

# PCR RAPD

## Alu PCR

### PCR Multiplex

Prof. Fabiana Seixas

Mariana Fronza  
Maurício Tamborindeguy



- 
- ◉ Introdução ao PCR
  - ◉ PCR RAPD
  - ◉ PCR Multiplex
  - ◉ Alu PCR
  - ◉ Referências

# PCR

---

- ◎ Reação em cadeia da polimerase
- ◎ Técnica pela qual moléculas de DNA são amplificadas milhares ou milhões de vezes rapidamente.
- ◎ In vitro

# Reação de amplificação contém:

---

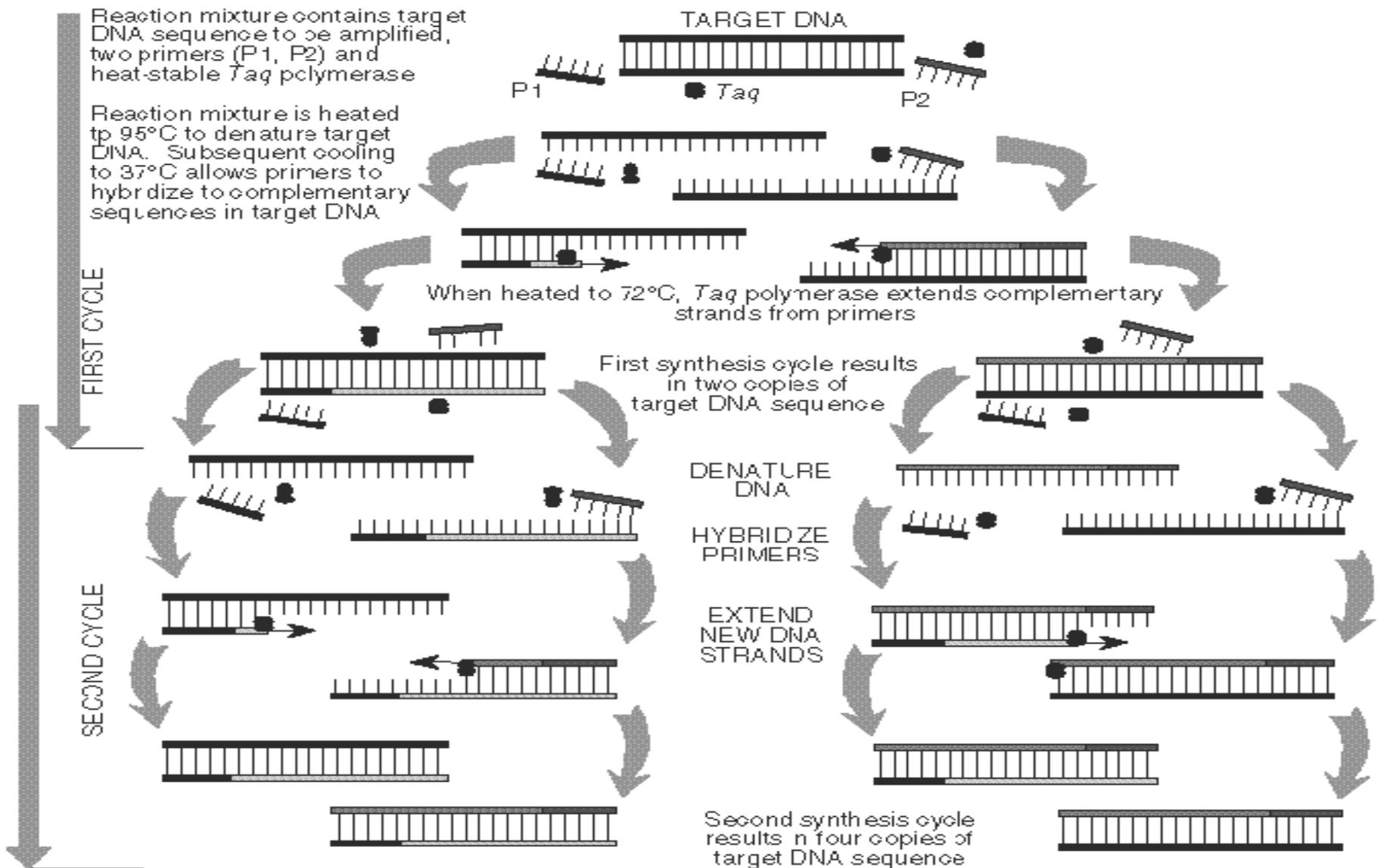
- ◉ Sequência alvo
- ◉ DNA polimerase termoestável (Taq)
- ◉ Primers (oligonucleotídeos)
- ◉ dNTP's
- ◉ Tampão de reação
- ◉ MgCl<sub>2</sub>
- ◉ H<sub>2</sub>O

# Etapas da PCR:

---

- ◉ Desnaturação (95°C)
- ◉ Anelamento (45-65°C)
- ◉ Polimerização (72°C)
  
- ◉ Termociclador é o equipamento que possibilita o resfriamento e o aquecimento rápido das amostras.
  
- ◉ Eletroforese em gel de agarose.

## DNA Amplification Using Polymerase Chain Reaction



# Aplicações da PCR:

---

- ◉ Testes de identificação genética
- ◉ Medicina Forense
- ◉ Diagnósticos de doenças infecciosas
- ◉ Controle de qualidade industrial
- ◉ Entre outras...



PCR RAPD

# PCR RAPD

---

- ◎ A técnica de RAPD é basicamente uma variação do protocolo de PCR, onde o primer se hibridiza com baixa especificidade em muitos sítios do DNA através do pareamento com baixa estringência do mesmo.
- ◎ RAPD= randomly amplified polymorphic DNA - DNA polimórfico amplificado aleatoriamente.

# PCR RAPD x PCR convencional:

---

- ◉ Apenas um primer
- ◉ A seqüência é construída aleatoriamente
- ◉ Temperatura de hibridização é inferior a 45 graus

# Protocolo de PCR RAPD:

---

- ◉ 5  $\mu\text{L}$  de DNA molde (25 ng) – estoque 3 ng/ $\mu\text{L}$
- ◉ 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão da enzima 10x
- ◉ 2,5  $\mu\text{L}$  de dNTPs estoque de 1 mM
- ◉ 0,1  $\mu\text{L}$  de estoque de primer de 50  $\mu\text{M}$
- ◉ 1 unidade de Taq polimerase
- ◉ dH<sub>2</sub>O até 25  $\mu\text{L}$

# Protocolo de PCR RAPD:

---

- ⦿ Desnaturação a 94°C - 60 segundos
- ⦿ Anelamento a 36°C - 60 segundos
- ⦿ Extensão a 72°C - 120 segundos
- ⦿ 45 ciclos com a mudança de temperatura mais rápida possível

# Vantagens

---

- ◎ RAPD não necessita de trabalhos preliminares
- ◎ Apresenta um custo mais baixo e uma relativa facilidade metodológica, quando comparada com outras técnicas

# Vantagens

---

- ◉ **Necessita de apenas uma pequena quantidade de DNA para a análise genotípica**
- ◉ **Pode ser diretamente visualizado na forma de uma banda no gel de eletroforese.**

# Desvantagens

---

- ◎ Um alto nível de padronização e controle interno no laboratório é necessário
- ◎ É difícil a reprodutibilidade pelo número de oscilações na temperatura

# Aplicações

---

- ◎ Obtenção de fingerprints genômicos de indivíduos, variedades e populações
- ◎ Análise da estrutura e diversidade genética em populações naturais, populações de melhoramento e bancos de germoplasma

# Aplicações

---

- ◎ Estabelecimento de relacionamentos filogenéticos entre diferentes espécies
- ◎ Construção de mapas genéticos de alta cobertura genômica e a localização de genes de interesse econômico



ELSEVIER

Gene 206 (1998) 45–48

**GENE**

AN INTERNATIONAL JOURNAL ON  
GENES AND GENOMES

## Genetic alterations in brain tumors identified by RAPD analysis

Dil-Afroze <sup>a,b</sup>, Anjan Misra <sup>b,1</sup>, Irshad M. Sulaiman <sup>a</sup>, Subrata Sinha <sup>b</sup>, Chitra Sarkar <sup>c</sup>,  
Ashok K. Mahapatra <sup>d</sup>, Seyed E. Hasnain <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Eukaryotic Gene Expression Laboratory, National Institute of Immunology, Aruna Asaf Ali Marg, New Delhi 110067, India*

<sup>b</sup> *Department of Biochemistry, All India Institute of Medical Sciences, New Delhi, India*

<sup>c</sup> *Department of Pathology, All India Institute of Medical Sciences, New Delhi, India*

<sup>d</sup> *Department of Neurosurgery, All India Institute of Medical Sciences, New Delhi, India*

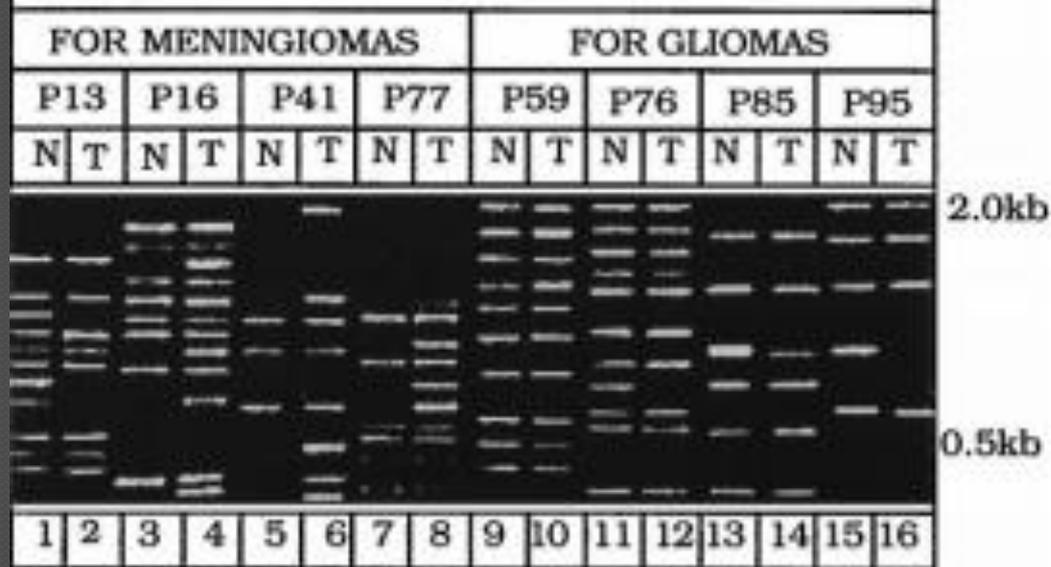
Received 15 May 1997; received in revised form 23 September 1997; accepted 23 September 1997; Received by J. Wild

### Abstract

We report the utility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for identifying subtle genomic alterations in meningiomas and gliomas by comparing the DNA band profile of tumor vis-a-vis its constitutional counterpart. Twenty out of the 29 decanucleotide GC-rich random primers utilized for the RAPD analysis of meningiomas revealed alteration(s) in the tumor genome. In gliomas, changes were detected by 16 of the 18 primers. While all the seven meningioma samples exhibited alterations in tumor DNA, changes were evident in 21 of the 24 glioma cases. These alterations in tumor DNA included the loss of a normal band, appearance of a new band and amplification of a pre-existing band. Many primers detected more than one alterations in a given tumor. Our approach, which covers the range from 0.4 to 2 kb, besides detecting a significant number of changes in a spectrum of brain tumors, complements existing DNA fingerprinting methods, such as microsatellite mapping (less than 0.4 kb) and Southern blotting (over 2 kb), for detecting genetic alterations in tumors. © 1997 Elsevier Science B.V.

**Keywords:** Meningioma; Glioma; PCR; Genomic alterations

## POLYMORPHIC BAND PROFILE



**VETERINARY MICROBIOLOGY**

**Molecular genetic differentiation of avian  
*Escherichia coli* by RAPD-PCR**

**Diferenciação molecular de *Escherichia coli* aviária por  
RAPD-PCR**

**Taghi Zahraei Salehi<sup>I</sup>; Seyed Ahmad Madani<sup>II</sup>; Vahid Karimi<sup>II</sup>; Fatemeh Arab Khazaeli<sup>III</sup>**

<sup>I</sup>Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran

<sup>II</sup>Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Iran

<sup>III</sup>Private Veterinarian, Darougostar company, Tehran, Iran

**Services on Demand**

Article



pdf in English



Article in xml format



Article references



How to cite this article



Automatic translation

Indicators

Related links

Bookmark



More



Permalink

- ◎ Aplicação do RAPD para diferenciação molecular de *E. coli* no Irã
- ◎ 58 isolados:
  - 4 isolados padrão
  - 3 isolados de alimentos
  - 33 isolados de aves
  - 8 isolados de bezerros diarréicos
  - 10 isolados de carneiros diarréicos

# Procedimentos

---

- ◉ Meio LB, incubadas a 37°C
- ◉ Extração de DNA
- ◉ RAPD
- ◉ Eletroforese
  
- ◉  $F = \frac{2n_{xy}}{n_x + n_y}$
  
- ◉ Agrupados em 33 tipos RAPD; isolados de aves em 29 genótipos diferentes

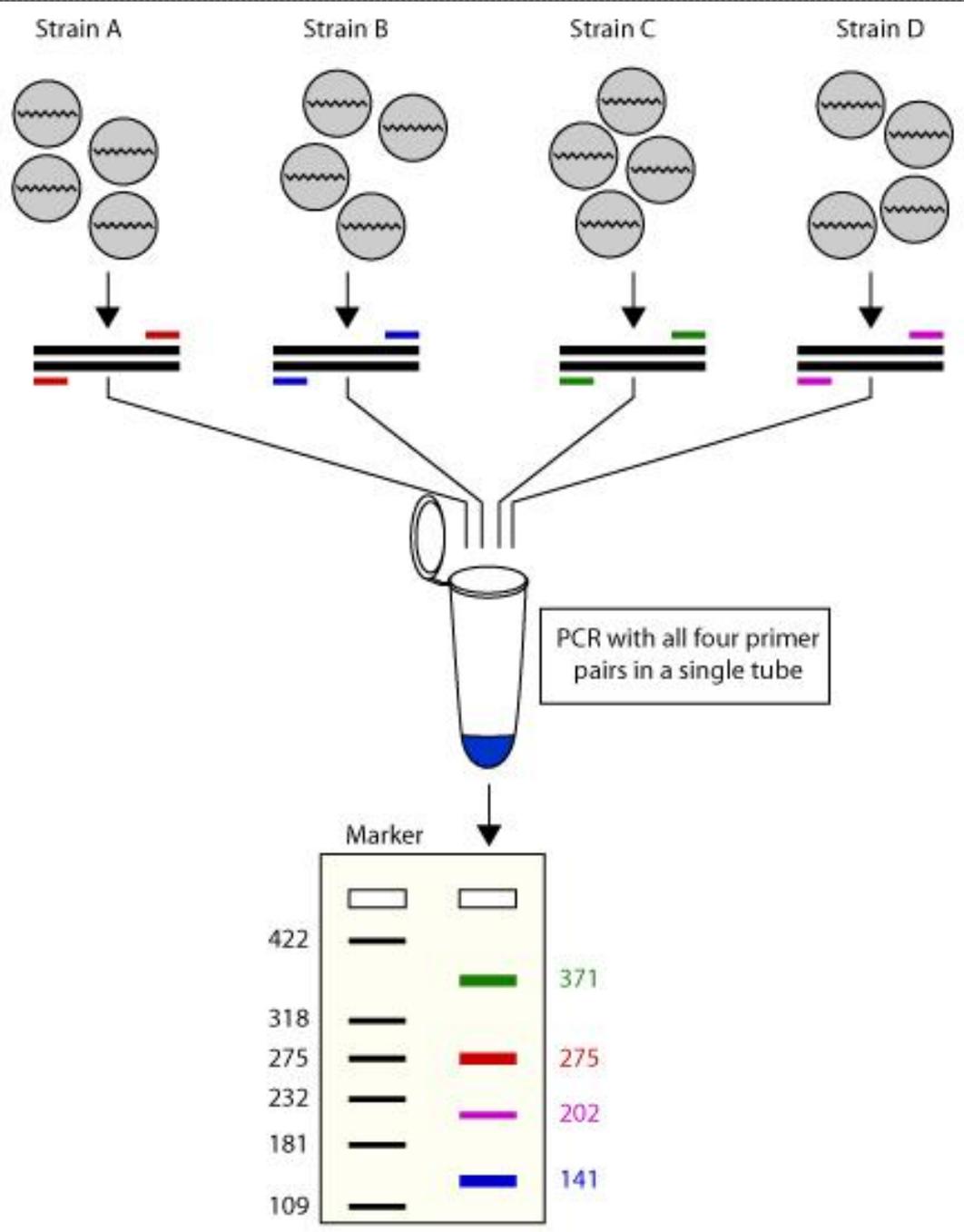


PCR Multiplex

# PCR Multiplex

---

- ◎ Reação de amplificação desenhada para detectar múltiplas sequências alvo numa mesma amostra.
- ◎ São utilizados vários primers.



# Há dois tipos de reação do PCR Multiplex:

## SINGLE TEMPLATE PCR REACTION

- Uma amostra de DNA com vários primers

## MULTIPLE TEMPLATE PCR REACTION

- Mais de uma amostra de DNA com mais de um conjunto de primers em um mesmo tubo.
- Pode ocorrer hibridização nesse tipo de reação.

# Protocolo do PCR Multiplex:

---

- Existem kits comerciais de PCR Multiplex, e esses kits tem mais vantagens do que os feitos *in house*.
- O protocolo utilizado é o *Standart Multiplex PCR Protocol*, um kit comercial da QIAGEN.
- Reagentes do kit: QIAGEN Multiplex PCR Master Mix, água isenta de RNase, primers e DNA molde.

# Protocolo do PCR Mutiplex:

- Se mistura de acordo com a tabela abaixo todos os componentes, exceto o DNA molde.

Component	Volume/reaction	Final concentration
<b>Reaction mix</b>		
2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix*	25 $\mu$ l	1x
10x primer mix, 2 $\mu$ M each primer (see Table 2)	5 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M <sup>†</sup>
RNase-free water	Variable	–
<b>Template DNA</b>		
Added at step 4	Variable	$\leq$ 1 $\mu$ g DNA/50 $\mu$ l
<b>Total volume</b>	<b>50 <math>\mu</math>l<sup>‡</sup></b>	

# Protocolo do PCR Multiplex:

---

- Se despeja a mistura dos reagentes em tubos de PCR.
- Adiciona-se o DNA molde.
- Os tubos da PCR são colocadas no termociclador que é ajustado de acordo com a tabela a seguir.

# Protocolo do PCR Multiplex:

			<u>Additional comments</u>
Initial activation step:	15 min	95°C	HotStarTaq DNA Polymerase is activated by this heating step.
<b>3-step cycling:</b>			
Denaturation	30 s	94°C	
Annealing	90 s	57–63°C	If a gradient PCR cannot be performed, use 60°C as the starting annealing temperature. If the lowest $T_m^*$ of your primer mixture is below 60°C, use 57°C as starting annealing temperature.
Extension	90 s	72°C	Optimal for targets up to approximately 1.5 kb in length.†
Number of cycles	30–45		The number of cycles is dependent on the amount of template DNA and the required sensitivity of your detection method. See Appendix C, page 36 for guidelines.
Final extension:	10 min	72°C	

E o resultado deve ser analisado em Eletroforese.

# Vantagens

---

- ◎ Economia de tempo, reagentes e trabalho no laboratório.
- ◎ Não compromete a qualidade do experimento.
- ◎ Diminui risco de contaminação das amostras e erro de experimento.

# Vantagens

---

- **Controle interno**

- **Avalia a quantidade de um determinado modelo de amostra.**

# Desvantagens

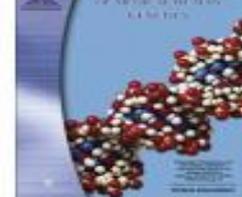
---

- ◎ Procedimento demorado
- ◎ Problemas com a otimização das corridas de sequenciamento e amplificação

# Aplicações

---

- ◉ Análises de deleções, mutações e polimorfismos
- ◉ Detecta deleções ou duplicações em um gene
- ◉ Investigação de paternidade
- ◉ Identificação de patógenos
- ◉ Medicina Forense



## ORIGINAL ARTICLE

# Simultaneous detection of respiratory syncytial virus types A and B and influenza virus types A and B in community-acquired pneumonia by reverse transcription-multiplex PCR

Tharwat Ezzat Deraz <sup>a</sup>, Mervat Gamal Eldin Mansour <sup>a,\*</sup>, Sherin Albendary <sup>b</sup>,  
Ahmed Mohamed Abdelwahab <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Ain Shams University, Cairo, Egypt

<sup>b</sup> Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Ain Shams University, Cairo, Egypt

Received 28 December 2011; accepted 3 January 2012

Available online 28 February 2012

## KEYWORDS

Viral pneumonia;  
LRTI;  
Children;  
Reverse transcription-multiplex PCR;  
RSV;  
Influenza viruses

**Abstract** *Background:* Respiratory syncytial virus (RSV) types A and B and influenza A and B cause about 80–90% of viral lower respiratory tract infections. It is impossible to distinguish the cause of viral respiratory infections by their clinical presentation. Multiplex RT-PCR has a significant advantage in that it permits the simultaneous amplification of several viruses in a single reaction facilitating cost-effective diagnosis and perhaps improved clinical management.

*Objectives:* In this study, our aim was to determine the prevalence of influenza A and B, and RSV types A and B among children with CAP, by the use of the newly developed rapid, accurate, and pathogen-specific technique of multiplex RT-PCR in order to accomplish the greatest positive effect on patient care and health care costs.

*Study methodology:* This study is a cross-sectional study involving 24 children admitted to the Children's Hospital of the Ain Shams University due to severe lower respiratory tract infection (LRTI). Clinical and radiological assessment of all patients was performed followed by the molec-

# Artigo

---

- ◉ Detectar diversos tipos de vírus simultaneamente numa amostra.
- ◉ Tipo A e B da influenza.
- ◉ 24 crianças do Hospital Universitário de Shams foram analisadas

# Resultados

---

- ◎ Pneumonia em 8 das 24 crianças analisadas.
- ◎ Sincicial = 4 das 8
- ◎ Vírus da gripe A = 3 das 8
- ◎ Vírus da gripe B = 1 das 8
- ◎ Método eficiente para identificar esses tipos de vírus.



### Development of multiplex PCR assay for rapid detection of *Riemerella anatipestifer*, *Escherichia coli*, and *Salmonella enterica* simultaneously from ducks

Qinghai Hu<sup>a</sup>, Jing Tu<sup>a</sup>, Xiangan Han<sup>a</sup>, Yinyu Zhu<sup>a</sup>, Chan Ding<sup>a,b</sup>, Shengqing Yu<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Shanghai Veterinary Research Institute, the Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS), 518 Ziyue Road, Shanghai 200241, PR China

<sup>b</sup> China National Engineering Technology Research Centre for Poultry, 2949 Zhennan Road, Shanghai, 200331, PR China

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 7 April 2011

Received in revised form 28 June 2011

Accepted 8 July 2011

Available online 23 July 2011

##### Keywords:

*Riemerella anatipestifer*

*Escherichia coli*

*Salmonella enterica*

Multiplex PCR

#### ABSTRACT

Three pathogens, *Riemerella anatipestifer*, *Escherichia coli*, and *Salmonella enterica*, are leading causes of bacterial fibrinous pericarditis and perihepatitis in ducks in China and worldwide. It is difficult to differentiate these pathogens when obtaining a diagnosis on clinical signs and pathological changes. The aim of this research was to develop a multiplex polymerase chain reaction (m-PCR) that could discriminate *R. anatipestifer*, *E. coli*, and *S. enterica* rapidly in field isolates, or detect the three bacteria in clinical samples from diseased ducks. We selected the DnaB helicase (*dnaB*) gene of *R. anatipestifer*, alkaline phosphatase (*phoA*) gene of *E. coli* and invasion protein (*invA*) gene of *S. enterica* as target genes. In optimized conditions, the limitation of detection was approximately  $10^3$  colony forming units (CFU) of each of these three bacterial pathogens per PCR reaction tube. The m-PCR method showed specific amplification of respective genes from *R. anatipestifer*, *E. coli*, and *S. enterica*. Using the m-PCR system, bacterial strains isolated from diseased ducks in our laboratory were categorized successfully, and the pathogens could also be detected in clinical samples from diseased ducks. Therefore, the m-PCR system could distinguish the three pathogens simultaneously, for identification, routine molecular diagnosis and epidemiology, in a single reaction.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

#### 1. Introduction

Three pathogens, *Riemerella anatipestifer*, *Escherichia coli*, and *Salmonella enterica*, are leading causes of bacterial diseases in ducks in China and worldwide. These pathogens can lead to high morbidity and mortality, and to large economic losses in the duck industry (Saif et al., 2003; Tsai and Hsiang, 2005; Wang et al., 2010).

Infection with *R. anatipestifer* causes a syndrome of infectious serositis in ducks, while *E. coli* and *S. enterica* can also cause similar clinical signs and pathological changes (Saif et al., 2003). This

*anatipestifer*, several assays have been reported, including polymerase chain reaction (PCR) for the *ompA* gene (Hu et al., 2002; Zheng et al., 2010), 16S rRNA (Qu et al., 2006; Subramaniam et al., 1997), the *rpoB* gene (Christensen and Bisgaard, 2010), and an ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus) fragment (Kardos et al., 2007). However, the primer pair candidates designed for *ompA* and 16S rRNA genes did not show good specificity for *R. anatipestifer* in silico (Kardos et al., 2007). For the detection of *E. coli*, examination of the distribution of virulence-associated genes by PCR has often been used to characterize avian pathogenic *E. coli* (APEC) strains (Ewers et al.,



Alu PCR

# Alu PCR

---

- Sequências Alu: São sequências curtas de DNA (300 nucleotídeos) capazes de gerar cópias de si e depois inserí-las no genoma em posições aleatórias
- Cientistas descobriram que as sequências ALU são fundamentais na tarefa de acionar determinados genes quando o organismo se encontra em uma situação de estresse.

# DNA Fingerprint = Impressão digital do DNA

---

- ◎ DNA fingerprint é a identificação de sequências específicas no DNA humano que são altamente variáveis e, portanto, são característicos de cada pessoa.
- ◎ Por meio do DNA fingerprint ocorre investigação criminal para identificar criminosos a partir de resíduos de DNA (pele, sangue, esperma, cabelos, etc) ou em testes de paternidade para identificar os pais.

# PCR Alu

---

- ◎ PCR que utiliza um primer que hibridiza repetições Alu para amplificar fragmentos de DNA localizados entre duas sequências Alu opostas.
- ◎ Primers dirigidos as sequências Alu.

# Vantagens

---

- ◎ Capaz de verificar genomas inteiros para analisar polimorfismos
- ◎ Vantagem de não ter apenas uma sequência de leitura a montante de inserção, mas também a sequência da região 5' da junção de inserção propriamente dito, assim proporcionando um mecanismo para verificar se a primeira sonda de PCR foi colocada corretamente durante o anelamento do primer Alu específico

# Desvantagens

---

- ◎ Capacidade limitada para consultar a referencia do genoma humano, especialmente nas regiões altamente repetitivas
- ◎ Problemas com a otimização das corridas de sequenciamento e amplificação

# Aplicações

---

- ◉ Permite mapeamento genético
- ◉ Fornece método simples para isolamento e amostras de regiões cromossômicas específicas
- ◉ Permite a detecção de polimorfismos genéticos e mutações nos genomas humanos e primatas

# ***Alu* polymerase chain reaction: A method for rapid isolation of human-specific sequences from complex DNA sources**

(somatic cell hybrid/X chromosome/cloning/yeast artificial chromosome)

DAVID L. NELSON\*<sup>†‡</sup>, SUSAN A. LEDBETTER<sup>‡</sup>, LAURA CORBO<sup>‡</sup>, MAUREEN F. VICTORIA<sup>‡</sup>, RAMIRO RAMÍREZ-SOLIS<sup>‡</sup>, THOMAS D. WEBSTER<sup>‡</sup>, DAVID H. LEDBETTER<sup>‡</sup>, AND C. THOMAS CASKEY\*<sup>‡</sup>

\*Howard Hughes Medical Institute and <sup>‡</sup>Institute for Molecular Genetics, Baylor College of Medicine, One Baylor Plaza, Houston, TX 77030

Communicated by Charles R. Cantor, June 2, 1989 (received for review April 16, 1989)

**ABSTRACT** Current efforts to map the human genome are focused on individual chromosomes or smaller regions and frequently rely on the use of somatic cell hybrids. We report the application of the polymerase chain reaction to direct amplification of human DNA from hybrid cells containing regions of the human genome in rodent cell backgrounds using primers directed to the human *Alu* repeat element. We demonstrate *Alu*-directed amplification of a fragment of the human *HPRT* gene from both hybrid cell and cloned DNA and identify through sequence analysis the *Alu* repeats involved in this amplification. We also demonstrate the application of this technique to identify the chromosomal locations of large fragments of the human X chromosome cloned in a yeast artificial chromosome and the general applicability of the method to the preparation of DNA probes from cloned human sequences. The technique allows rapid gene mapping and provides a simple method for the isolation and analysis of specific chromosomal regions.

grounds through the use of the polymerase chain reaction (PCR).

## **MATERIALS AND METHODS**

**Cell Lines.** The somatic cell hybrids used in this study are described in Table 1. The hybrid lines 94-3, 8121 Aza 1, and 2384 Aza 2 were derived by fusing a V79 hamster cell line with lymphoblastoid cell lines of patients with X chromosome deletions or translocations (12) and will be described elsewhere. The line Micro 28g contains a fragile X chromosome broken at the fragile (X) site and translocated to hamster (13).

**PCRs and Primers.** The PCR was carried out in a total volume of 100  $\mu$ l with 1  $\mu$ g of DNA, primer at 1  $\mu$ M in 50 mM KCl/10 mM Tris-HCl, pH 8.0/1.5 mM MgCl<sub>2</sub>/0.01% gelatin/300  $\mu$ M dATP/300  $\mu$ M dCTP/300  $\mu$ M dGTP/300  $\mu$ M dTTP (Pharmacia), and 2.5 units of *Thermus aquaticus* polymerase (Perkin-Elmer/Cetus) for 35 cycles of 94°C denaturation (1 min), 55°C annealing (45 sec), and 68°C extension (5 min) in an automated thermal cycler (Perkin-Elmer/Cetus). Initi-

# Artigo – Tabela: Híbridos de células somáticas utilizadas no estudo:

**Table 1. Human chromosome complements of somatic cell hybrids used in these studies**

Cell line	Background	X chromosome region	Other human chromosome(s)	Ref.
4.12	Hamster	Entire X	None	8
X3000-11.1	Hamster	Xq24-qter	None	9
F649-5	Hamster	Xq25-qter	der 3, 8, 11	10
RJK 734	Mouse	Xq26-qter	11pter-q23	11
94-3	Hamster	Xq26-qter	15pter-q25, 10, 22	12
8121 Aza 1	Hamster	Xpter-q26.3	6,7,14,21	12
2384 Aza 2	Hamster	Xpter-q27.1	6,11,17p-,21	12
Micro 28g	Hamster	Xpter-q27.3	None	13
MH22-6	Mouse	None	17	14
HD1132b	Mouse	None	4	15

## Decline in genomic DNA methylation through aging in a cohort of elderly subjects

Valentina Bollati<sup>a</sup>, Joel Schwartz<sup>b,c</sup>, Robert Wright<sup>b,c</sup>, Augusto Litonjua<sup>b</sup>, Letizia Tarantini<sup>a</sup>, Helen Suh<sup>c</sup>, David Sparrow<sup>d</sup>, Pantel Vokonas<sup>d</sup>, Andrea Baccarelli<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Center of Molecular and Genetic Epidemiology, Department of Environmental and Occupational Health, University of Milan & IRCCS Maggiore Hospital, Mangiagalli and Regina Elena Foundation, Via San Barnaba 8, 20122 Milan, Italy

<sup>b</sup> Channing Laboratory, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA

<sup>c</sup> Department of Environmental Health, Harvard School of Public Health, Boston, MA, USA

<sup>d</sup> VA Normative Aging Study, Veterans Affairs Boston Healthcare System and the Department of Medicine, Boston University School of Medicine, Boston, MA, USA

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 11 September 2008

Received in revised form 19 November 2008

Accepted 12 December 2008

Available online 27 December 2008

#### Keywords:

Aging

Methylation

Repetitive elements

Epigenetics

Pyrosequencing

### ABSTRACT

Loss of genomic DNA methylation has been found in a variety of common human age-related diseases. Whether DNA methylation decreases over time as individuals age is unresolved. We measured DNA methylation in 1097 blood DNA samples from 718 elderly subjects between 55 and 92 years of age (1–3 samples/subjects), who have been repeatedly evaluated over an 8-year time span in the Boston area Normative Aging Study. DNA methylation was measured using quantitative PCR-Pyrosequencing analysis in Alu and LINE-1 repetitive elements, heavily methylated sequences with high representation throughout the human genome.

Age at the visit was negatively associated with Alu element methylation ( $\beta = -0.12 \pm 0.01$  mC/year,  $p = 0.0005$ ). A weaker association was observed with LINE-1 elements ( $\beta = -0.06 \pm 0.01$  mC/year,  $p = 0.049$ ). We observed a significant decrease in average Alu methylation over time, with a  $-0.2 \pm 0.01$  mC change ( $p = 0.012$ ) compared to blood samples collected up to 8 years earlier. The longitudinal decline in Alu methylation was linear and highly correlated with time since the first measurement ( $\beta = -0.089 \pm 0.001$  mC/year,  $p < 0.0001$ ). In contrast, average LINE-1 methylation did not vary over time [ $p = 0.51$ ]. Our results demonstrate a progressive loss of DNA methylation in repetitive elements dispersed throughout the genome.

# Referências

---

- ◎ ZAHA, A.; FERREIRA, H.; PASSAGLIA, L. – *Biologia Molecular Básica*. Artmed. 5<sup>a</sup> ed.
- ◎ <http://www.info.sciverse.com/sciencedirect>
- ◎ [http://www.premierbiosoft.com/tech\\_notes/multiplex-pcr.html](http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/multiplex-pcr.html)
- ◎ [http://www.protocol-online.org/prot/Molecular\\_Biology/PCR/Multiplex\\_PCR/index.html](http://www.protocol-online.org/prot/Molecular_Biology/PCR/Multiplex_PCR/index.html)
- ◎ <http://www.pcrlinks.com>
- ◎ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>
- ◎ [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1517-83822008000300015](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822008000300015)

**Obrigado!**



Universidade Federal de Pelotas  
Graduação em Biotecnologia  
Disciplina de Biologia Molecular



**Alu - PCR**  
**Multiplex PCR**  
**RAPD - PCR**

Carinne Mortola Santos  
Luísa Reinhardt Ugoski

## Sequências *Alu*

### **A ubiquitous family of repeated DNA sequences in the human genome**

Catherine M. Houck<sup>a</sup>, Frank P. Rinehart<sup>b</sup>, Carl W. Schmid

<sup>a</sup> Department of Chemistry University of California Davis, CA 95616, U.S.A.

<sup>b</sup> College of the Virgin Islands Division of Science and Mathematics St. Thomas, VI 00801, U.S.A.

Received 27 November 1978; revised 2 April 1979; Available online 3 November 2004.

#### **Abstract**

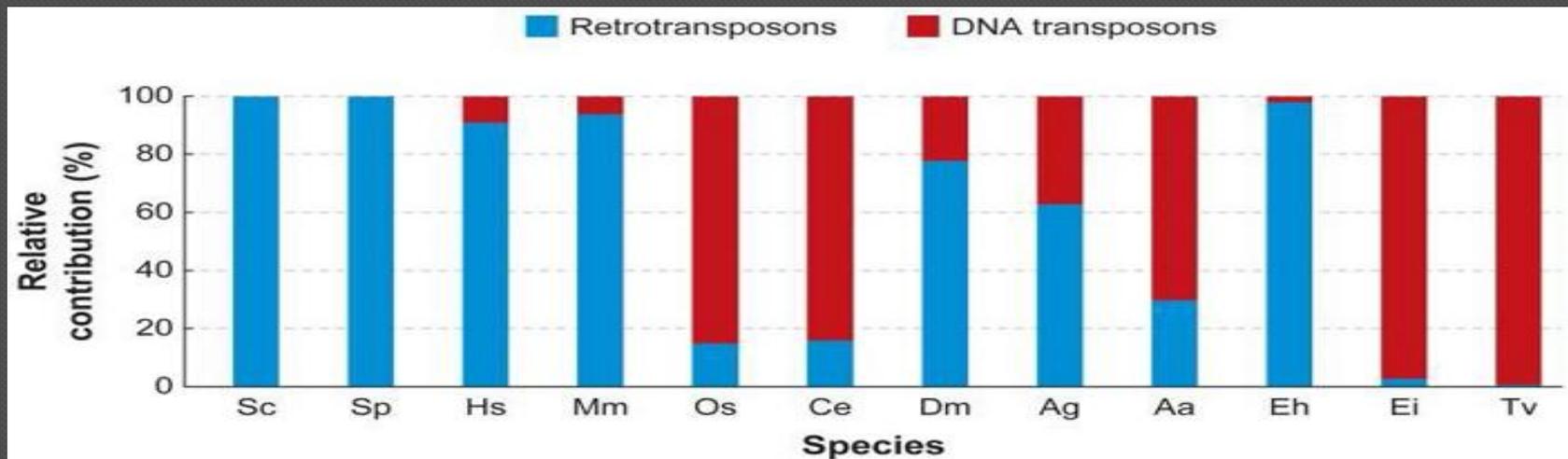
Renatured DNA from human and many other eukaryotes is known to contain 300-nucleotide **duplex regions** formed from renatured repeated sequences. These short repeated DNA sequences are widely believed to be interspersed with single copy DNA sequences. In this work we show that at least half of these 300-nucleotide duplexes share a cleavage site for the **restriction enzyme *AluI***. This site is located 170 nucleotides from one end. This *Alu* family of repeated sequences makes up at least 3% of the genome and is present in several hundred thousand copies.

# Elementos Transponíveis do DNA

Formam 45% do genoma humano;

Transposons são pedaços do DNA capazes de se movimentar pelo genoma;

Retrotransposons transcritos em RNA posteriormente são transformados em DNA, pela ação da transcriptase reversa.



# Sequências *Alu*

Sequências de repetição dispersas: curtas, chamadas de SINES (short interspersed repeated sequences), ou *longas*, que são as chamadas LINES (long interspersed repeated sequences).

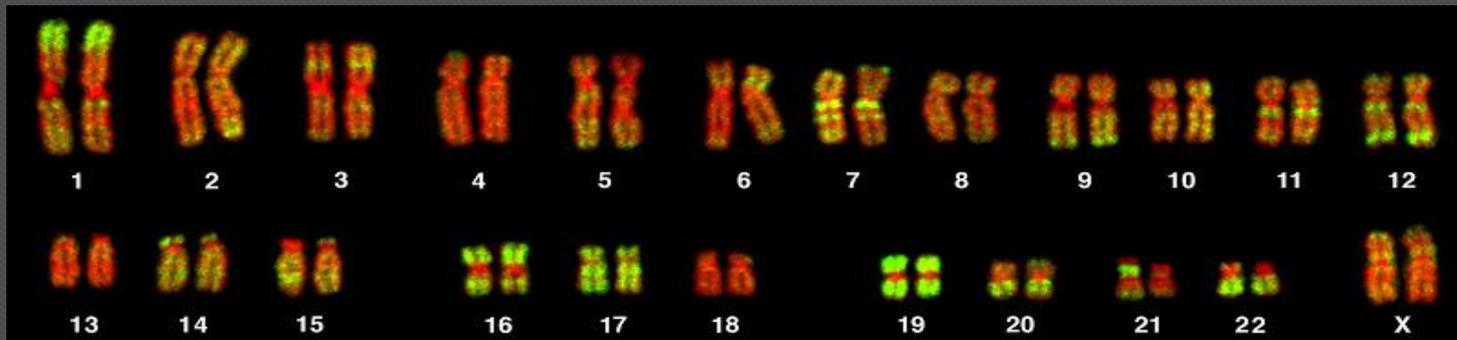
Genoma dos primatas há 65 milhões de anos.

Apresentam aproximadamente 300pb.

Os elementos *alu* totalizam 3% do genoma humano.

Não codificam proteínas em humanos.

Presentes em regiões gênicas e intergênicas



# Resumindo: sequências *Alu*

O que são?

Sequências repetidas dispersas de retrotransposons, SINES, com ~300pb

Recebem esse nome pela presença de um sítio de restrição para a enzima *AluI*.

Como ocorre a inserção dessa sequência no genoma?

Um elemento *Alu* é transcrito em RNA pela RNA polimerase

Convertido em DNA pela transcriptase reversa

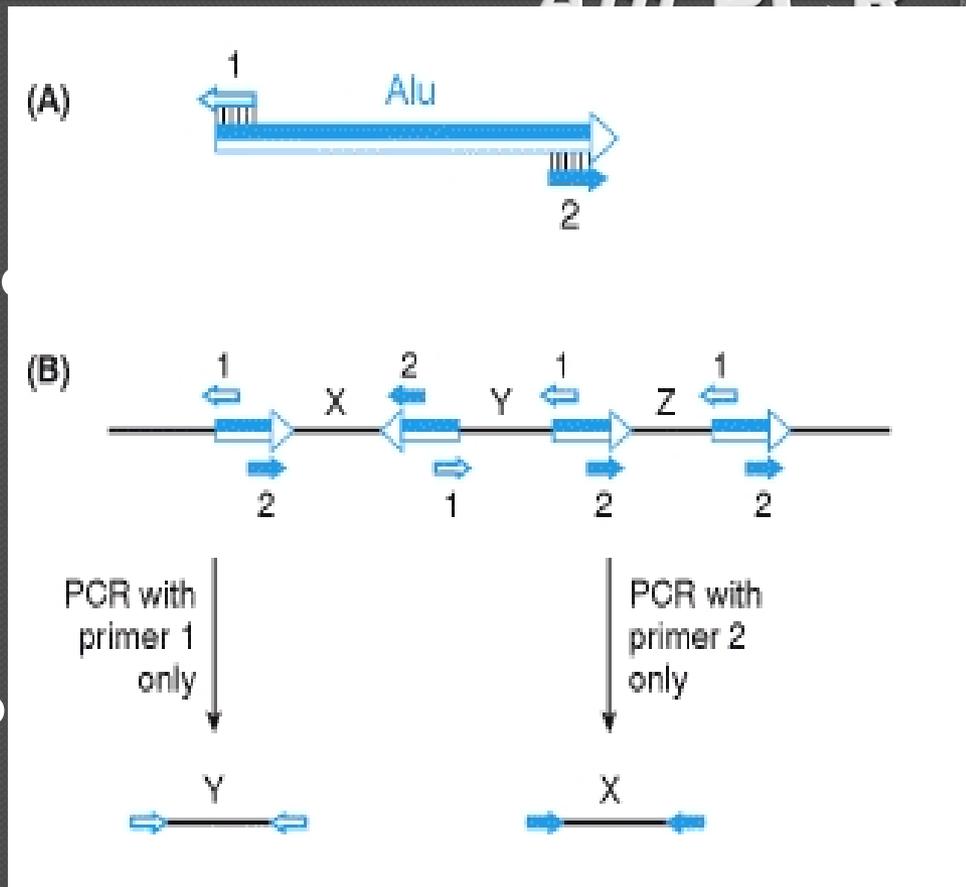
E inserido em um local do genoma.

# — Importância das sequências *Alu*

- Gene egoísta;
- Diversidade genética das populações humanas;
- Evolução da ordem dos primatas;
- Ancestralidade geográfica de uma amostra de DNA.
- Associadas com várias doenças hereditárias em humanos(0.1-0.3%).
- Câncer.
- Hemofilia A e B
- Neurofibromatose

# Alu PCR

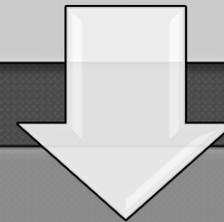
- Obtém-se a amplificação de sequências de nucleotídeos desconhecidas compreendidas entre duas sequências Alu repetidas posicionadas em direções opostas.
- Sequências de iniciadores do tipo Alu.



# Protocolo

- *Alu primers*
- 5 'GGATT ACAGG YRTGA  
GCCA 3'
- 5 'RCCAY TGCAC TCCAG  
CCTG 3'
- Sendo :Y = C / T e R = A / G

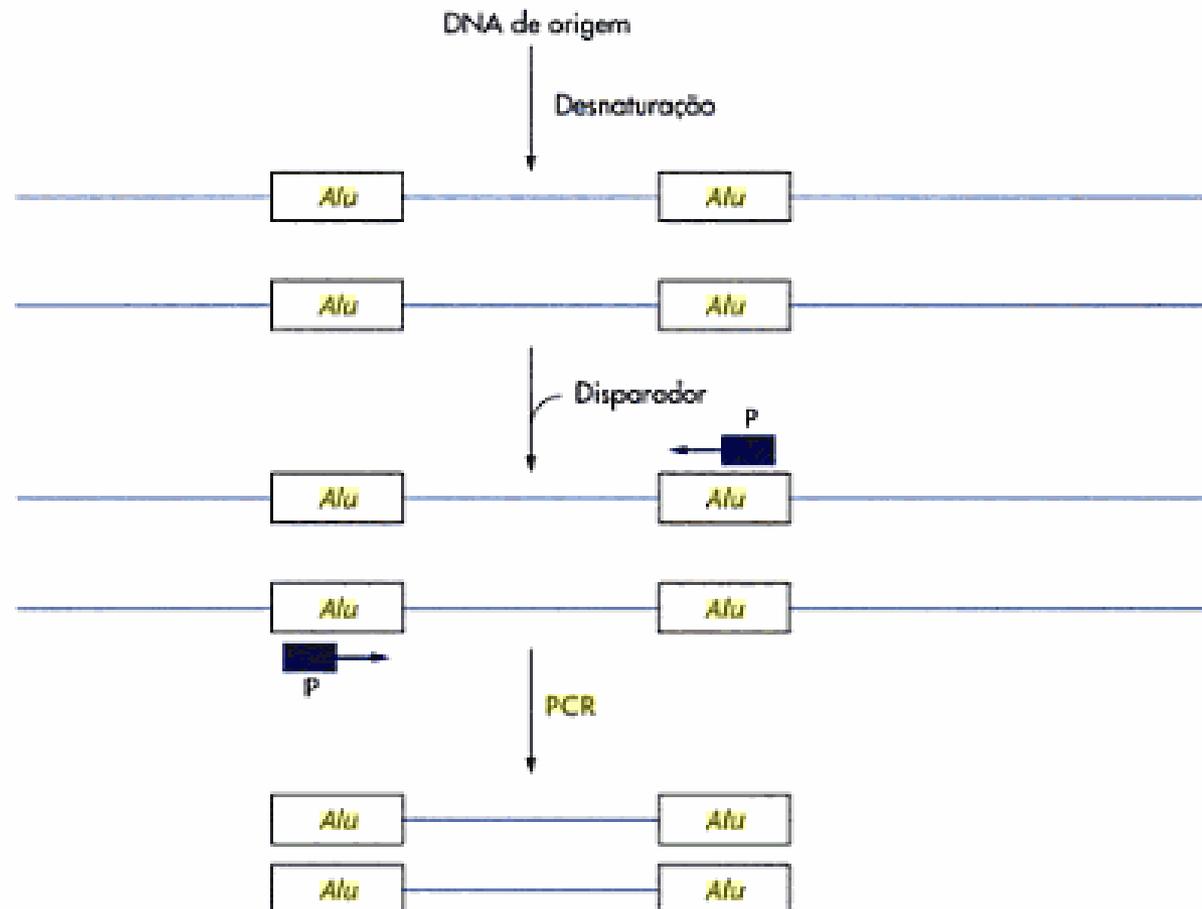
150 ng de  
DNA  
genômico



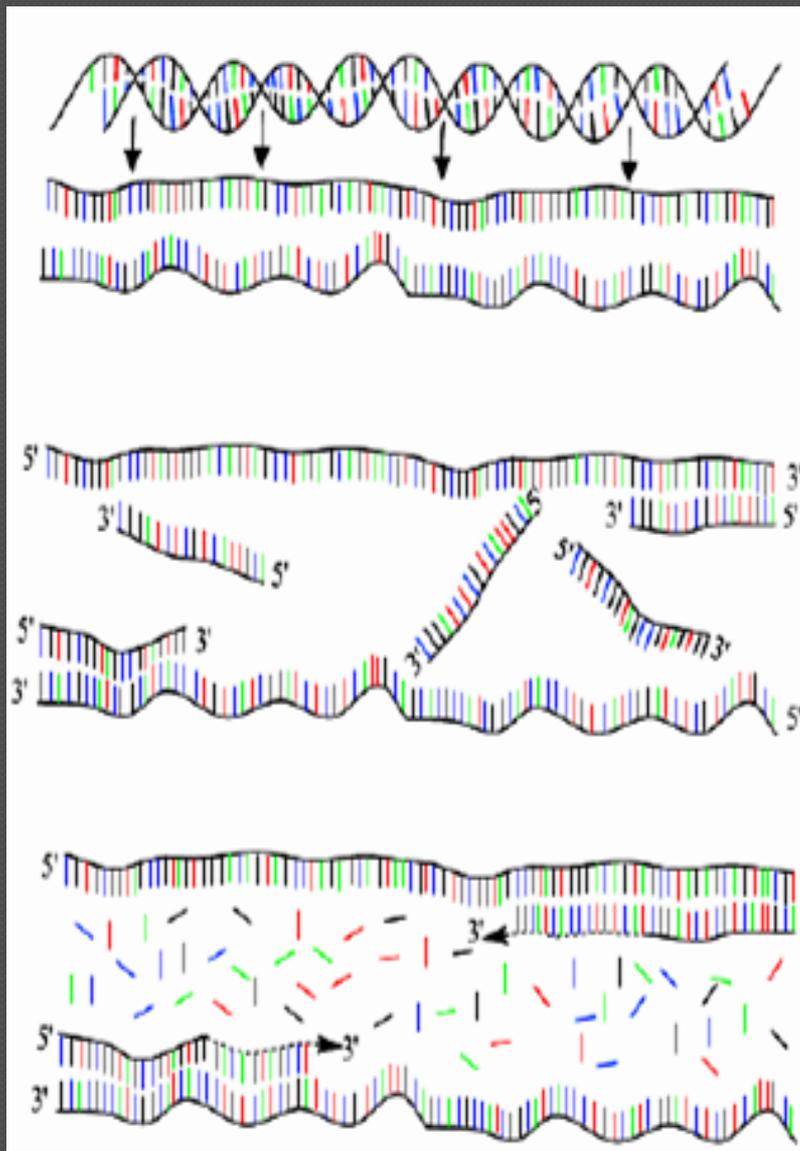
Amplificado  
num volume  
de 50 ul.

Verificar a concentração dos produtos amplificados em gel.  
Um bom rendimento da amplificação sobre 200ng/ul.

# Protocolo



**Figura 5.26** *Alu*-PCR. Uma amostra do DNA humano é desnaturada, misturada com um disparador *Alu* específico e submetida à reação em cadeia da polimerase (PCR). A seqüência entre cada par das seqüências *Alu* adequadamente orientadas é amplificada. A seta horizontal indica a direção da síntese do DNA a partir do grupo 3'-hidroxila do disparador (P).



## Desnaturação

5 minutos à 95°C

## Anelamento

1 min à 95°C

1 min à 65°C

x30

1 min à 72°C

## Extensão

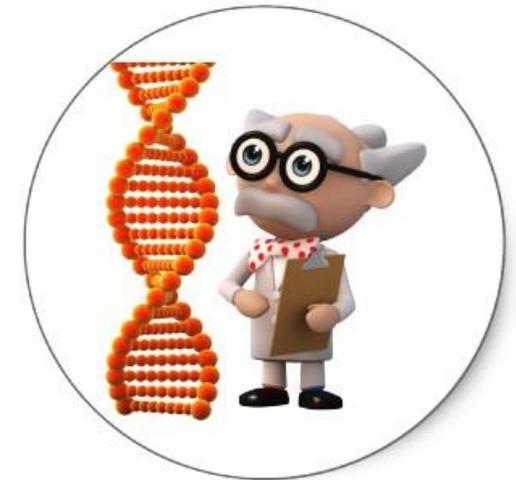
10 min à 72 ° C

## Vantagens

- Detecção de alterações genéticas
- Detectar a presença das sequências *Alu*

## Desvantagens

- Pouca especificidade





Genetics and Molecular Biology, 32, 1, 25-31 (2009)  
Copyright © 2009, Sociedade Brasileira de Genética. Printed in Brazil  
www.sbg.org.br

Research Article

## Estimating genomic instability mediated by *Alu* retroelements in breast cancer

Ana Cristina Fazza<sup>1</sup>, Flavia Cal Sabino<sup>1</sup>, Nathalia de Setta<sup>1</sup>, Newton Antonio Bordin Jr.<sup>2</sup>,  
Eloiza Helena Tajara da Silva<sup>3,4</sup> and Claudia Marcia Aparecida Carareto<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista "Júlio De Mesquita Filho", São José Rio Preto, SP, Brazil.

<sup>2</sup>Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

<sup>3</sup>Departamento de Biologia Molecular, Faculdade de Medicina, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

<sup>4</sup>Departamento de Genética e Biologia Evolucionária, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

### Abstract

*Alu*-PCR is a relatively simple technique that can be used to investigate genomic instability in cancer. This technique allows identification of the loss, gain or amplification of gene sequences based on the analysis of segments between two *Alu* elements coupled with quantitative and qualitative analyses of the profiles obtained from tumor samples, surgical margins and blood. In this work, we used *Alu*-PCR to identify gene alterations in ten patients with invasive ductal breast cancer. Several deletions and insertions were identified, indicating genomic instability in the tumor and adjacent normal tissue. Although not associated with specific genes, the alterations, which involved chromosomal bands 1p36.23, 1q41, 11q14.3, 13q14.2, occurred in areas of well-known genomic instability in breast and other types of cancer. These results indicate the potential usefulness of *Alu*-PCR in identifying altered gene sequences in breast cancer. However, caution is required in its application since the *Alu* primer can produce non-specific amplification.

**Key words:** *Alu*-PCR, breast cancer, gene insertions, gene deletions, invasive ductal carcinoma, recombination.

Received: February 18, 2008; Accepted: August 11, 2008.

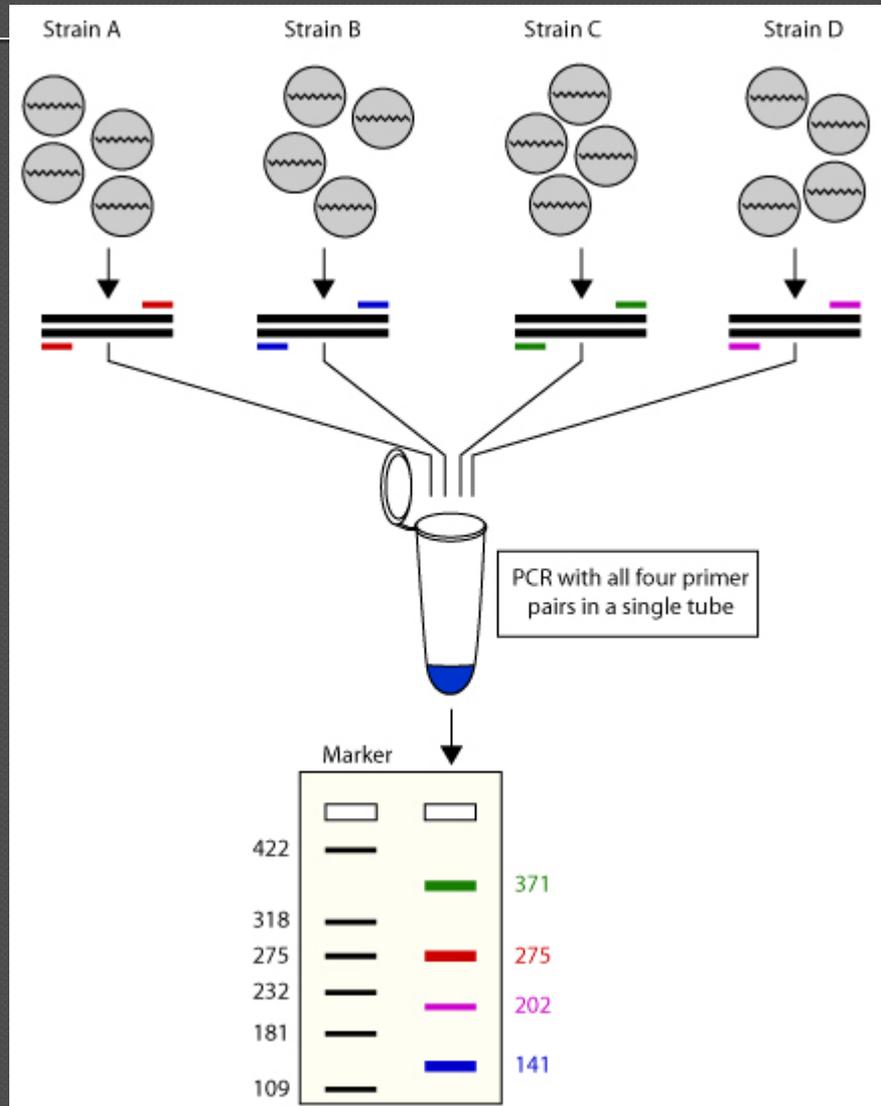
# Artigo - 2009

- Investigar a perda, ganho ou amplificação de seqüências gênicas no câncer de mama (entre elementos *alu*)
- 10 pacientes com câncer de mama
- Foram identificadas alterações tanto em amostras de tecidos tumoral quando no normal adjacente.

# Multiplex-PCR

Mais de um segmento genômico é amplificado numa única reação, cada um com seu par de primers específico.

Desde a sua primeira descrição(1988), tem sido aplicado em muitas áreas de teste de DNA, incluindo a análise de deleções, mutações e polimorfismos.



# Multiplex PCR

A concepção de conjuntos de primers específicos é essencial para uma reação multiplex com sucesso.

## 1. Comprimento dos Primers

É necessário que o iniciador seja concebido com comprimento apropriado. Pequeno comprimento (18-22 bases)

## 2. Temperatura de fusão

Primers com temperaturas semelhantes.

## 3. Especificidade

## 4. Evitar a formação de dímeros de *primers*

## **Vantagens:**

- Economia de tempo e trabalho;
- Redução do número de reagentes;
- Baixo custo.

## **Desvantagens:**

- Pouca sensibilidade de detecção;

---

# Aplicações

- Identificação de patógenos;
- Análise de Mutações;
- Análise de deleção do gene;
- Estudos forenses.

## PCR Multiplex para detecção dos principais herpesvírus neurológicos de ruminantes

[*Multiplex PCR for detection of Suid herpesvirus 1, Bovine herpesvirus 1, Bovine herpesvirus 5, Ovine herpesvirus 2*]

A.A. Fonseca Jr.<sup>1</sup>, E.A. Costa<sup>2</sup>, T.S. Oliveira<sup>2,3</sup>, E.B. Sales<sup>1</sup>, M.L. Sales<sup>1</sup>, R.C. Leite<sup>2</sup>,  
M. B. Heneimann<sup>2</sup>, J.K.P. Reis<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biologia Molecular - LANAGRO/MG - Pedro Leopoldo, MG

<sup>2</sup>Escola de Veterinária - Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte, MG

<sup>3</sup>Instituto Mineiro de Agropecuária - Belo Horizonte, MG

### RESUMO

Desenvolveu-se uma PCR multiplex (mPCR) para diagnóstico diferencial de encefalite bovina causada por herpesvírus suíno 1 (SuHV-1), herpesvírus bovino 1 (BoHV-1), herpesvírus bovino 5 (BoHV-5) e herpesvírus ovino 2 (OvHV-2). Os iniciadores foram projetados após alinhamento de sequências disponíveis no banco de genomas (GenBank) e a reação foi padronizada levando-se em consideração a concentração dos reagentes e os tipos diferentes de DNA polimerase. Após determinação da especificidade e sensibilidade, 65 amostras de encéfalo de bovinos com síndrome neurológica foram submetidas à análise. A sensibilidade analítica para detecção de BoHV-1, BoHV-5 e SuHV-1 foi, respectivamente,  $10^{1,2}$  TCID<sub>50</sub>/50µL,  $10^{1,0}$  TCID<sub>50</sub>/50µL,  $10^{1,3}$  TCID<sub>50</sub>/50µL na reação multiplex. Das 65 amostras analisadas, 10 foram positivas para BoHV-5, uma para BoHV-1 e cinco para OvHV-2. A mPCR descrita neste trabalho mostrou-se uma técnica útil para o diagnóstico diferencial de enfermidades relacionadas ao sistema nervoso central de bovinos.

Palavras-chave: PCR, encefalite, herpesvírus

Desenvolveram uma PCR multiplex (mPCR) para diagnóstico diferencial de encefalite bovina causada por herpesvírus suíno 1 (SuHV-1), herpesvírus bovino 1 (BoHV-1), herpesvírus bovino 5 (BoHV-5) e herpesvírus ovino 2 (OvHV-2).

Os iniciadores foram projetados após alinhamento de sequências disponíveis no banco de genomas (GenBank) e a reação foi padronizada levando-se em consideração a concentração dos reagentes e os tipos diferentes de DNA polimerase.

Utilizaram 65 amostras de encéfalo de bovinos com síndrome neurológica para a análise.

Das 65 amostras analisadas, 10 foram positivas para BoHV-5, uma para BoHV-1 e cinco para OvHV-2.

A mPCR mostrou-se uma técnica útil para o diagnóstico diferencial de enfermidades relacionadas ao sistema nervoso central de bovinos.

# RAPD – PCR

- Técnica que é uma variação do protocolo da PCR convencional;

## Diferenças:

- RAPD não exige conhecimento prévio da sequência que se quer amplificar, já a PCR convencional requer conhecimento prévio.
- RAPD utiliza um *primer* curto de sequência aleatória (até 10 pares de base), a PCR convencional utiliza um par de primers específicos (20 a 30 pares de bases).
- Temperatura de anelamento (RAPD 36°C E PCR 50 - 54°C).

# RAPD - PCR

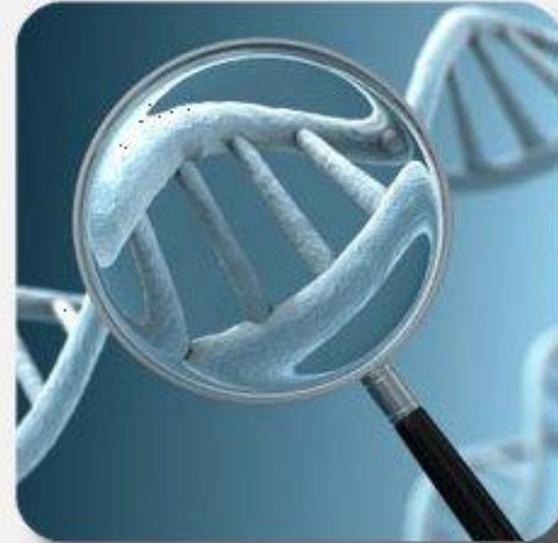
---

- Amplificação de DNA polimórfico ao acaso;

- Sequência alvo desconhecida.

# Polimorfismos

- Inserções;
- Deleções;
- Substituição de nucleotídeos.



# Componentes da Reação

- DNA molde;
- Oligonucleotídeos;
- dNTP's;
- DNA polimerase;
- $MgCl_2$ ;
- Tampão;
- Água;
- Termociclador.



# **Etapas da técnica de RAPD:**

---

- 1) Extração de DNA;**
- 2) Quantificação de DNA extraído;**
- 3) Padronização da concentração de DNA para PCR;**
- 4) Reação de PCR;**
- 5) Eletroforese;**
- 6) Coloração e visualização das bandas.**

# Temperatura:

---

- Desnaturação do DNA – 60 segundos à 94°C
- Anelamento – 60 segundos à 36°C
- Extensão (DNA polimerase) – 120 segundos à 72°C

# Amplificação

---

- Sequências de DNA complementares ao *primer* estejam suficientemente próximas;

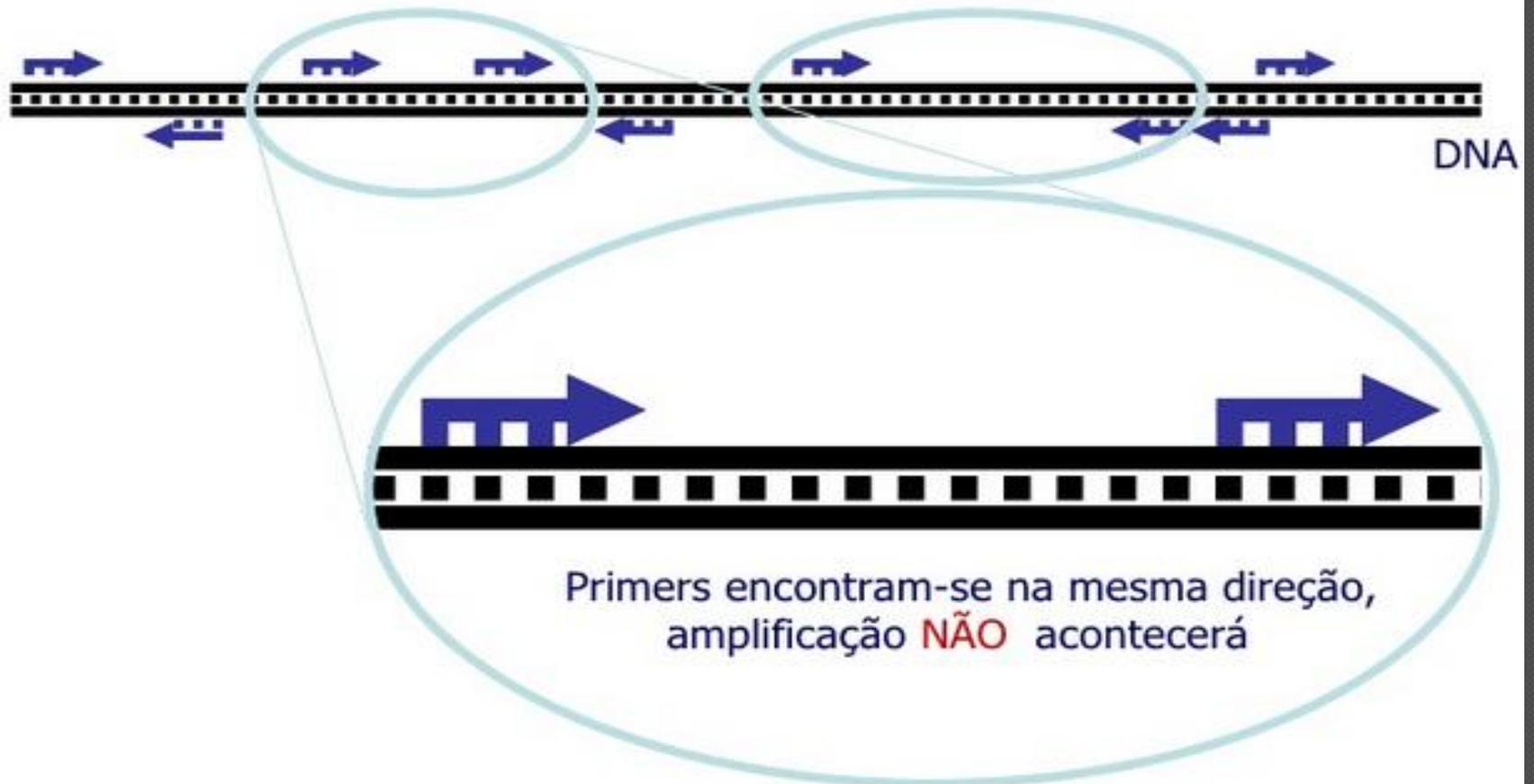


- Encontro dos primers em direção oposta;



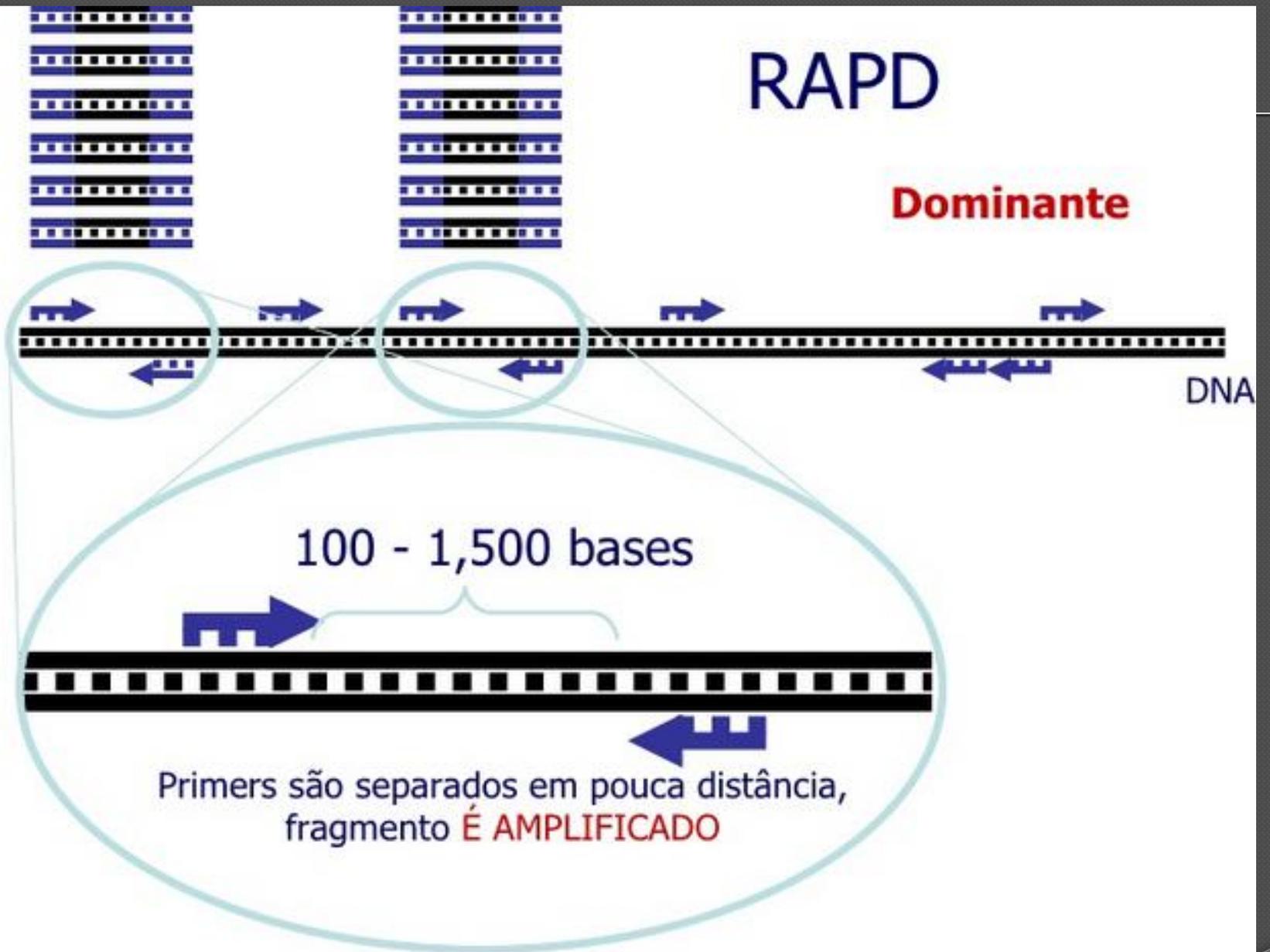
**Amplificação**

- **Primer se anela a muitos locais no DNA**
- **Quando primer se anela em direção oposta – amplificação**



# RAPD

**Dominante**

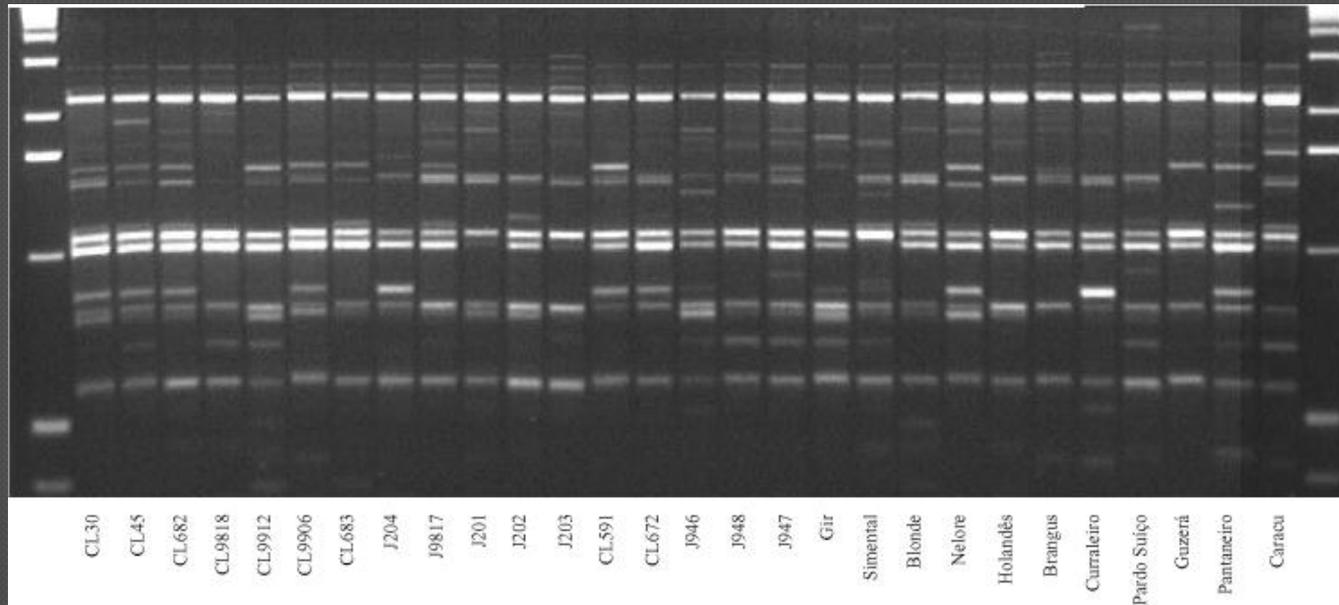


Grande quantidade de DNA produzido -> banda no gel de eletroforese.

Eletroforese -> gel de agarose -> brometo de etídio sob luz ultra violeta.

Géis de poliacrilamida -> nitrato de prata.

Cada primer aleatório -> síntese de vários segmentos de DNA simultaneamente em diversos pontos do genoma -> várias bandas no gel.



**Figura 1.** Eletroforese de fragmentos RAPD (primer OPJ7) obtidos pela amplificação das 28 amostras de DNA dos bovinos utilizados no trabalho, conservados na Fazenda Sucupira, Brasília.

## Vantagens:

---

- Simplicidade e rapidez;
- Não exige conhecimento prévio da sequência a ser amplificada;
- Baixo custo.

## Desvantagens:

- Reprodutibilidade;
- Baixo conteúdo de informação genética por loco por ser dominante.

---

## **Aplicações:**

- Estudos de espécies desconhecidas geneticamente;
- Estabelecimento de relacionamentos filogenéticos entre diferentes espécies;
- Construção de mapas genéticos de alta cobertura genômica.

## APLICABILIDADE DA TÉCNICA PCR-RAPD PARA A DETERMINAÇÃO DO PERFIL GENOTÍPICO DE VARIEDADES DE ROMÃ (*Punica granatum*)

Edna Maria Morais Oliveira<sup>1</sup>, Ivanilda Santos de Lima<sup>2</sup>, Barbara Torres Carneiro<sup>3</sup>, Regina Isabel Nogueira<sup>4</sup>, Otniel Freitas-Silva<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Pesquisadores da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Laboratório de Diagnóstico Molecular e Micologia, edna@ctaa.embrapa.br; ofreitas@ctaa.embrapa.br

<sup>2</sup> Nutricionista, bolsista CNPq/DTI-3 da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Laboratório de Diagnóstico Molecular e Micologia, ivanildalima@gmail.com

<sup>3</sup> Estudante de Ensino Médio do Colégio de Aplicação Emmanuel Leontisínis, estagiário da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Laboratório de Diagnóstico Molecular e Micologia, barbaracarneiro13@gmail.com

<sup>4</sup> Pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Planta Piloto de Operações Unitárias I, nogueira@ctaa.embrapa.br

**Resumo:** A romã (*Punica granatum*) é uma fruta originária do Oriente Médio e cresce em regiões de clima árido, com histórico de uso medicinal. A fruta apresenta sementes revestidas por uma polpa avermelhada (granada) onde estão presentes os compostos fenólicos, principalmente as antocianinas. Atualmente, é considerada uma importante fruta comercial largamente cultivada no Norte da África, no Mediterrâneo e Oriente Médio. As formas de consumo podem ser a granada fresca, como componente de saladas ou sobremesa, suco, geleia, aromatizante e corante na composição de outros

Foi feita uma extração de DNA (polpa e casca) usando o kit DNeasy (Qiagen) e o método CTAB, e em seguida foi realizada a genotipagem usando a técnica PCR-RAPD;

A genotipagem (PCR-RAPD) foi conduzida usando os *primers* OPW1 e OPW2. Os resultados obtidos mostraram que o DNA da polpa isolado com o método CTAB, usado na reação com OPW2, foi o que apresentou o perfil mais definido, com possibilidade de ser usado em análises posteriores de similaridade genética/filogenia.

Os resultados mostraram que a técnica PCR-RAPD é aplicável para a análise da similaridade/diversidade genética de variedades comerciais de romã.

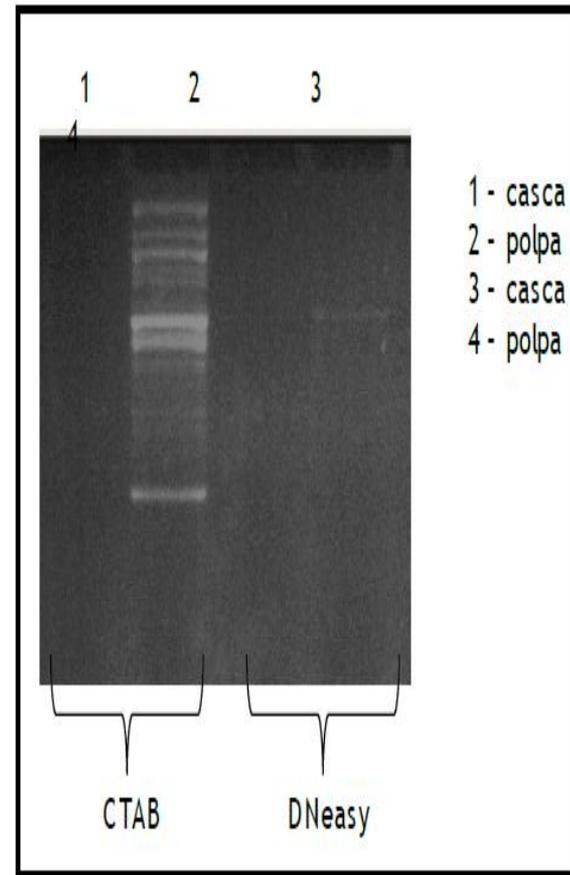


Figura 1: Perfil de bandejamento como resultado da PCR-RAPD do DNA de polpa e casca de romã usando os *primers* decâmicos OPW1 e OPW2.

# Referências

---

- <http://www.lfdgv.ufsc.br/MARCADORES%20MOLECULARES-pratica.pdf>
- <http://www.slideshare.net/AdrianaDantas2/marcadores-moleculares-em-plantas>
- <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/935878>
- <http://www.unorp.br/asp/..%5Crevista%5CsaudeI%5C7.pdf>
- <http://www.scielo.br/pdf/gmb/v32n1/2008-042.pdf>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7584997>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7583/>
- <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0531556501001127>

A hand is holding a glowing blue, rectangular device, possibly a handheld scanner or a specialized display. The device's screen shows a red grid pattern, resembling a barcode or a data matrix. The entire scene is bathed in a deep blue light, creating a futuristic and high-tech atmosphere. The hand is positioned on the left side of the frame, with the thumb and index finger gripping the device. The background is dark, making the glowing elements stand out prominently.

**OBRIGAD  
A!**