A.; HAYS, J.P. A Brief Comparison Between In Vivo DNA Replication and In Vitro PCR Amplification. **Principles and Technical Aspects of PCR Amplification**, p. 9-15, 2008.
- VERMA, S.K.; SINGH, H.; SHARMA, P.C. An improved method suitable for isolation of high-quality metagenomic DNA from diverse soils. **3 Biotech**, v. 7, n. 3, p. 171, 2017.
- WATSON, J.D. *et al.* **Biologia Molecular do Gene**. Artmed Editora, 2015.
- ZHANG, B-W. *et al.* A widely applicable protocol for DNA isolation from fecal samples. **Biochemical Genetics**, v. 44, n. 11-12, p. 494, 2006.
- ZHANG, Y.; LUN, C-Y.; TSUI, S. K-W. Metagenomics: a new way to illustrate the crosstalk between infectious diseases and host microbiome. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 11, p. 26263-26279, 2015.
- ZHOU, J.; BRUNS, M.A.; TIEDJE, J.M. DNA recovery from soils of diverse composition. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 316-322, 1996.
- ZOETENDAL, E.G. *et al.* Isolation of DNA from bacterial samples of the human gastrointestinal tract. **Nature Protocols**, v. 1, n. 2, p. 870, 2006.