



JORNADAS *departamento* QUÍMICA 2018

LIVRO DE RESUMOS

10 de Abril de 2018

Colégio Luís António Verney – Universidade de Évora

ST8. Micro-ondas: um método de fixação de leveduras rápido e eficiente para análise através de RNA-FISH

Marina González-Pérez ⁽¹⁾, Ricardo Vieira ⁽¹⁾, António Pereira ^(1,2), António Candeias ^(1,2), Ana Teresa Caldeira ^(1,2)

(1) Laboratório HERCULES, Universidade de Évora (marinagp@uevora.pt)

(2) Departamento de Química da Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora

A Hibridação *In Situ* Fluorescente (FISH) é uma técnica com um elevado potencial para analisar células de microrganismos que se encontram em comunidades microbianas em matrizes complexas [1]. Esta técnica tem sido muito utilizada em análise e monitorização microbiológica e os protocolos habitualmente incluem a fixação das células [2], que é um dos passos mais importantes e morosos. Torna-se assim importante encurtar os protocolos existentes.

O objetivo deste trabalho foi investigar a implementação de um método de fixação rápido e eficiente compatível com a aplicação da técnica RNA-FISH que, preservando as células e mantendo as suas características, permita: i) a sua análise através de microscopia de epifluorescência e citometria de fluxo; e ii) melhore os resultados obtidos na técnica FISH. A fixação celular diretamente com micro-ondas ou assistida por elas tem demonstrado preservar a morfologia das células e o conteúdo celular [3]. Por isso, neste trabalho, foram estudados e comparados os efeitos da utilização de dez métodos de fixação (químicos, baseados na fixação com micro-ondas, assistidos por micro-ondas ou combinados) nos resultados dos ensaios FISH realizados em células de leveduras. Os métodos utilizados foram comparados considerando o tempo de fixação requerido e os resultados obtidos após a aplicação da técnica FISH, através de microscopia e citometria de fluxo.

Os resultados revelaram que a fixação diretamente com micro-ondas é a alternativa mais eficaz para analisar células de leveduras através de RNA-FISH em suspensão, obtendo células com elevada intensidade de fluorescência sem necessidade de utilizar fixantes químicos e reduzindo o tempo de fixação a 30s. No entanto, para amostras contendo um reduzido número de células, foi concluído que o método de fixação combinada (fixação química com etanol seguida de fixação assistida por micro-ondas) é a melhor alternativa, apesar de ser mais demorado (71 min). Estes resultados poderão vir a contribuir para a otimização dos protocolos RNA-FISH aplicados na análise e monitorização de células de leveduras em diferentes áreas.

Agradecimentos: Este trabalho foi co-financiado pela FCT através dos projetos MICROTECH-ART e as bolsas SFRH/BD/118028/2016 e SFRH/BPD/100754/2014 e pela União Europeia através dos fundos de Desenvolvimento Regional Europeios ALENTEJO 2020, projeto MEDUSA- ALT20-03-0145-FEDER-000015.

[1] Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H. (1995). *Microbiol. Rev.*, 59, 143–169.

[2] Yilmaz S., Haroon M.F., Rabkin B.A., Tyson G.W., Hugenholtz P. (2010). *ISME J.*, 4, 1352–1356.

[3] May E., Jones M., Mitchell J., May E., Jones M., Mitchell J. (2008) *Royal Society of Chemistry, Cambridge.*