

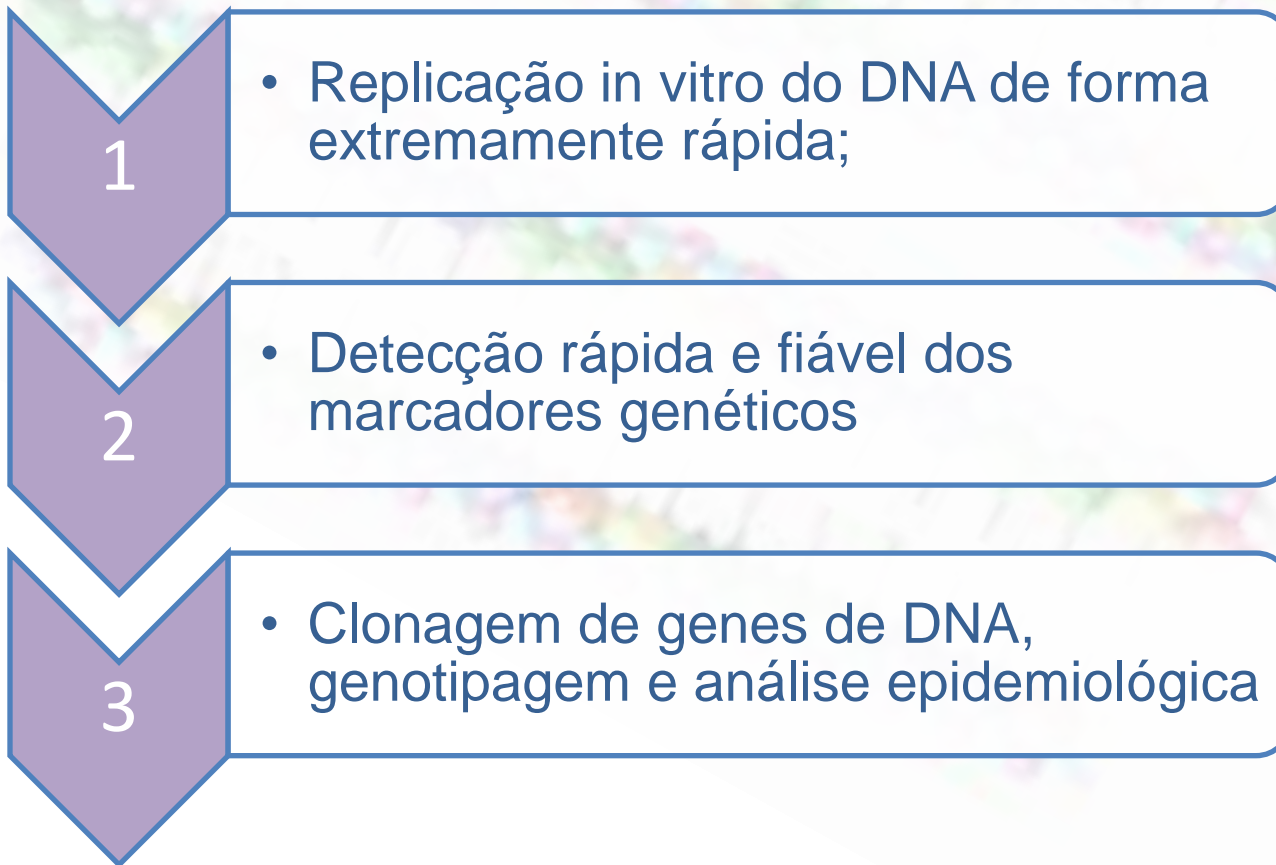


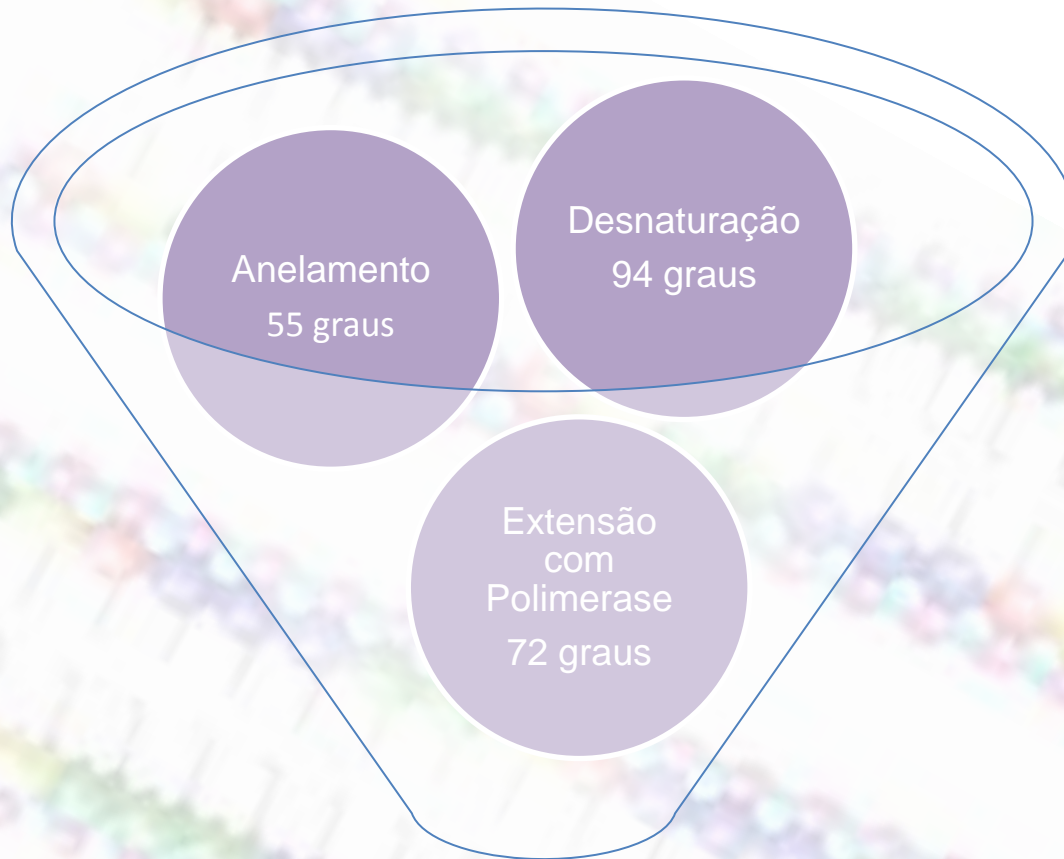
# Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) e Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

Fernanda Kegles  
Jéssica Waldman  
Nathalia Stark Pedra

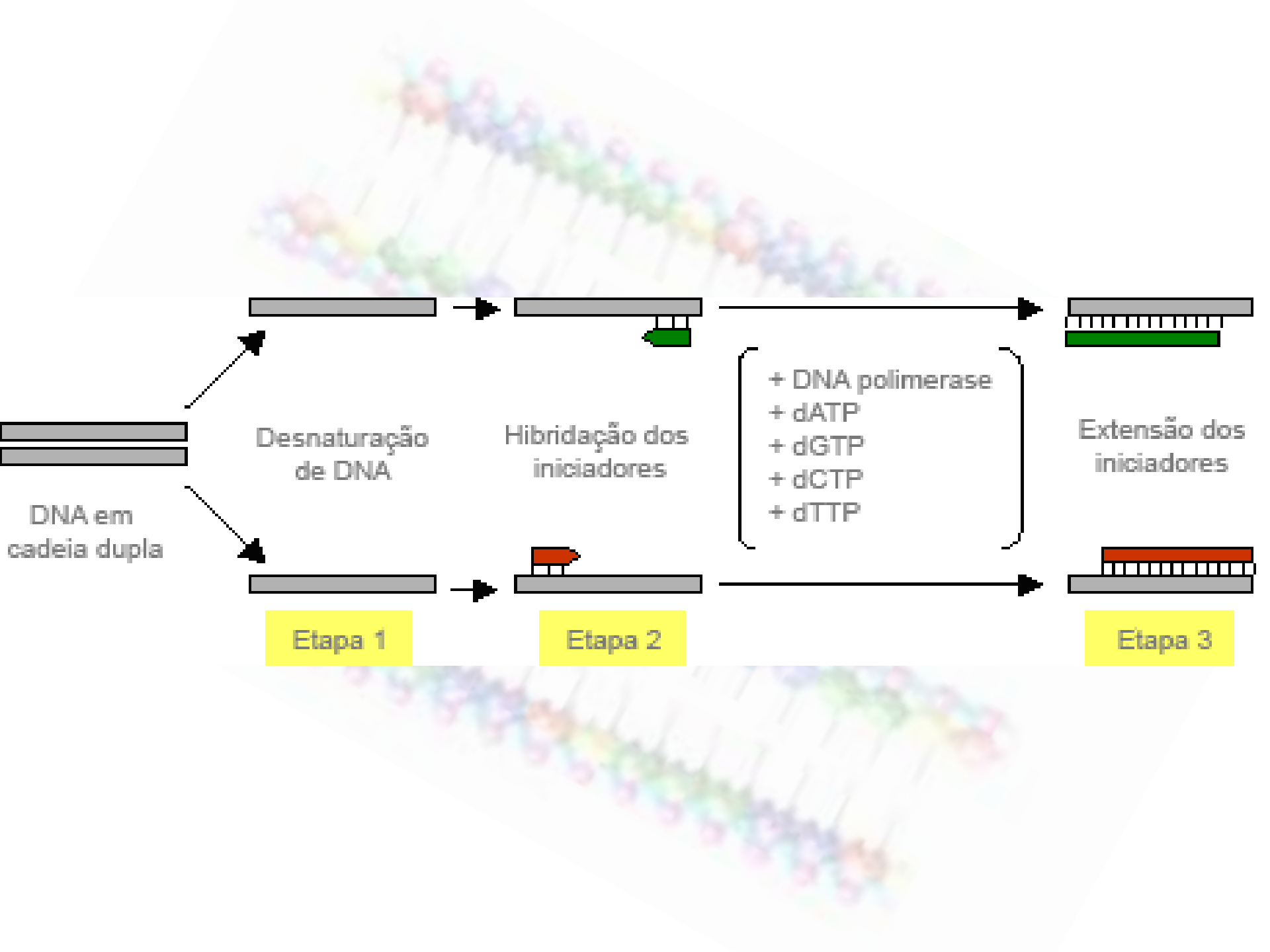
# Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

- Ampliação de sequências de DNA;
- A PCR permite:





# Ciclo da PCR



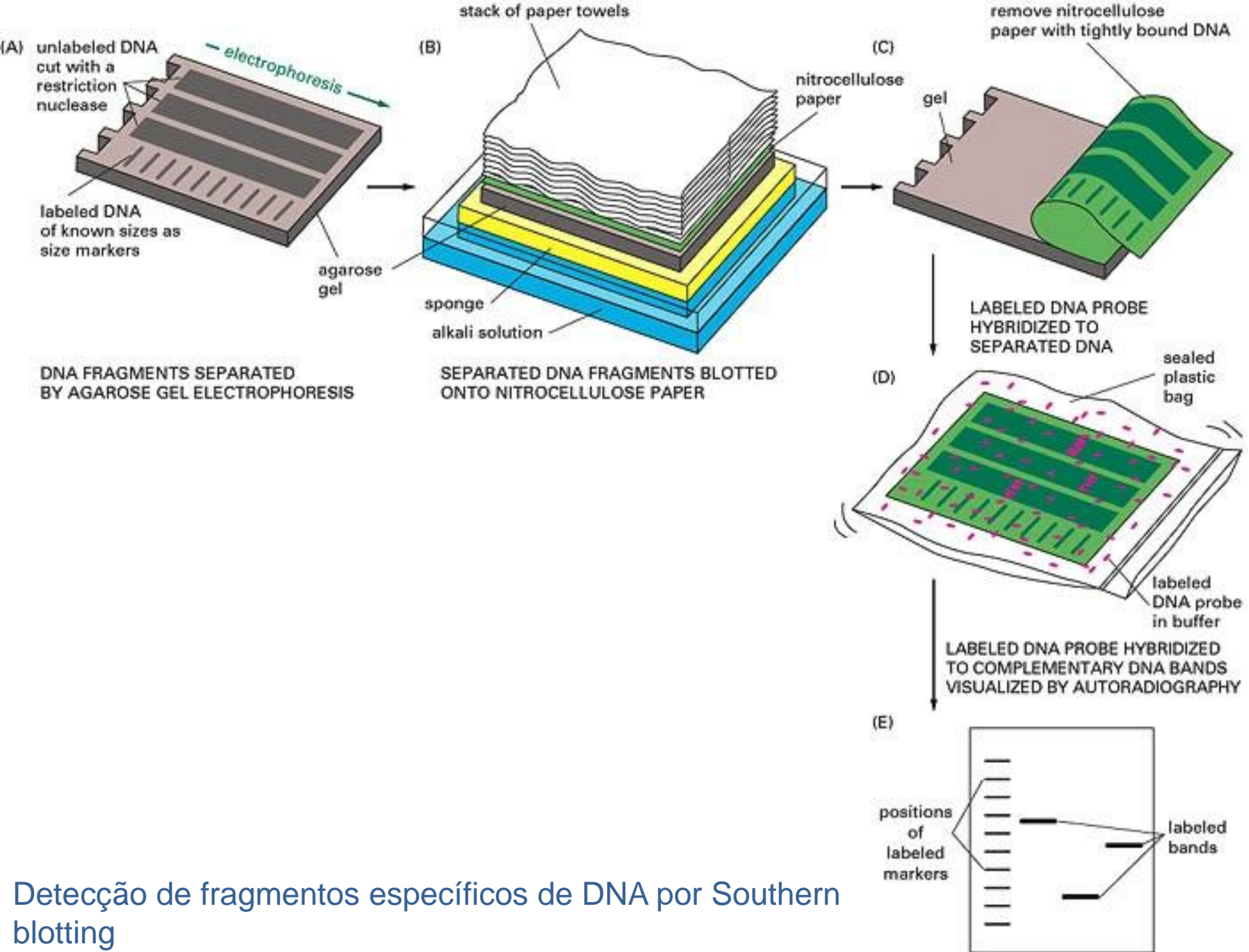


RFLP

# RFLP



- Sequência de DNA que possui um sítio de restrição em cada extremidade com um alvo;
- Sequência alvo liga-se a uma sonda a fim de detectar-se um marcador;
- Fragmentos de DNA separados por tamanho;
- Transferência dos fragmentos (Southern Blot)



Detecção de fragmentos específicos de DNA por Southern blotting

# Enzimas de restrição



- Endonucleases capazes de cortar a dupla hélice de DNA em locais específicos;
- As enzimas são isoladas dos microorganismos que usam as tesouras moleculares para se defender contra invasão de DNA exógeno;





# Palindrômicas

- Sequências habitualmente reconhecidas;
- Sucessão de nucleotídeos idênticos no filamento com sentido 5' 3' e no filamento anti-sentido;

# Técnica

DNA  
Plasmídico

- Análise de uma parte do DNA  
(Terapia gênica)

DNA  
Cromossômico

- Análise de todo o DNA
- Difícil de ser analisado por eletroforese

# Identification of a criminal by DNA typing in a rape case in Rio de Janeiro, Brazil

*DNA Diagnostic Laboratory, Instituto de Biologia, Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil*

- Andrea Carla de Souza Goes
- Dayse Aparecida da Silva
- Cristiane Santana Domingues
- João Marreiro Sobrinho
- Elizeu Fagundes de Carvalho

Original Article

## INTRODUCTION

Since 1985, DNA has been shown to be a powerful tool in paternity cases, as well as for criminal investigation.<sup>1</sup> This is accomplished by extracting DNA from any biological material, such as blood, saliva, skin, muscle, hair, sperm, teeth, bone, etc.<sup>2,3,4</sup> Afterwards, comparison of individuals typed at polymorphic DNA regions can be done as "in tandem" repeated sequences. This kind of comparison can be achieved because one component of each of the 23 pairs of chromosomes characteristic of the human being is inherited from the biological father and the other from the biological mother. In the light of this, human identification can be

collected from the environment. On the other hand, STR (short tandem repeats) analysis is a simple methodology that works even with poor and degraded DNA. As a disadvantage, it is known that a STR *locus* is not as polymorphic as a VNTR one.<sup>6</sup>

In this report, we describe the usefulness of both methodologies for typing samples collected from a four-month-old fetus conceived in a rape case. The victim, a 14-year-old girl with a genetic disorder (Down's Syndrome), was raped in Rio de Janeiro, Brazil, in 1998. The crime was only notified some months later when the pregnancy became evident, and therefore DNA sperm typing was not carried out to identify the rapist from among the suspects. The victim had

## ABSTRACT

**CONTEXT:** Human DNA identification is a powerful tool for paternity cases as well as for criminal investigation, in which biological evidence is typed after collection from crime scenes and for the identification of human remains.

**OBJECTIVE:** Identification of a criminal in a rape case with 4 suspects using STR and VNTR DNA analysis.

**TYPE OF STUDY:** Forensic DNA analysis.

**SETTING:** DNA Diagnostic Laboratory, Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Brazil.

**PARTICIPANTS:** Blood from 4 suspects and the victim, and skin from the fetus.

**PROCEDURES:** Polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP)

**RESULTS:** Three of the suspects were excluded and one of them was identified as the biological father of the fetus after typing with CTT and FFV

# DIVERSIDADE GENÉTICA DE FUNGOS POR PCR-RFLP EM SUBSTRATOS INOCULADOS COM SOLO DE FLORESTAS DE ARAUCÁRIA

Ezio Nalin de Paulo<sup>1</sup>, Camila Maistro Patreze<sup>1</sup>, Elke J. B. N. Cardoso<sup>2</sup>, Siu Mui Tsai<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Av. Centenário – 303, Piracicaba – SP  
CEP. 13416-000. Email: [enalin@cena.usp.br](mailto:enalin@cena.usp.br);

<sup>2</sup> Departamento de Solos e Nutrição Mineral de Plantas, ESALQ, Universidade de São Paulo

*Araucaria angustifolia*, micorriza, inoculação

## Introdução

A *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze ocorre em florestas ombrófilas de elevada altitude no Brasil e na Argentina. Esta espécie é classificada como vulnerável na lista de espécies ameaçadas de extinção da IUCN (Hilton-Taylor, 2000), em decorrência da exploração madeireira, de seu valor ornamental e alimentar.

A araucaria estabelece associações simbióticas com fungos micorrízicos arbusculares (FMA). A habilidade das plantas em absorver nutrientes e água do solo, e a proteção contra patógenos é fortemente influenciada por essas associações (Zandavalli et al., 2004; Duchesne, 1994). O sucesso desta associação em mudas produzidas em viveiros depende, principalmente da inoculação do substrato, que pode ser feita usando-se solo contendo propágulos de fungos micorrízicos (esporos, hifas, fragmentos de raízes colonizadas) ou somente esporos previamente isolados.

Técnicas moleculares apresentam grande potencial para estudos de identificação e de diversidade de fungos micorrízicos, sem os problemas de variações nos caracteres morfológicos que dificultam a taxonomia tradicional. A maioria delas baseia-se na análise da região dos genes ribossomais (18S, 5.8S e 28S) e internas (ITS1 e ITS4). A técnica **PCR-RFLP** consiste na amplificação da região do rDNA seguida da restrição dos fragmentos amplificados com enzimas de restrição e sua análise eletroforética.

# Subdivisões das sondas

## SLP

- Detecção de um único segmento de DNA repetitivo;

## MLP

(Finger print)

- Detecção de vários segmentos de DNA repetitivo;

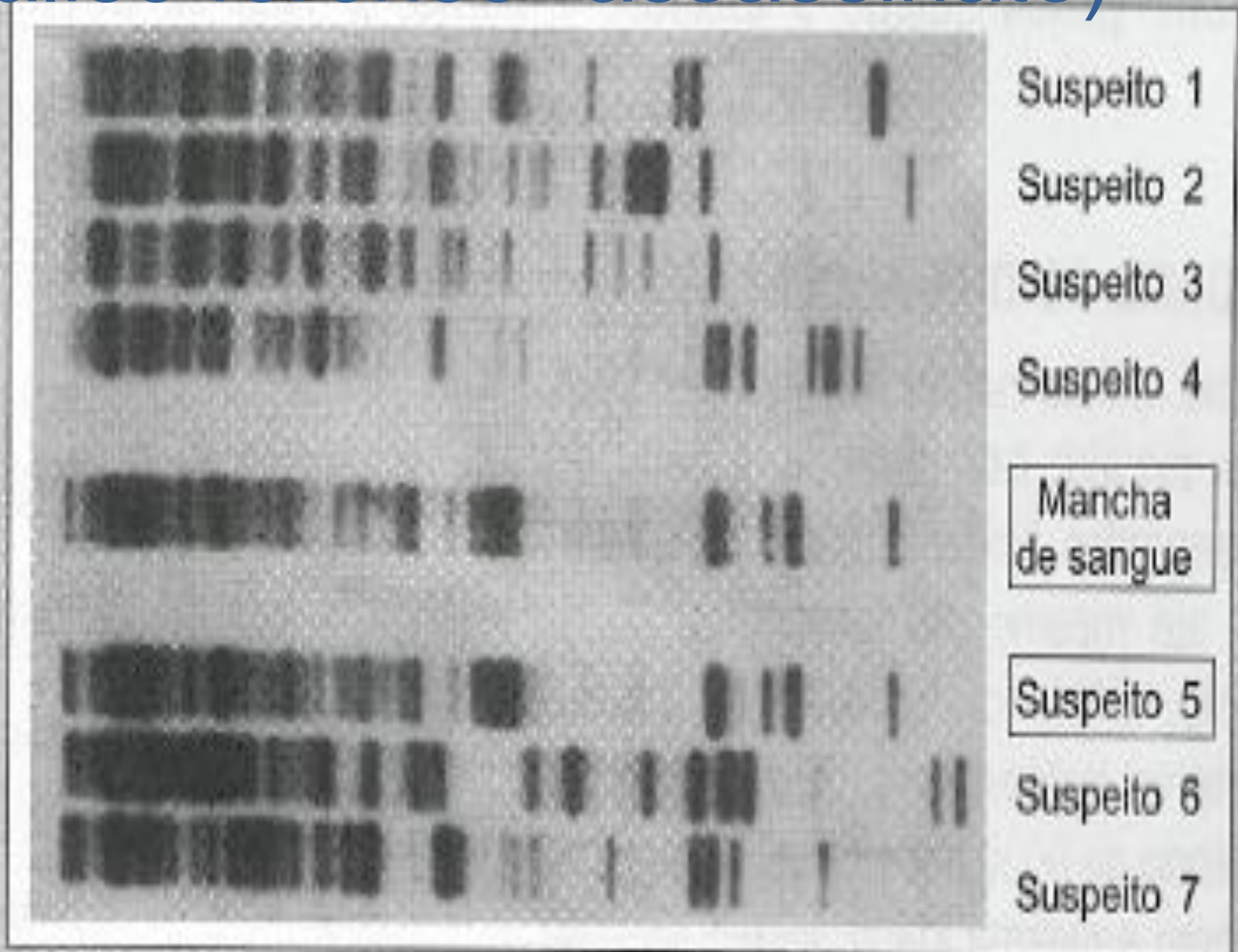
# Single-locus probe (Análise forense- estupro)

Resultado de sonda  
de locus-único



# Multi-locus probe (Análise forense- assassinato)

Resultado de  
sonda multi-locus



## RFLP

### Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição:

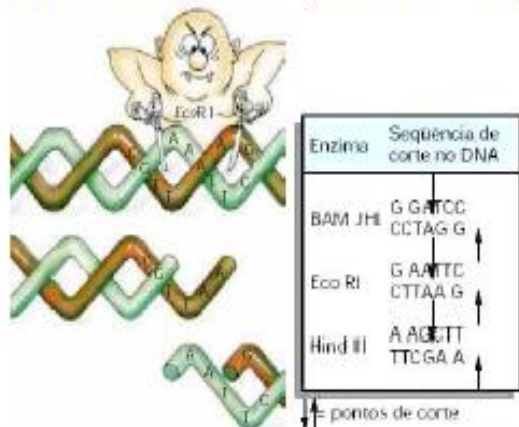
1) Coleta de amostras biológicas que podem ser saliva, sangue, espermatozoides e cabelo, entre outros.



2) Extração e purificação do DNA.



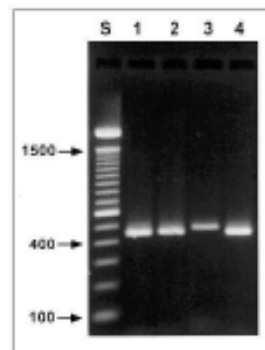
3) Corte com enzimas de restrição (tesouras moleculares que reconhecem e cortam seqüências específicas do DNA).



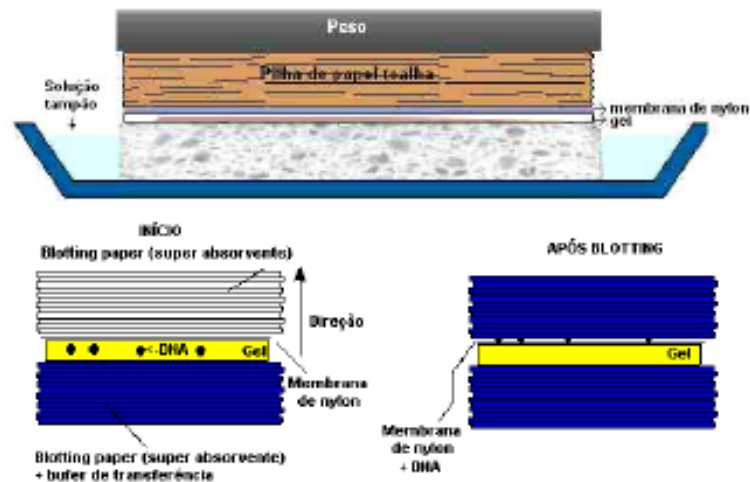
4) Eletroforese: onde, através de uma corrente elétrica, são separados os fragmentos de DNA por tamanho. A partir daí, é formada uma espécie de código de barras que é a identificação individual e intransferível de cada indivíduo.



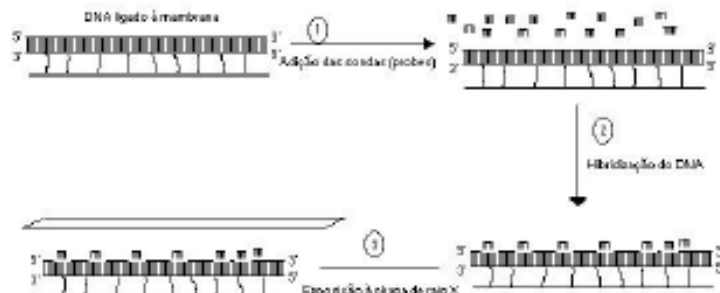
## VISUALIZAÇÃO DO DNA



5) Transferência para membrana de nylon (*southern blotting*).



6) Uso de sondas: pequenos segmentos de DNA radioativados, cuja seqüência de bases é conhecida. Acoplam-se às seqüências de DNA das quais são complementares, ligando-se às mesmas.





1 2 3 4 5 6 7 8 9

A1 →

A2 →



# Aplicações



- Teste de paternidade;
- Mapeamento de genoma;
- Genotipagem;
- Análise de polimorfismo;
- Diagnóstico de doenças hereditárias;
- Ciência forense;

## Vantagens:

- Reprodutível;
- Marcadores co-dominantes (heterozigoto e homozigoto)
- Simples;

## Desvantagens:



- Caro;
- Lento;
- Trabalhoso;
- Uso de sondas radioativas;

**Braz J Med Biol Res vol.43 no.7 Ribeirão Preto July 2010 Epub June 11, 2010**

<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2010007500055>

Braz J Med Biol Res, July 2010, Volume 43(7) 694-696

## Human papillomavirus detection and p16 methylation pattern in a case of esophageal papilloma

L.A. Afonso, N. Moysés and   S.M.B. Cavalcanti

Laboratório de Diagnóstico Viroológico, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto Biomédico, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil

[Abstract](#)

[Text](#)








[References](#)

[Acknowledgments](#)

[Correspondence and Footnotes](#)

### Services on Demand

Article

-  pdf in English
-  Article in xml format
-  Article references
-  How to cite this article
-  Curriculum ScienTI
-  Automatic translation
-  Send this article by e-mail

Indicators

Related links

Bookmark

 More

 Permalink

### Abstract

Esophageal cancer is a prevalent cancer worldwide. Some studies have reported the possible etiology of human papillomavirus (HPV) in benign and malignant papillomas of the esophagus but the conclusions are controversial. In the present study, we investigated an esophageal papilloma from a 30-year-old male patient presenting aphasia. HPV DNA was detected by generic PCR using MY09/11 primers, and restriction fragment length polymorphism revealed the presence of HPV54, usually associated with benign genital lesions. Hypermethylation of the p16<sup>INK4A</sup> gene was also investigated due to its relation to malignant transformation, but no modification was detected in the host gene. Except for an incipient reflux, no risk factors such as cigarette smoking, alcohol abuse or an infected sexual partner were recorded. Since esophageal lesions may have a malignant potential, HPV detection and typing are useful tools for patient follow-up.



**AFLP**

# AFLP

- RFLP+PCR+PRIMERS ARBITRÁRIOS;
- Técnica utilizada para detecção de polimorfismos;
- Etapas:

Amplificação via PCR de fragmentos gerados a partir da digestão do DNA com combinações de enzimas de restrição de corte raro e frequente;

Ligação dos adaptadores (ligases);

Pré amplificação

Amplificação final (eletroforese);

Análise em gel de poliacrilamida;

# Enzimas de restrição- Corte Raro e Frequente

## Enzimas de restrição- Corte Raro

- Cliva de 6 a 8 pares de bases;
- Fragmentos grandes;

## Enzimas de restrição- Corte Frequente

- Cliva até 4 pares de bases;
- Fragmentos pequenos;

---

OBS: Fragmentos intermediários- combinação das duas enzimas

*EcoRI* - corte raro (6 a 8 pares de bases)

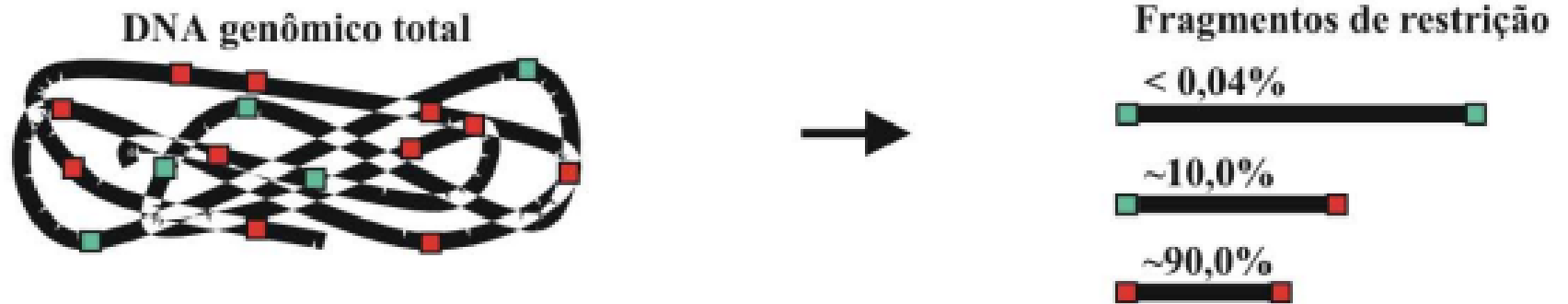


*MseI* - corte frecuente (4 pares de bases)





(A) Dupla digestão com enzimas de restrição *EcoRI* e *MseI*



# ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA POR AFLP E IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA A DOENÇAS EM VIDEIRA<sup>1</sup>

PAULO RICARDO DIAS DE OLIVEIRA<sup>2</sup>, DANIELLE CAMARGO SCOTTON<sup>3</sup>, DEBORAH SANAE NISHIMURA<sup>3</sup>, ANTONIO FIGUEIRA<sup>4</sup>

**RESUMO** - Com objetivo de estudar diversidade genética e identificar marcadores associados à resistência ao mildio (*Plasmopara viticola*) e ao oídio (*Uncinula necator*), foram analisadas as cultivares de videira A 1976, CG 87746, CNPUV 154-27, Crimson Seedless, Gota de Ouro, Itália, Seyve Villard 12327 e Seyve Villard 12375. As análises de polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP) seguiram as etapas de digestão, ligação, pré-amplificação e amplificação. Efetuou-se a separação dos fragmentos amplificados em gel de 7% de poliacrilamida desnaturante (uréia 7M) e coloração com nitrato de prata. A similaridade foi estimada com base no coeficiente de Jaccard, e a agregação, por UPGMA. Foi gerada uma matriz de similaridade com bom ajustamento da agregação ( $r = 0,84$ ). Os agrupamentos obtidos corresponderam à origem e classificação botânica das cultivares. Foram identificadas 15 marcas dissimilares associadas à resistência, sendo oito para mildio e sete para oídio.

**Termos para indexação:** videira, marcadores AFLP, resistência a doenças, mildio, oídio.

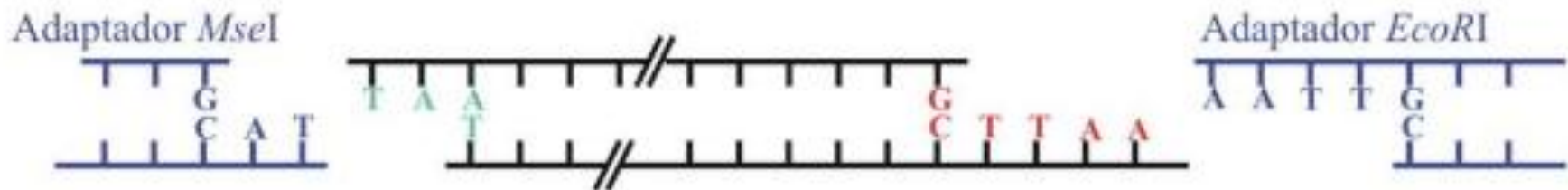
## GENETIC DIVERSITY AND IDENTIFICATION OF AFLP MARKERS ASSOCIATED WITH DISEASES RESISTANCE IN GRAPEVINE

**ABSTRACT** - The grapevine cultivars A 1976, CG 87746, CNPUV 154-27, Crimson Seedless, Gota de Ouro, Itália, Seyve Villard 12327 and Seyve Villard 12375 were analyzed to establish the genetic relationship and to identify markers associated with resistance to downy mildew (*Plasmopara viticola*) and powdery mildew (*Uncinula necator*). The amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis comprise the steps of digestion, ligation, preamplification and amplification. The amplified fragments were separated on a 7% denaturing polyacrylamide gel (7M urea) and silver stained. The similarity was estimated using Jaccard's coefficient and the clustering was estimated by UPGMA. A similarity matrix was generated with a good fit for aggregation ( $r = 0,84$ ). The clusters corresponded to origin and botany classification of the cultivars. Fifteen markers were associated with resistance, eight for downy mildew and seven for powdery mildew.

# Adaptadores

- Adaptadores com terminais complementares as extremidades resultantes da clivagem pela enzima de restrição;

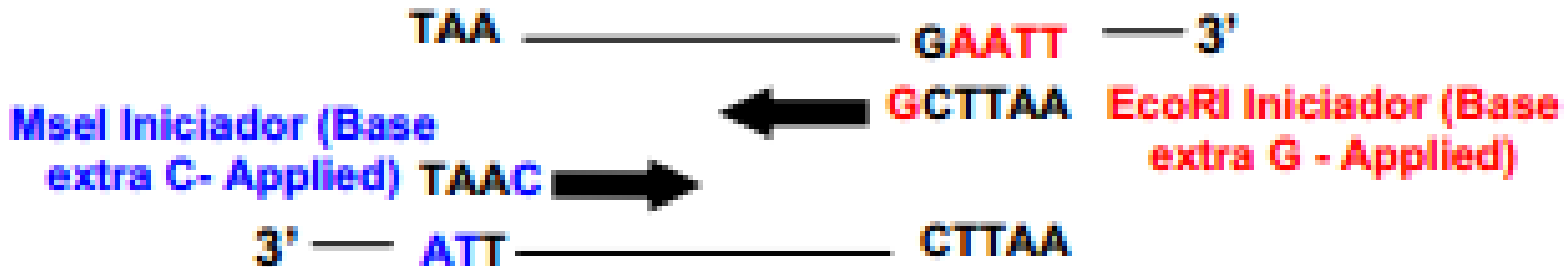
## (B) Ligação dos adaptadores específicos dos sítios de restrição



# Seleção de fragmentos a serem amplificados

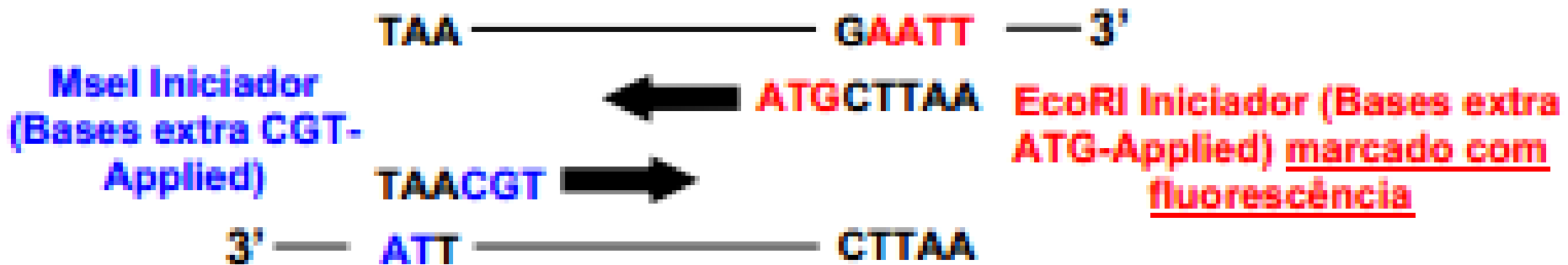
## Pré Amplificação

### Amplificação Pré-seletiva



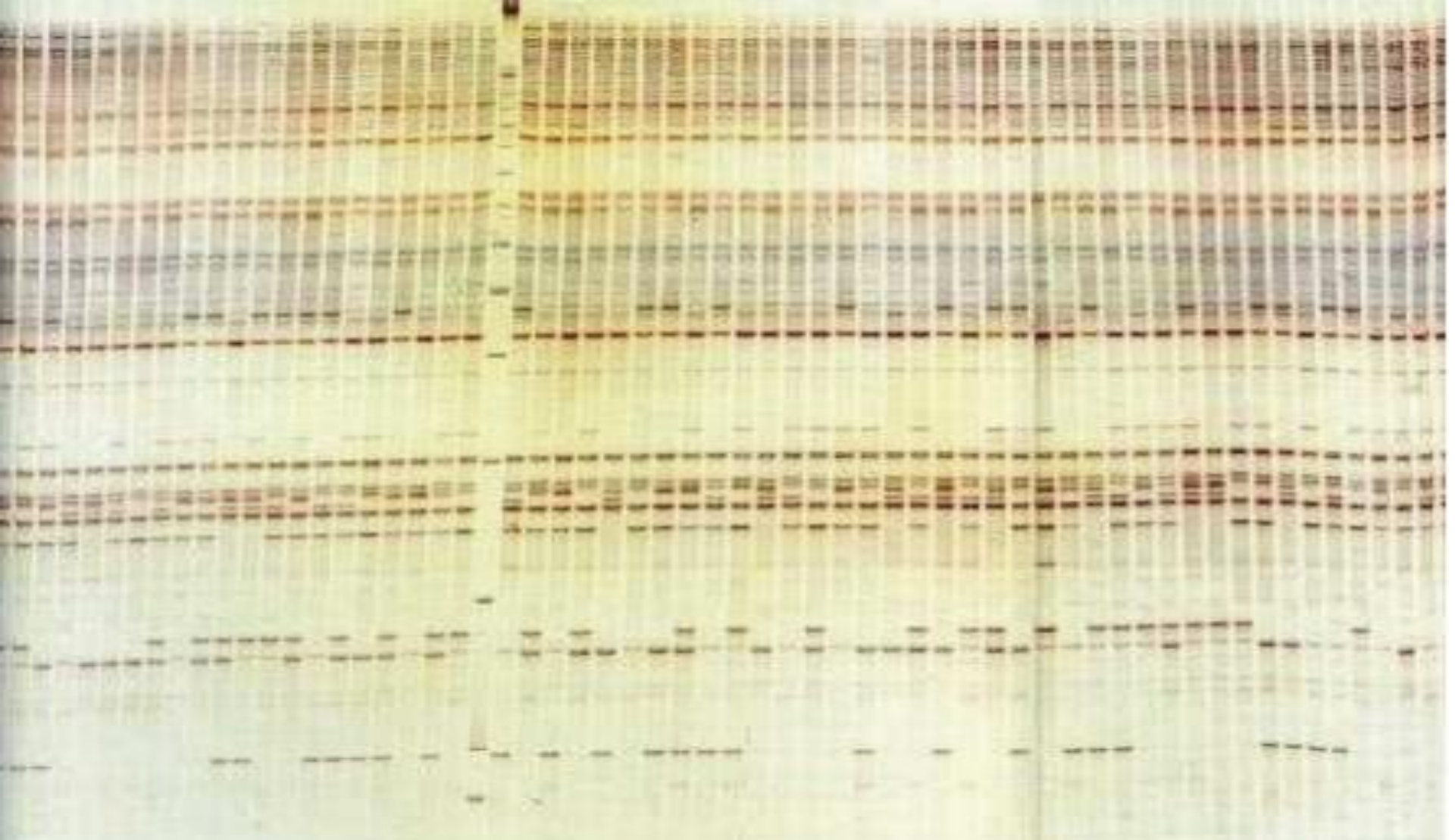
- Amplificação

### Amplificação Seletiva



# Análise em gel de Poliacrilamida

- Fragmentos selecionados podem ser separados e verificados em gel de poliacrilamida com marcação radioativa ou em um sequenciador automático de DNA, através de marcação por fluorescência;



Gel de AFLP em poliacrilamida corado com nitrato de prata, mostrando o perfil de uma população de maracujá amarelo gerado pelas enzimas PstI e MseI

## Vantagens:

- Sensível, rápido e simples;
- Não é necessário o conhecimento prévio da informação de sequências-alvo;
- Grande poder de detecção de variabilidade genética;

## Desvantagens:

- Marcador dominante;
- O DNA deve ser altamente puro;
- Baixo conteúdo de informação genética por locu;



# Aplicações



- Genética forense;
- Diagnóstico de doenças hereditárias;
- Construção de mapas genéticos;
- Teste de paternidade;

# Diferenças entre RFLP e AFLP

## RFLP

- Gel de agarose;
- Co-dominante;
- Elevado grau de caracterização do genoma alvo;

## AFLP

- Gel de poliacrilamida;
- Dominante;
- Não é necessário alto grau de caracterização do genoma alvo;

AFLP

## Variabilidade genética intrapopulacional em *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. por marcador AFLP

### Intrapopulational genetic variability of *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. per AFLP marker

Miguel Luiz Menezes Freitas  
Ana Paula de Andrade Aukar  
Alexandre Magno Sebbenn  
Mario Luiz Teixeira de Moraes  
Eliana Gertrudes Macedo Lemos

---

**RESUMO:** Estimaram-se os níveis de variabilidade genética em uma população de *Myracrodruon urundeuva*, para a conservação genética *in situ* e *ex situ*, utilizando-se da técnica da PCR (reação de polimerase em cadeia) com o marcador genético AFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados). As sementes para os testes de progênie foram coletadas em 30 árvores (matrizes) de polinização livre na Estação Ecológica de Paulo de Faria – SP. A partir deste material genético, foram instalados três testes de progênie na Fazenda de Ensino e Pesquisa da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – UNESP, localizada em Selviria – MS. A análise por marcador genético foi realizada por três diferentes combinações de iniciadores EcoRI-MseI, resultando num total de 137 bandas polimórficas, formando uma tabela de dados binários. Esses dados foram utilizados para análise da divergência genética e distância entre progênie. Foram detectados altos níveis de divergência genética entre progênie, sendo que 16,2% da variabilidade genética encontrava-se entre progênie e 83,8%, dentro de progênie, indicando desvios de cruzamentos aleatórios. O agrupamento das progênie, a partir das distâncias genéticas, sugere que progênie derivadas de árvores próximas tendem a ser mais similar entre si. Isto mostra a possibilidade da população de origem das sementes estar geneticamente estruturada.

## Marcador *f*AFLP na identificação da diversidade genética de mini-roseiras

*Márkilla Zunete Beckmann*<sup>1\*</sup>, *Francisco Joaci de Freitas Luz*<sup>1</sup>, *Kathia Fernandes Lopes Pivetta*<sup>2</sup>

### RESUMO

As variedades comerciais de mini-rosas no Brasil são diferenciadas apenas pela coloração das flores e conhecidas por nomes populares, não se sabendo ao certo qual sua origem. Neste sentido, o trabalho objetivou dar início ao estudo da diversidade genética existente entre mini-roseiras utilizadas em cultivo comercial no Brasil mediante um teste de *primers* pelo marcador *f*AFLP. Foi extraído o DNA de cinco acessos de mini-roseiras (“pink”, vermelha, branca, lilás e rosa claro). Foram amplificadas 216 bandas, sendo 177 bandas polimórficas, com oito pares de primers, sendo que destes, os melhores resultados foram E-ACA/M-CAG, E-ACA/M-CAC e E-ACA/M-CTG, com 36, 45 e 48 bandas polimórficas, respectivamente. A análise de agrupamento mostrou a formação de um único grupo, sendo RB e RRc, os que apresentaram a maior similaridade genética (0,96). Conclui-se a técnica *f*AFLP é eficiente na identificação da variabilidade genética existente entre mini-roseiras, utilizando-se apenas três pares de primers.

# Referências Bibliográficas

- CHAMPE, Pamela C.; HARVEY, Richard A.; FERRIER, Denise R. **Bioquímica Ilustrada** 4. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2009. 519 p.
- KAMOUN, Pierre; LAVOINNE, Alain; DE VERNEUIL, Hubert. **Bioquímica e Biologia Molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 420 p.
- [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-879X2010000700013#Abstract](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2010000700013#Abstract)
- <http://geneticavirtual.webnode.com.br/genetica-virtual-home/topicos-extras/marcadores-moleculares/polimorfismo-no-comprimento-de-fragmentos-de-restri%C3%A7%C3%A3o-rflp/>
- [www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechRFLP.shtml](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechRFLP.shtml)

# OBRIGADA!





Universidade Federal de Pelotas  
Disciplina de Biologia Molecular  
Professora Fabiana Seixas



universidade federal de pelotas  
**CDTec**  
centro de desenvolvimento tecnológico

# AFLP PCR & RFLP PCR

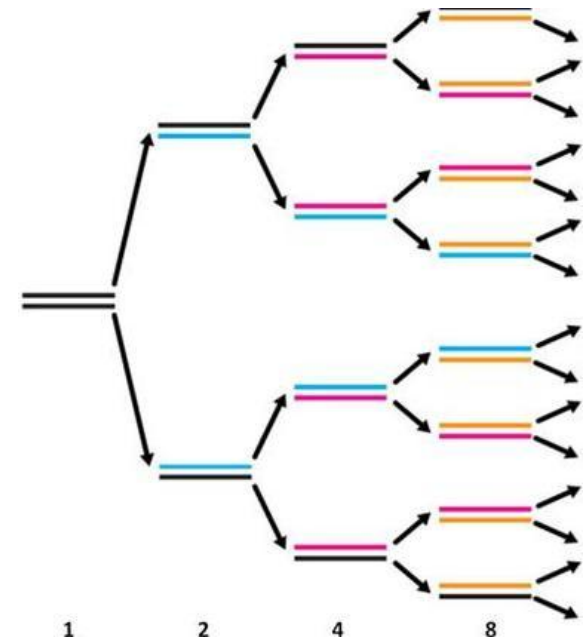
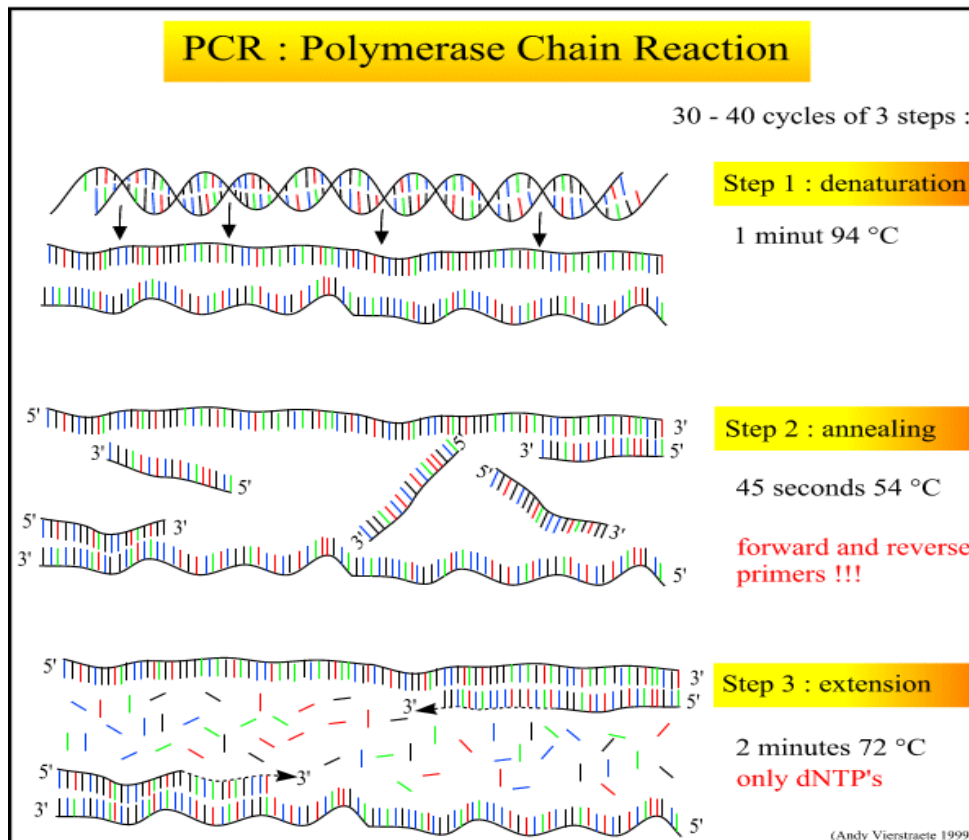
Igor de Avila Barbosa  
Marina Dias da Costa

Pelotas, 12 de Dezembro de 2012



# O que é PCR?

- É uma técnica de Biologia Molecular usada para amplificar pequenas cópias de DNA.



**Amplificação Exponencial**

# Onde é utilizado?

- Medicina Forense
- Detecção de mutações
- Identificação de patógenos
- Paleontologia (Sequenciamento gênico de animais pré-históricos)

# Polimorfismos

- São diferenças na sequência de bases do DNA.
- São responsáveis pela variedade genética e consequentemente a manutenção das espécies.
- Os seres humanos diferem apenas de 0,1% a 0,5% em seu DNA.
- Podem ser responsáveis pela suscetibilidade a doenças complexas, infecções e etc.

# AFLP PCR – Amplified Fragment Length Polymorphism

Técnica utilizada para produzir marcadores moleculares, através da amplificação (PCR) seletiva de fragmentos de restrição de diferentes comprimentos obtidos a partir da digestão (enzimas de restrição pré-definidas) de DNA genômico. Detecta polimorfismos.

# Como surgiu?

Foi criada em 1990 por uma empresa holandesa, a KeyGene.

É um processo que se tornou popular e atualmente é um dos mais utilizados em todo o mundo.

# Como é feita?

- 1- O DNA é cortado com duas enzimas distintas;

Sítio Raro (seis bases): EcoR1

Sítio Frequente (quatro bases): Mse1, Pst1

- 2- São utilizados adaptadores específicos para cada sítio de restrição e são, então, ligados às extremidades dos fragmentos de DNA;

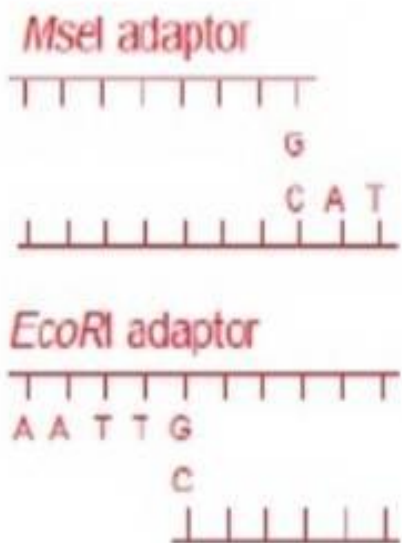
(a) Preparação de AFLP



DNA genômico



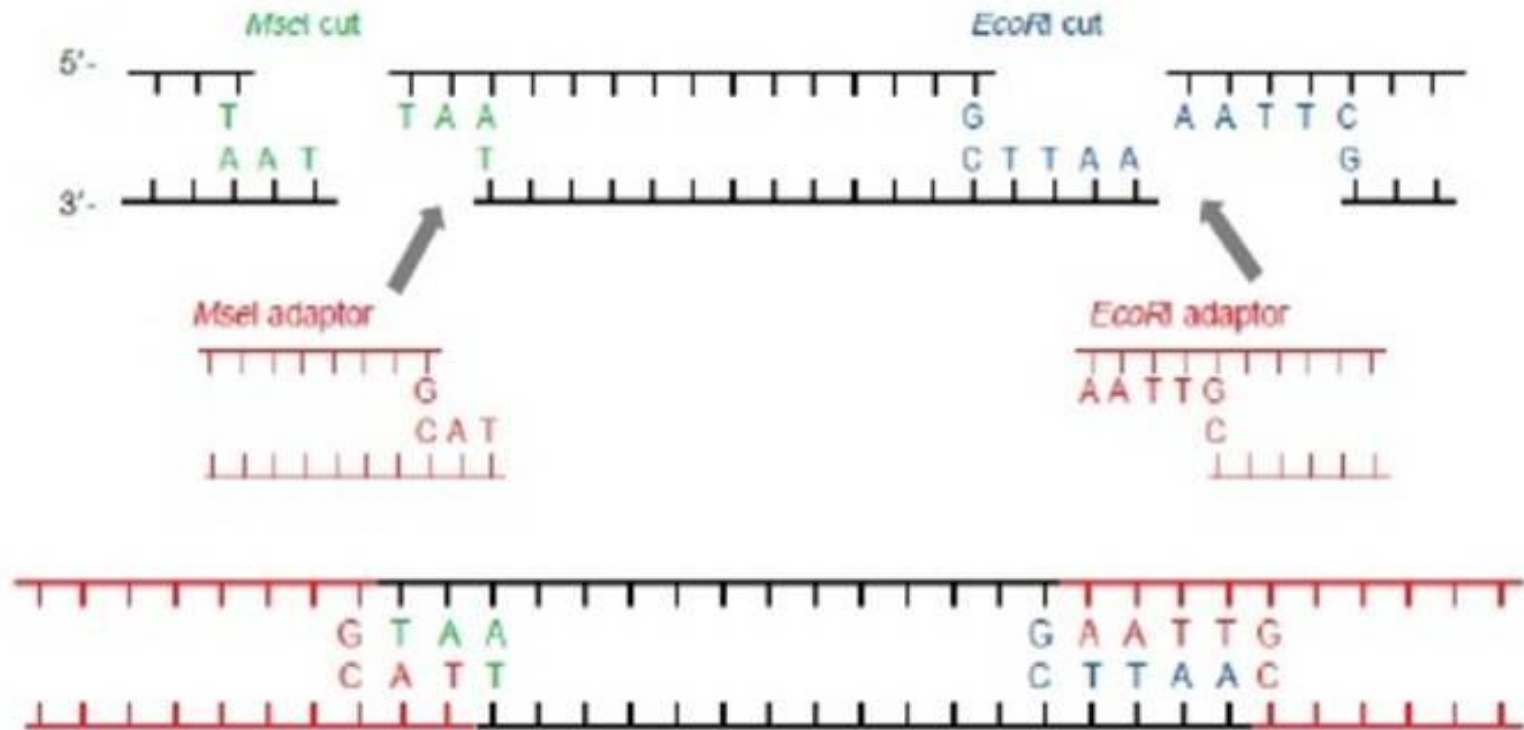
Enzimas de restrição (**EcoR1** e **Mse1**) e DNA ligase



Adaptadores

# Atuação das enzimas

## (b) Restrição e ligação





# Importância de DNA de alta pureza

Um DNA de alto nível de pureza é necessário para garantir a digestão completa pelas enzimas de restrição em todas as amostras, a digestão parcial ou a má qualidade do DNA pode facilmente levar a falsas interpretações de polimorfismos.

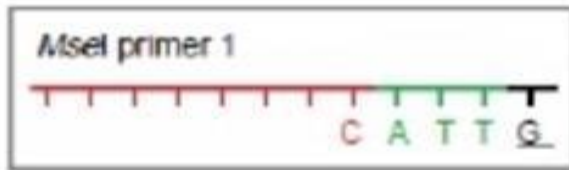
- Enzimas de corte raro: *EcoRI*, *AseI*, *HindIII*, *Apal* e *PstI*
- Enzimas de corte frequente: *MseI* e *TaqI*

# Como é feita?

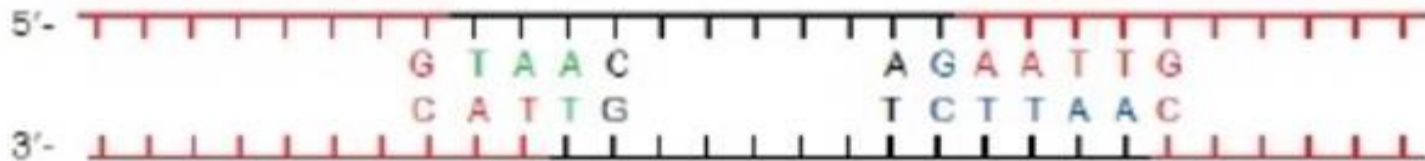
- 3- Os fragmentos de DNA são amplificados (PCR);
  - Pré-amplificação: utilização de primers específicos para cada adaptador
  - Amplificação seletiva: utilização de primers específicos mais sítio de restrição
- 4- Análise do gel em agarose ou poliacrilamida, através de Eletroforese;
- 5- Perfis moleculares são revelados.

# Amplificações

(c) Amplificação seletiva com um nucleotídeo

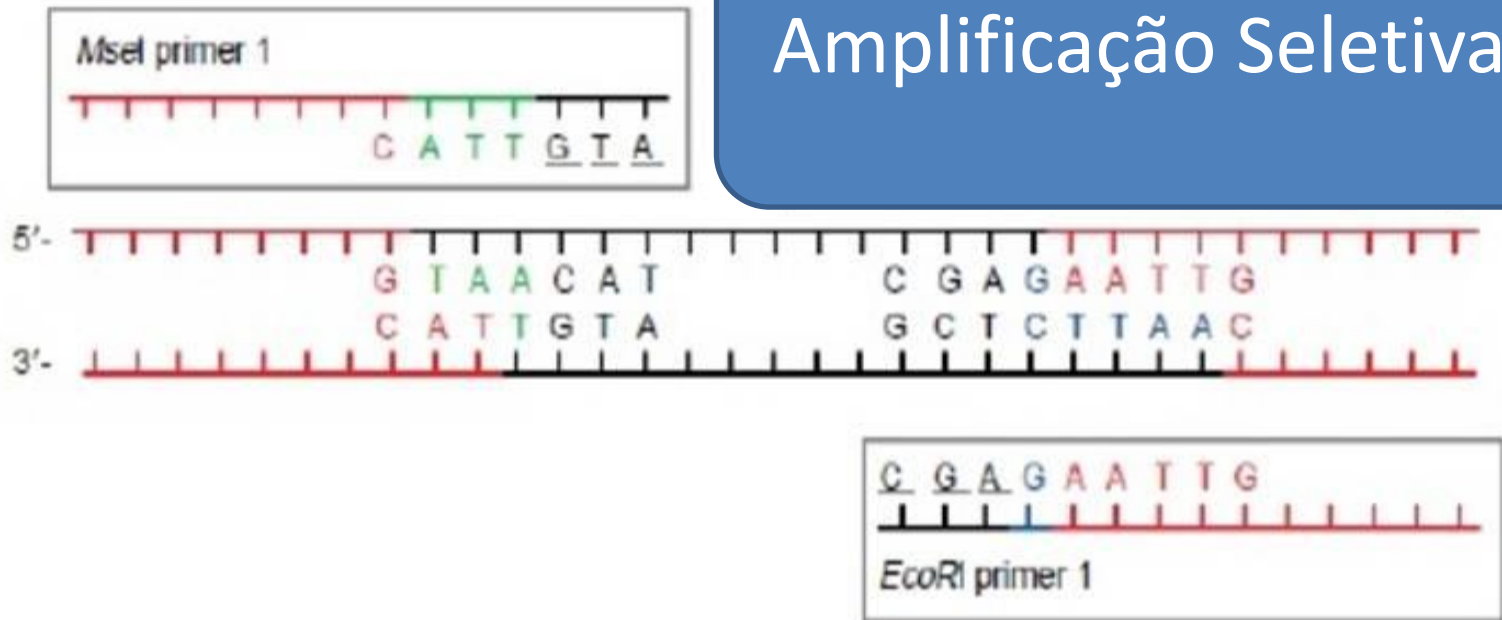


Pré-amplificação



# Amplificações

(c) Amplificação seletiva com três nucleotídeo



# Vantagens

- Realiza amplificação de muitos marcadores ao mesmo tempo (50-100 fragmentos);
- Grande variedade de enzimas de restrição;
- Possibilidade de erro mínima- menos de 2% de erro;
- Não necessita de grande quantidade de DNA;
- Grande poder de detecção de variabilidade genética (polimorfismos e sítios de restrição).

# Desvantagens

- Marcadores dominantes;
- Exige maior número de análises, equipamentos e reagentes;
- DNA tem que ser extremamente puro, o que demanda um protocolo de extração mais elaborado.

# Utilização:

- Genética forense
- Teste de paternidade
- Diagnóstico de doenças hereditárias
- Construção de mapas genéticos (filogenia)
- Análises diversas da genética



Conteúdo relacionado

Estruturas de painéis solares ultraleves

Implementação da linha de Fotobiologia e Fotomedicina, junto ao grupo de fotoquimi...

Caracterização de antígenos de excreção e secreção (e/s AG) de de Toxoplasma gondi...

Genética de populações e evolução de Drosophila na América do Sul

Saponinas de plantas nativas de Dioscoreaceae

Retificação de aços endurecidos com rebolos superabrasivos de cbn e sua influência...

Caracterização biológica e bioquímica de amastigotas de Leishmania de cultura axênica

## Caracterização genotípica de amostras de Clostridium perfringens provenientes de suínos através da PCR ribotipagem, polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) e da eletroforese [...]

Pesquisador responsável: [Andrea Micke Moreno](#)   

Beneficiário: [Andrea Micke Moreno](#)   

Instituição: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP)

Área do conhecimento: [Ciências Agrárias - Medicina Veterinária](#)

Linha de fomento: Apoio a Jovens Pesquisadores

Processo: 03/01645-3

Vigência: 01 de junho de 2004 - 28 de fevereiro de 2007

Bolsa(s) vinculada(s): [04/05408-9 - Caracterização de amostras de Clostridium perfringens através da PCR e do perfil plasmidial](#)  
[04/04024-2 - Caracterização genotípica de isolados de Clostridium perfringens provenientes de suínos, através da PCR-ribotipagem](#)  
[04/04023-6 - Caracterização genotípica de amostras de Clostridium perfringens de origem suína através de eletroforese em campo pulsado \(PFGE\)](#)

Assunto(s): [Bactérias](#) [Clostridium](#) [Reação em cadeia por polimerase \(PCR\)](#) [Programa Jovens Pesquisadores](#)

### Resumo

Clostridium perfringens é um importante patógeno em Medicina veterinária e humana. Em suínos, o agente pode estar presente na microbiota ou causar infecções severas como a enterite necrótica ou a enterotoxemia. Apesar dos grandes prejuízos econômicos causados por este agente em Medicina veterinária, não foram encontrados relatos de subtipagem de cepas de C. perfringens de origem animal na literatura consultada. Alguns estudos descrevem a caracterização genotípica e a epidemiologia molecular de isolados de origem humana através do polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) e da eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). O presente estudo tem por objetivo desenvolver a PCR-ribotipagem como método alternativo para caracterização deste agente comparando os resultados obtidos nesta técnica com o AFLP e a PFGE. Após o desenvolvimento e padronização das técnicas citadas, as mesmas serão aplicadas a subtipagem de cepas de C. perfringens isolados de suínos com enterite necrótica ou enterotoxemia. A disponibilização destas técnicas para caracterização de C. perfringens permitirá grandes avanços nos conhecimentos sobre a epidemiologia da infecção por este agente e será de grande aplicação neste centro de pesquisa. (AU)

### Publicações científicas :

(Referências obtidas automaticamente do Web of Science e do Google Scholar, por meio da informação sobre o financiamento pela FAPESP e o número do processo correspondente, incluída na publicação pelos autores)

“O presente estudo tem por objetivo desenvolver a PCR-ribotipagem como método alternativo para caracterização deste agente comparando os resultados obtidos nesta técnica com o AFLP e a PFGE.”



# RFLP (polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição)

A análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA genômico (RFLP's) explora as diferenças que existem ao nível das sequências de DNA.

# Introdução

- Foram estudados pela primeira vez por Grodzicker (1974) em um experimento destinado à detecção de mutações em DNA dos vírus.
- Botstein (1980), propôs a utilização de fragmentos de DNA como marcadores genéticos para monitoramento de segregação cromossômica.
- Os marcadores RFLP são uma das classes de marcadores mais utilizadas em biologia

# Fundamentos

- Obtêm-se dois indivíduos distintos que têm o DNA extraído e submetido a clivagem por enzima de restrição;
- Após a extração, o DNA dos indivíduos é tratado com enzima de restrição, que o corta em um grande número de pontos (sítios de restrição), gerando uma enorme quantidade de fragmentos;
- As diferenças na sequência de DNA dos indivíduos resulta na clivagem de fragmentos de tamanhos distintos, que são separados através de eletroforese em gel de agarose.

# Fundamentos

- O polimorfismo observado na técnica de RFLP ocorre porque o DNA de indivíduos geneticamente distintos diferem na sequência de nucleotídeos ao longo da fita.
- Eles surgem quando mutações alteram sítios reconhecidos por enzimas de restrição específicas.
- Essas alterações levam a variações no tamanho dos fragmentos de restrição produzidos por regiões idênticas do genoma

# Detecção

- As diferenças no tamanho dos fragmentos podem ser visualizadas por eletroforese ou por *southern blotting* com uma sonda específica para a região do DNA que sabidamente contenha um RFLP.
- São utilizadas sondas de DNA que, após a digestão, a eletroforese e a transferência do DNA para o filtro de nitrocelulose, são hibridizadas e analisadas

# Southern blot

- É um método da biologia molecular que serve para verificar se uma determinada sequência de DNA está ou não presente em uma amostra de DNA analisada. Isso é feito por meio do realce do resultado da eletroforese em gel de agarose utilizando-se de marcadores radioativos

**1 Cellular DNA**



↓  
Cut with restriction enzyme

**2 Restriction fragments of lengths determined by location of recognition sequences for restriction enzyme**



↓  
Agarose gel

**3 Gel electrophoresis of fragments**



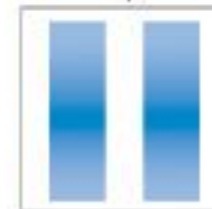
↓  
After staining with ethidium bromide, DNA fragments are visible with UV illumination

**4 Transfer to membrane filter by Southern blot technique**



↓  
Tray containing buffer solution

**5 DNA fragments transferred exactly as they were arranged in agarose gel**



↓  
Hybridize with labeled probe

**6 DNA fragments complementary to the probe are visible after autoradiography or chemiluminescence**



# Aplicações

- É utilizado em testes genéticos, como testes de paternidade, detecção de doenças genéticas, genotipagem e ciência forense.
- Pode ser combinada com a PCR para obtenção de resultados mais confiáveis ou para análise de amostras mais escassas.



# Vantagens dos RFLP's

- O número de marcadores RFLP é praticamente ilimitado;
- São Reprodutíveis;
- São Simples.

# Desvantagens dos RFLP's

- Baixa eficiência em análises com grande número de indivíduos;
- Inexistência de uma biblioteca de sondas
- Alto custo de execução;

[Display Settings:](#)  Abstract[Send to:](#) [Iran J Microbiol.](#) 2012 Dec;4(4):191-7.

## Analysis of enzymatic digestion pattern of two open reading frames of Varciella-Zoster genome from Kuwaiti patients using the RFLP technique.

[Ja Q.](#), [Al-Fadhli M.](#), [Saraya M.](#), [Thomas J.](#)

Department of Applied Medical Sciences, College of Health Sciences, Public Authority for Applied Education and Training-PAAET, Kuwait.

### Abstract

**BACKGROUND AND OBJECTIVES:** Varicella-Zoster virus (VZV) is a human herpes virus that usually attacks young children and commonly causes chicken pox (Varicella). Following primary infection, a lifelong latent infection is established. The virus often reactivates during adulthood or senescence to cause shingles (Zoster). Little is known regarding the genotypes of Varicella in Kuwait. The aim of this study was to genotype Varicella samples collected from patients in Kuwait.

**MATERIALS AND METHODS:** Samples from 60 cases of chicken pox were typed. The DNA extraction was performed using the commercially available DNA extraction kit. Two sets of oligonucleotide primers were used to amplify the intervening sequences with polymerase chain reaction to identify VZV DNA in clinical samples. The BglI and PstI endonucleases were used to digest. The PCR amplicons for PCR-RFLP typing.

**RESULTS:** Relatively consistent restriction enzyme digestion profiles for different VZV strains were observed. Limited genetic differences between VZV samples were found. Three VZV strains were identified (A, B and C) with type B representing 86.6%, type A 11.7% and type C being 1.7%. We found that distinct restriction fragment length polymorphism isolates from the same origin or nationality were very similar.

**CONCLUSION:** Varicella strains with cutting sites for both enzyme PstI and BglI (typeB) were more prevalent. Molecular amplification of viral DNA by PCR and restriction digestion could be used for VZV typing as an alternative method to serological assays.

**OBRIGADO**