

Universidade Federal de Pelotas

Vinicius Almeida e Rodolfo Baldinotti

Biologia Molecular

REP-PCR, INVERSE-PCR E VECTORETTE-PCR

Pelotas, fevereiro de 2013

× Uso de outros PCRs:

Convencional:

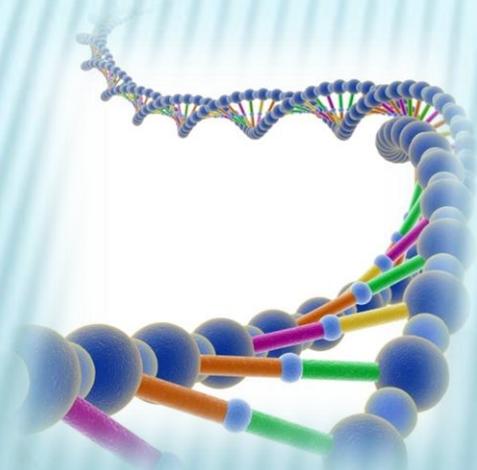
- Baixo custo
- Apresentação comum
- Facilidade de aquisição
- Grande aplicabilidade

Alternativo:

- Custo elevado
- Aprimoramento
- Compostos diferenciados
- Especificidade

REP-PCR (REPETITIVE SEQUENCE BASED-PCR)

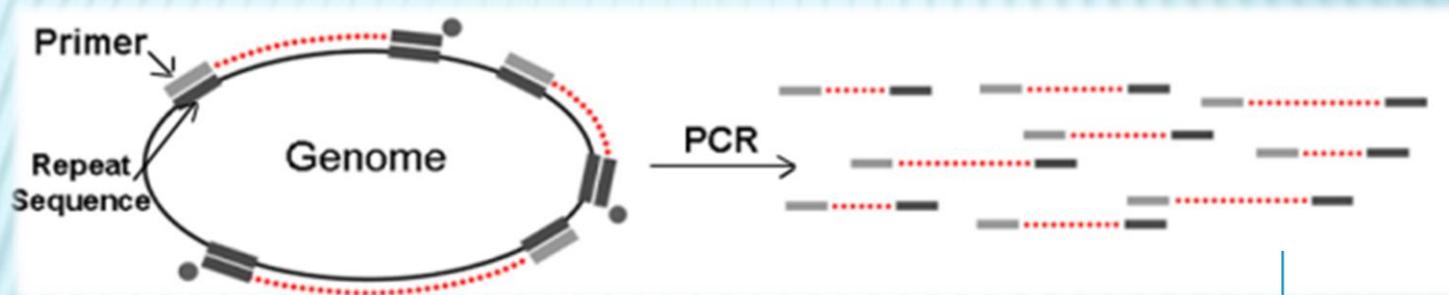
A técnica Rep-PCR faz uso de sequências oligonucleotídicas iniciadoras complementares de sequências de DNA repetitivas presentes em numerosas cópias no genoma da maioria das bactérias Gram negativas e de várias bactérias Gram positivas.



Foram identificadas três famílias de sequências repetitivas:

- as sequências REP (Repetitive Extragenic Palindromic elements) com 35-40 pares de bases, as quais são conservadas em várias espécies bacterianas;
- as sequências ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus elements) de 124-127 pares de bases, as quais contêm um elemento repetitivo central invertido altamente conservado e que estão localizados em regiões intergênicas.
- o elemento BOX de 154 pares de bases.

A técnica consiste no anelamento dos primers nessas regiões descritas anteriormente, amplificando a região desconhecida entre elas.



Formação de fragmentos

- Separação dos fragmentos por tamanho e carga (eletroforese);
- Análise dos dados;
- Criação de gráficos;
- Armazenamento da informação.

Dendograma de *S. aureus*

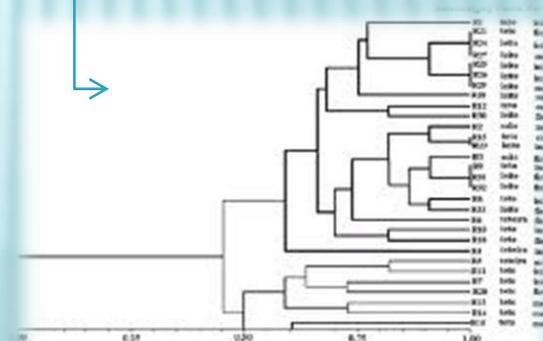
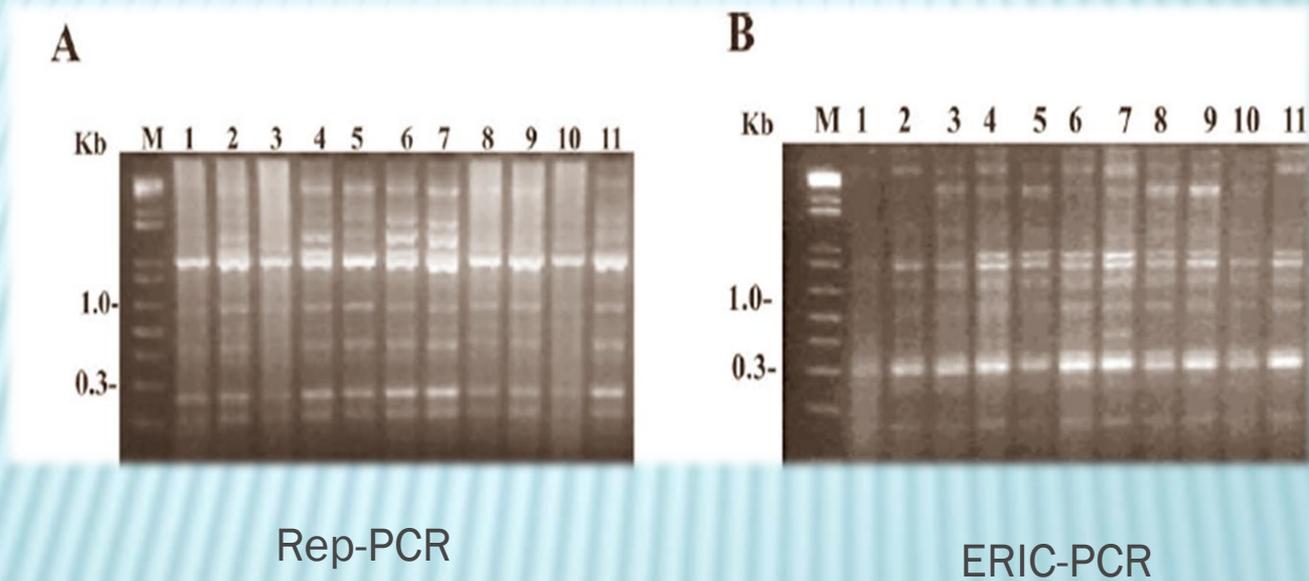


Figura 2.1 - Dendrograma gerado a partir dos dados obtidos do sequenciamento de S. aureus. Os valores de cima a direita...

Eletroforese de REP-PCR para a identificação de sorovares de *Xanthomonas axonopodis*.



POR QUE USÁ-LO?

É um método de PCR que visa classificar as bactérias segundo sua “tipagem genômica”. O método de tipagem designado por rep-PCR é extremamente viável, reprodutível e rápido. Esta técnica tornou-se uma ferramenta valiosa na identificação e classificação de bactérias e em estudos epidemiológicos.

Aplicação da técnica de REP – PCR no rastreamento de *Staphylococcus aureus* em sala de ordenha, para o monitoramento da qualidade do leite

O método referido como REP-PCR, “impressão digital” do genoma, uma técnica baseada na amplificação do DNA, é tida como uma técnica extremamente confiável, reproduzível, rápida e altamente discriminatória^{6,4}. Esta técnica faz uso de primers de DNA complementares àqueles de ocorrência natural, altamente conservados, com seqüências repetitivas de DNA e presente em múltiplas cópias do genoma da maioria das bactérias Gram negativas e em muitas bactérias Gram positivas⁷. As identidades genômicas geradas pela técnica de REP-PCR permite a diferenciação em nível de espécies, subespécies e cepa⁸.

Dentre os microrganismos Gram positivos, os *Staphylococcus* destacam-se como importante grupo, cuja presença se faz observar sobretudo na pele e mucosas do homem estendendo-se, de forma generalizada, a animais de sangue quente^{9,10,11,12}.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a técnica de REP-PCR no monitoramento da qualidade do leite de vacas, através do rastreamento de *Staphylococcus aureus* na linha de produção de leite, avaliando as mãos dos ordenhadores, teteiras, úbere dos animais e leite in natura como veículos de contaminação.

Grifar as partes importantes.

Posição no gel (canaleta)	Amostra coletada	Origem da amostra
1	1	Leite início ordenha
9	12	Leite meio ordenha
19	21	Teteira 1
16	25	Mão D ordenhador
18	26	Mão E ordenhador

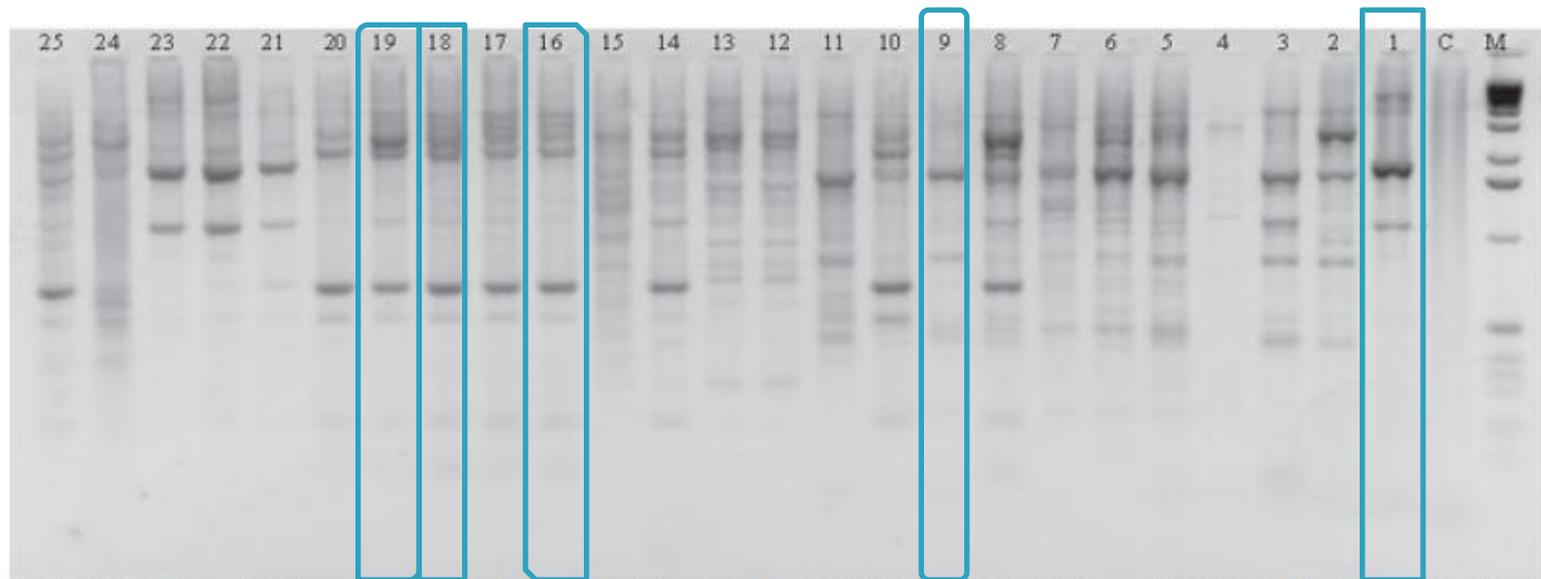


Figura 1a- Gel de agarose com os produtos de REP-PCR gerados a partir de amostras coletadas na Fazenda A. Amostras de 1 a 25 (diferentes origens, consultar Tabela 1), C = controle negativo e M = marcador molecular (1 Kb)

Conclusões:

No presente estudo, a técnica mostrou ser eficiente para a análise da similaridade entre indivíduos da mesma espécie, no caso, *Staphylococcus aureus*. A técnica poderá vir a ser mais explorada para estudos de epidemiologia molecular como este, pois mostrou ser uma ferramenta útil para investigação de falhas no manejo e, para

elaboração de métodos de controle mais eficientes para evitar e/ou diminuir a disseminação de microrganismos causadores de sérias enfermidades em humanos e em animais, que podem ser transmitidas através de produtos como o leite e seus derivados.

REFERÊNCIAS:

- Análise da diversidade genética de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* do algodoeiro. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-54052009000200004
Acesso em 3 fev. 2013
- Aplicação da técnica de REP – PCR no rastreamento de *Staphylococcus aureus* em sala de ordenha, para o monitoramento da qualidade do leite. Disponível em: <http://www.revistasusp.sibi.usp.br/pdf/bjvras/v43n3/04.pdf>
Acesso em 3 fev. 2013
- Tipagem genética de micro-organismos. Disponível em:
<http://www.cesam.ua.pt/files/Manual%20Metodos%20de%20Tipagem.pdf> Acesso em 3 fev. 2013
- Técnicas de tipagem baseada em PCR. Disponível em: <http://www.e-escola.pt/topico.asp?id=403&ordem=4>
Acesso em 3 fev. 2013

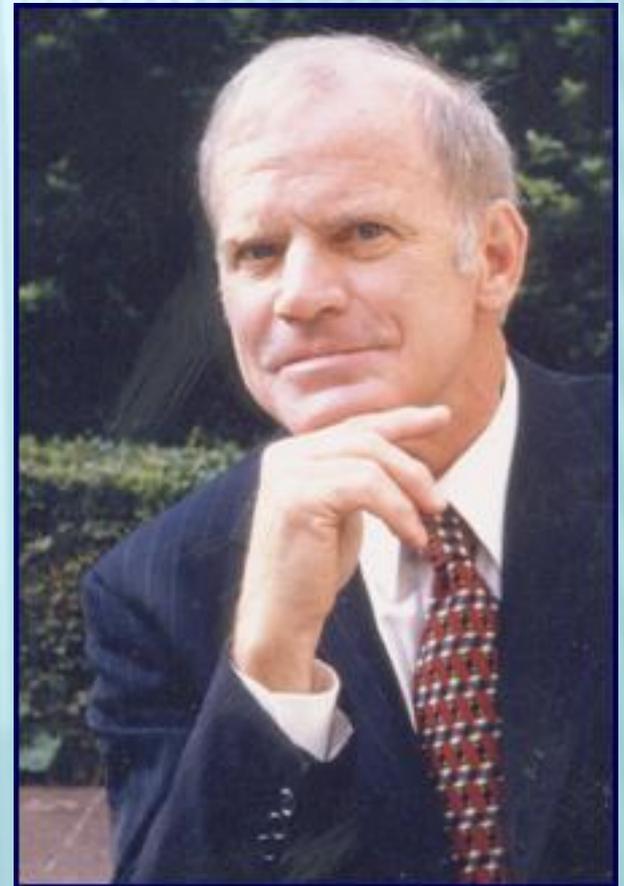
Giovanni Degrazia

Natã Machado

REP-PCR, INVERSE-PCR E VECTORETTE-PCR

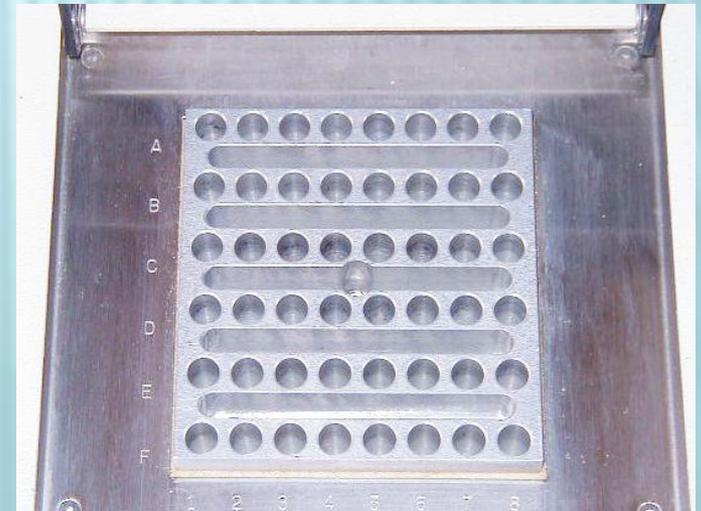
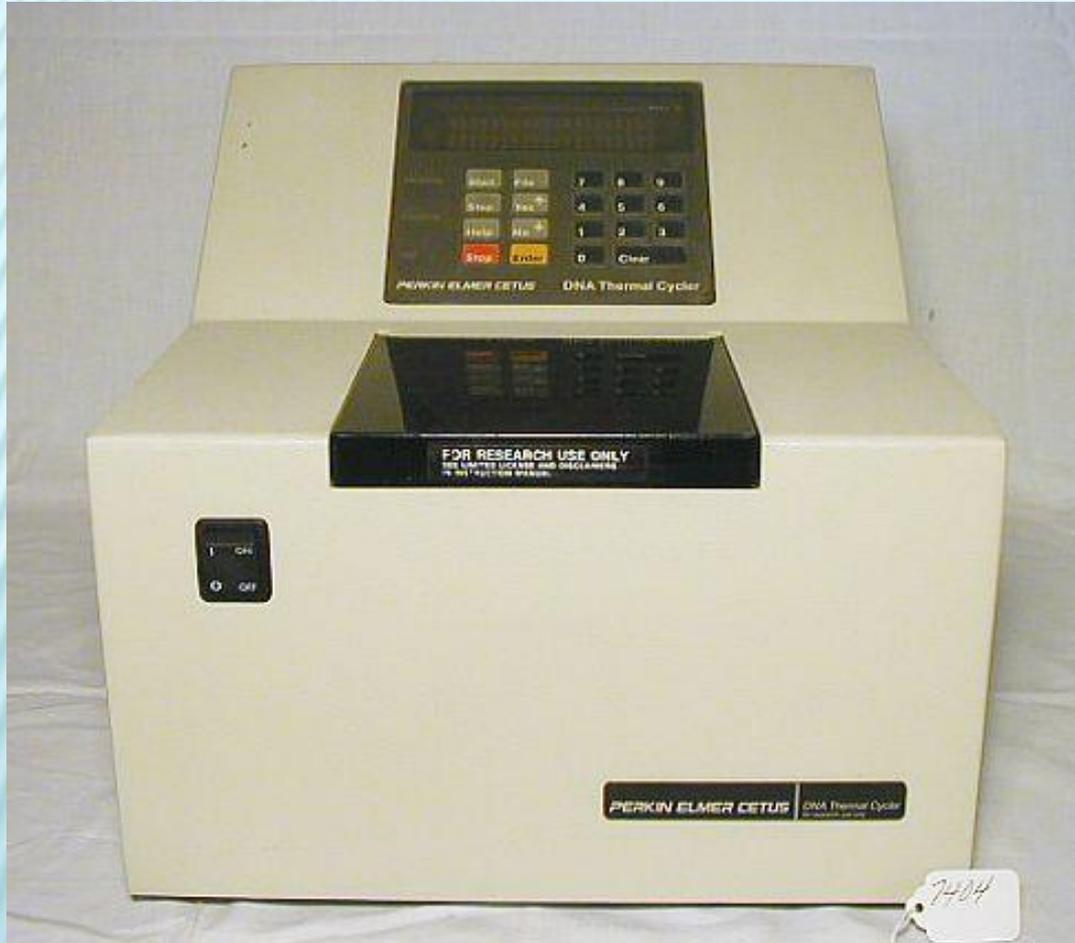
PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)

- × Desenvolvida por Saiki e principalmente por Mullis.



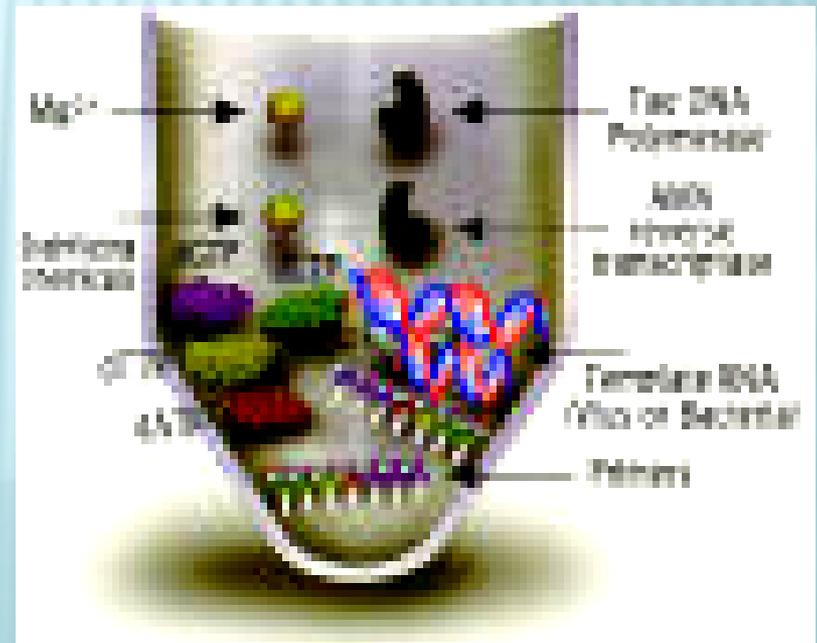
Kary Banks Mullis

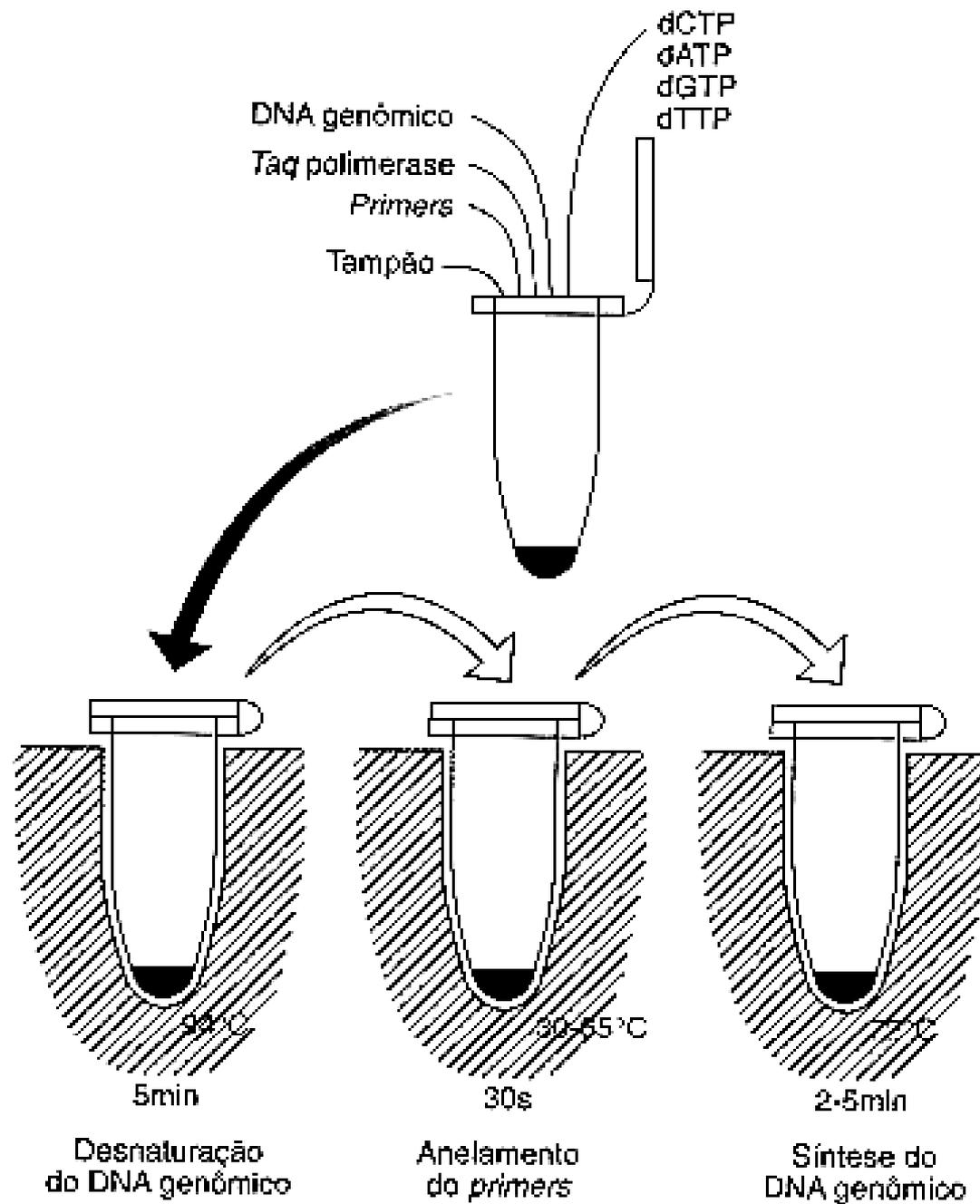
DNA THERMAL CYCLER (1989)



Componentes da reação

- DNA molde
- Oligonucleotídeos (primer)
- dNTP's
- DNA Polimerase
- Magnésio
- Tampão
- Água





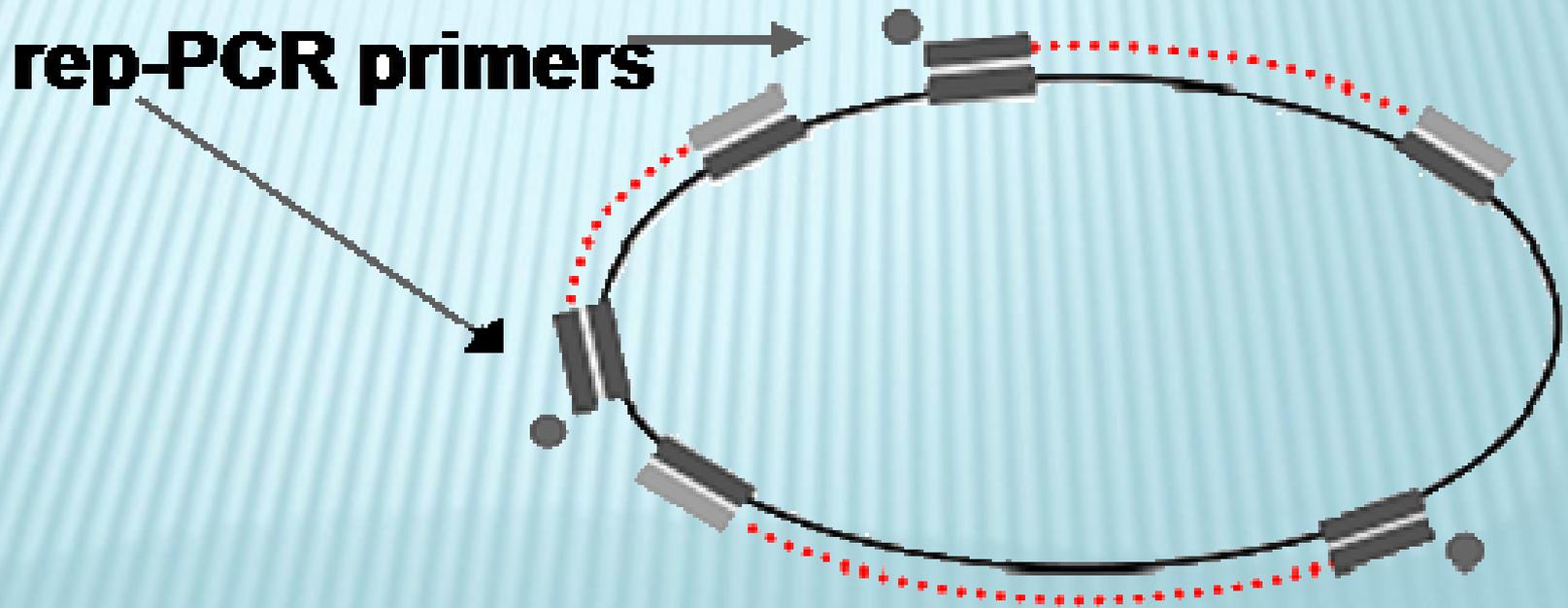
REP PCR

(REPETITIVE EXTRAGENIC PALINDROMIC SEQUENCE-BASED PCR)

- × Método que utiliza uso de sequências oligonucleotídicas iniciadoras complementares de sequências de DNA repetitivas muito conservadas e presentes em numerosas cópias no genoma de alguns microrganismos.

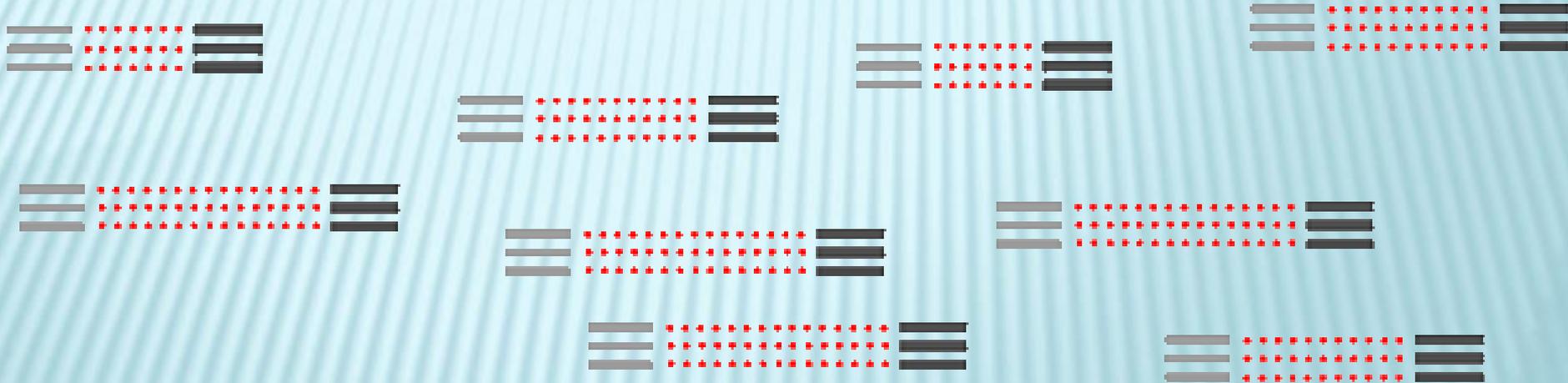
REP PCR

- × 1. Primers específicos se ligam a muitas sequências repetitivas dispersas por todo o genoma.



REP PCR

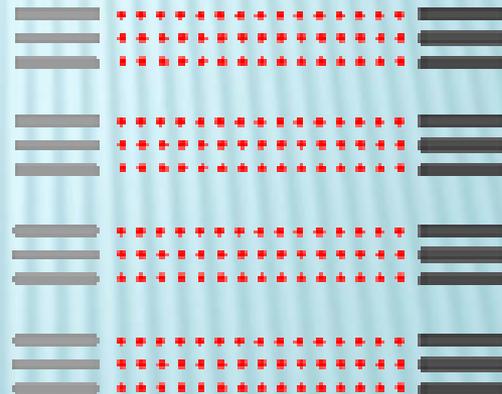
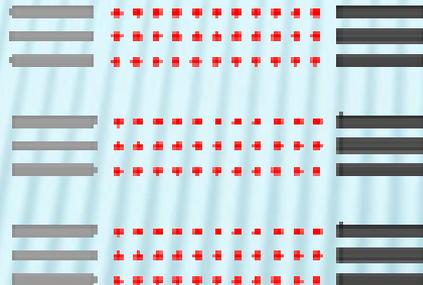
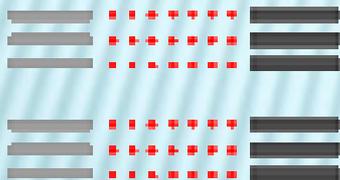
- × 2. Fragmentos múltiplos de diferentes comprimentos são amplificados.



REP PCR

- 3. Os fragmentos podem ser separados em massa e carga através de eletroforese.

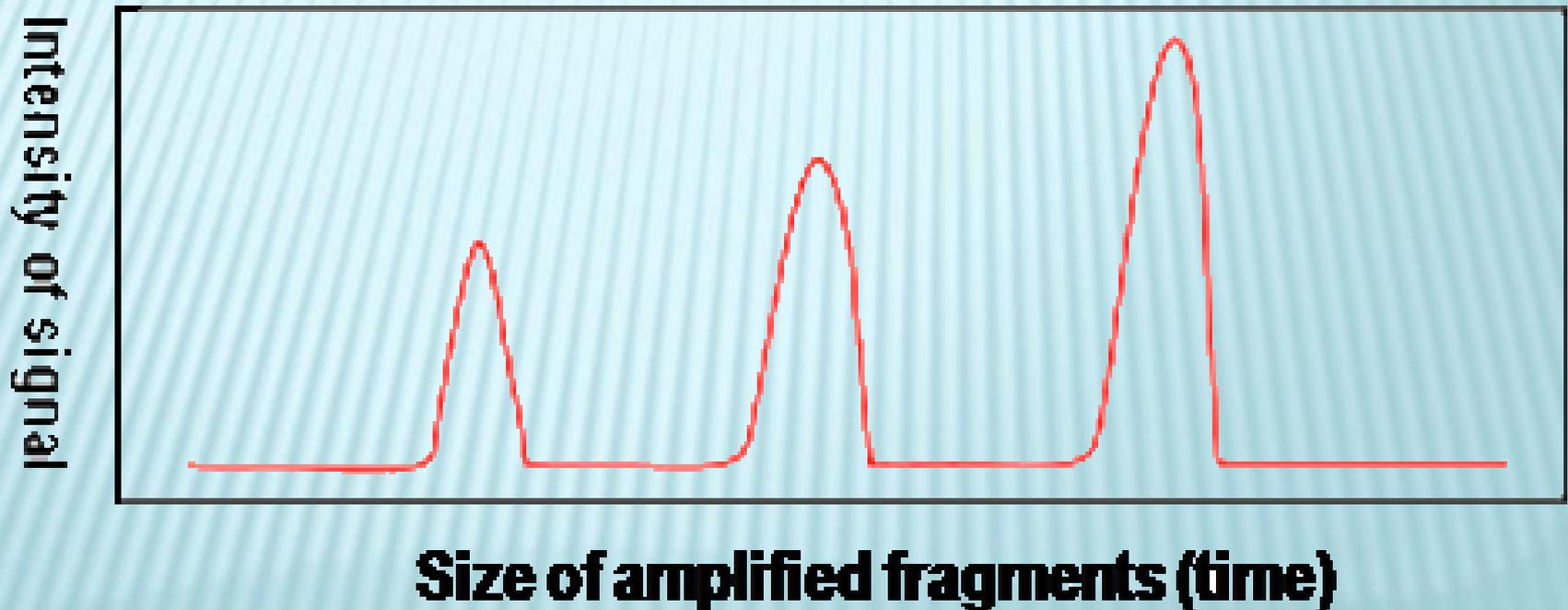
(+)



(-)

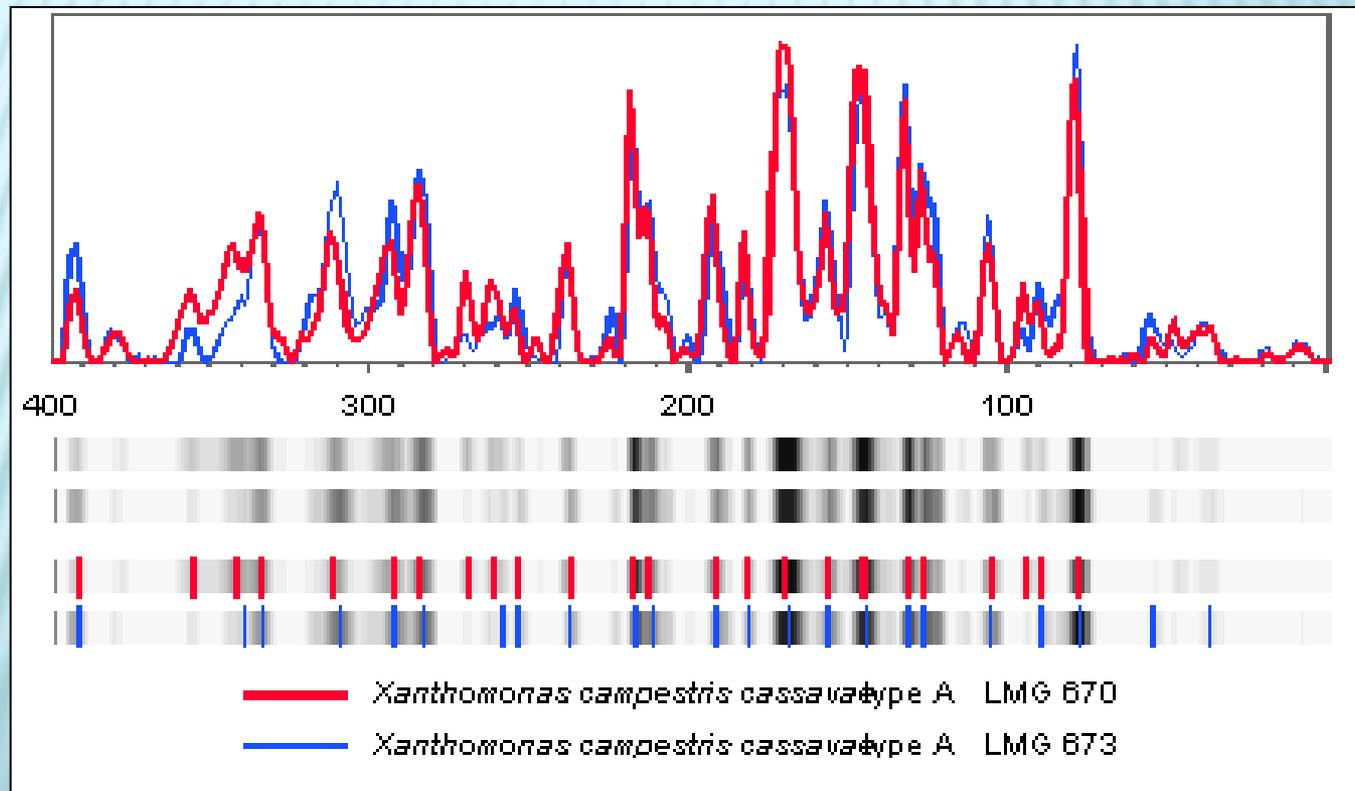
REP PCR

- × 4. A partir da intensidade variável das várias bandas é criado um perfil de impressão único.

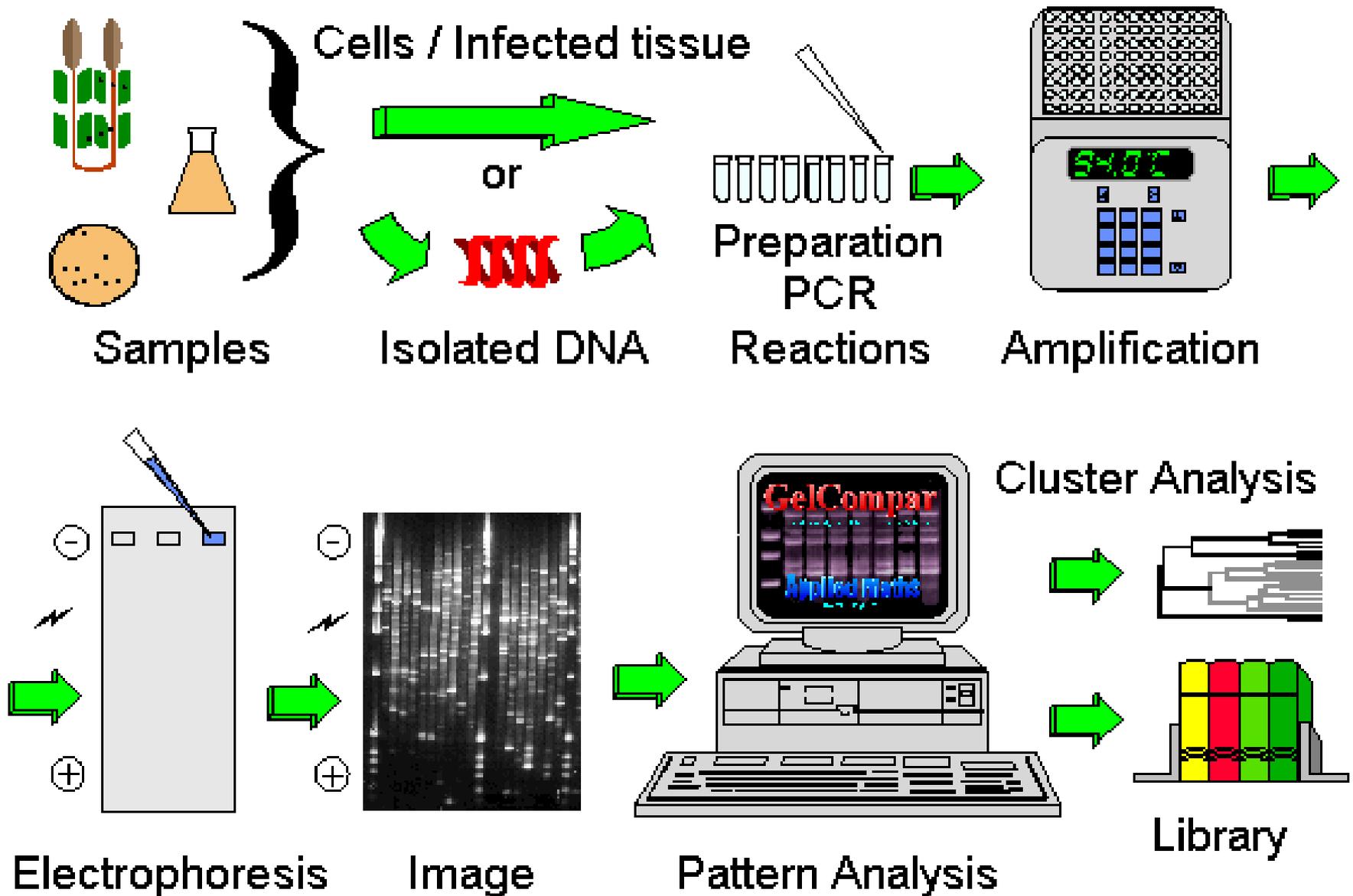


REP PCR

- × 5. A discrepância da linearidade dos fragmentos se traduz em diferentes subespécies.



rep-PCR genomic fingerprinting protocol



FAMÍLIAS DE REP

- × as sequências REP (Repetitive Extragenic Palindromic elements) com 35-40 pares de bases.
- × as sequências ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus elements) de 124-127 pares de bases.
- × o elemento BOX de 154 pares de bases.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU**

**AVALIAÇÃO DA AGRESSIVIDADE E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA
DE LINHAGENS DE *Ralstonia solanacearum* ISOLADAS DE
DIFERENTES PLANTAS HOSPEDEIRAS**

LUCAS MATEUS RIVERO RODRIGUES

OBJETIVO

- × O trabalho teve como objetivo avaliar a agressividade de linhagens de *Ralstonia solanacearum* provenientes de solanáceas, plantas ornamentais e eucalipto, em plantas de batata, tomate e fumo, bem como caracterizar as linhagens por meio de técnicas moleculares.

EMPREGO DO REP-PCR E CONCLUSÃO

- × Foi efetuado ensaio de microbiolização *in vitro* em sementes de eucalipto, a fim de se identificar possíveis linhagens patogênicas a esta espécie vegetal e concluiu-se que todas as linhagens utilizadas infectaram plantas de eucalipto ou afetaram seu crescimento. A caracterização molecular de 41 linhagens de *Ralstonia solanacearum*, provenientes de diversas plantas hospedeiras, incluindo solanáceas, bananeira, helicônia, plantas ornamentais e eucalipto, foi efetuada empregando-se ERIC e BOX-PCR e as

COLÔNIAS DE *R. SOLANACEARUM* EM MEIO DE CULTURA TZC



ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA POR ERIC E BOX-PCR

- × Foram utilizados aproximadamente 150 ng de DNA de cada amostra em reações nos experimentos de diversidade genética por ERIC-PCR e BOX-PCR com volume final de 25 μ L.

PROTOCOLO PARA OS PRIMERS ERIC-PCR

- × 2,5U de enzima Taq polimerase Fermentas por reação, 1X tampão de reação da enzima contendo KCl 50mM, 0,2 mM de dNTPs, 0,8 uM de cada primer e 3,0 mM MgCl₂. O programa de amplificação das amostras consistiu de um ciclo de desnaturação inicial a 95 °C/7 min.; seguido de 30 ciclos a 94 °C/1 min; 53 °C/1 min e 65 °C/8 min; e um ciclo de extensão final a 65 °C/16 min.

PROTOCOLO PARA OS PRIMERS BOX-PCR

- × 2,5 U de enzima Taq polimerase Fermentas por reação, 1X tampão de reação da enzima, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 μ M do primer e 1,5 mM MgCl₂. O programa de amplificação das amostras consistiu de um ciclo de denaturação inicial a 95 °C/7 min; seguido de 30 ciclos a 94 °C/1 min; 52 °C/1 min e 65 °C/8 min; e um ciclo de extensão final a 65 °C/15 min.

TABELA COM OS PRIMERS UTILIZADOS NA TESE.

Tabela 6. Seqüência dos *primers* utilizados, nas reações de BOX e ERIC-PCR

Código	Seqüência do <i>primer</i> (5' → 3')	No. nucleot.	Especificidade
ERIC1R	ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C	22	<i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequence</i>
ERIC2	AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G	22	<i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequence</i>
BOX A1R	CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G	22	Elementos Box

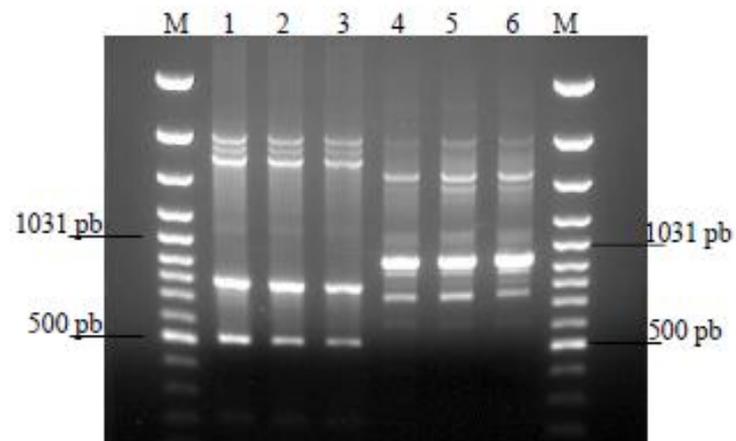


Figura 3. Produtos da amplificação do DNA de linhagens de *R. solanacearum* utilizando-se o primer BOX A1R (M) marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas), (1) IBSBF 1708, (2) IBSBF 1711, (3) IBSBF 1712, (4) IBSBF 1839, (5) IBSBF 1882 e (6) IBSBF 1883.

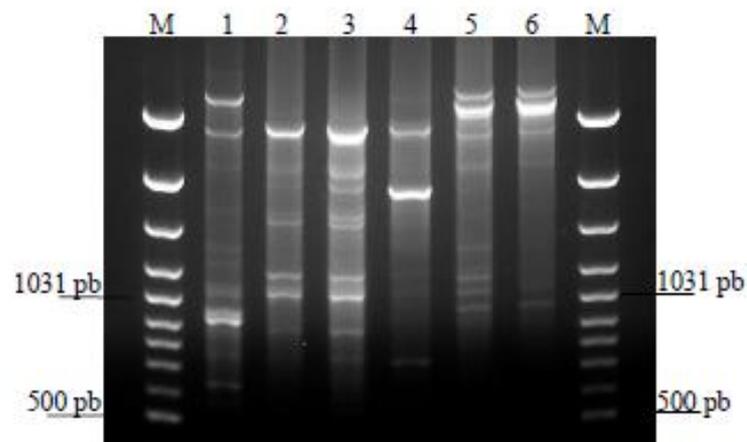


Figura 4. Produto da amplificação do DNA de diferentes linhagens de *R. solanacearum* isoladas de *Eucalyptus* sp. por iniciador de BOX AR1, (M) marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas), (1) IBSBF 2133, (2) IBSBF 2525, (3) IBSBF 2526, (4) IBSBF 2548, (5) IBSBF 2568 e (6) IBSBF 2576.

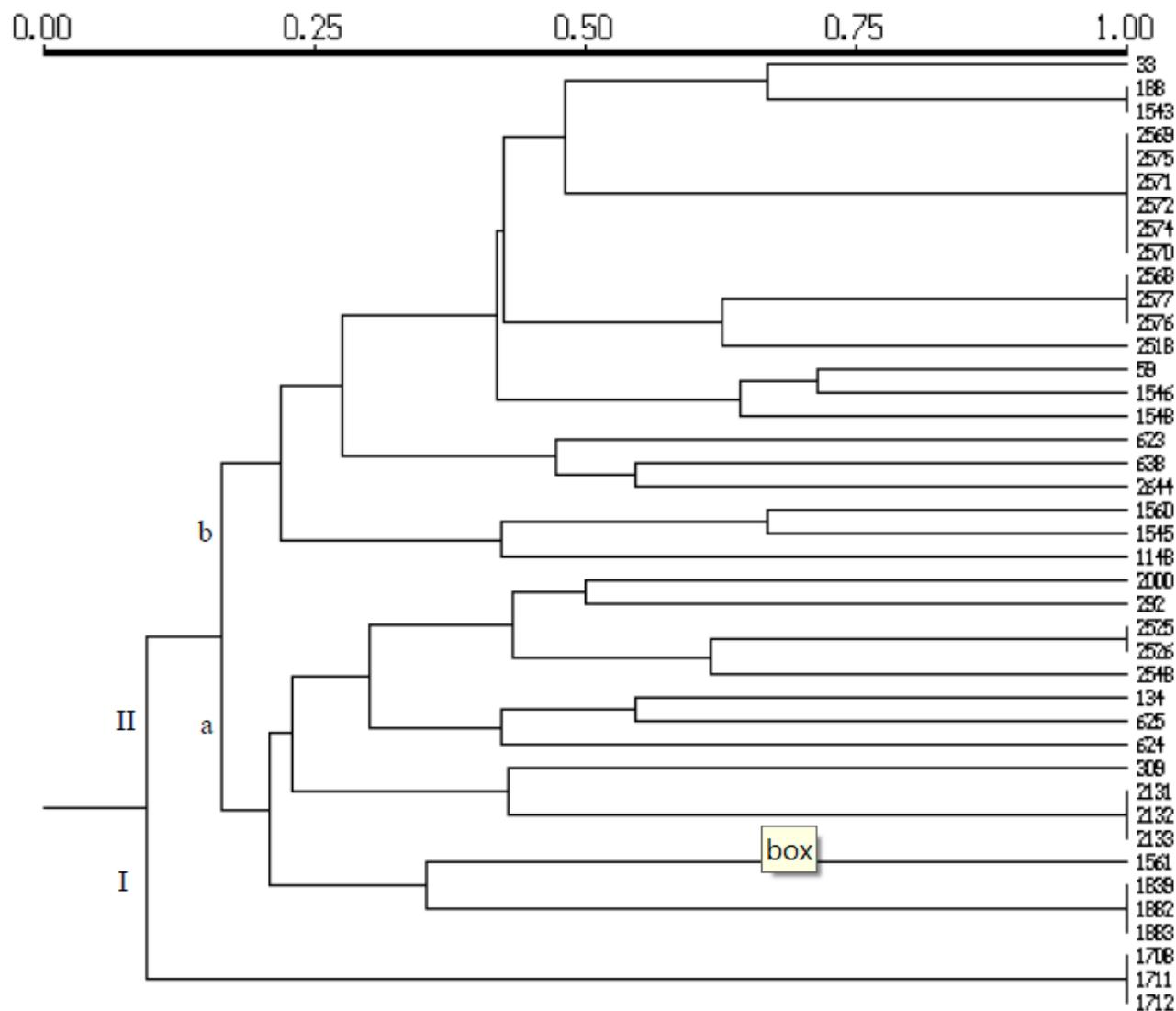


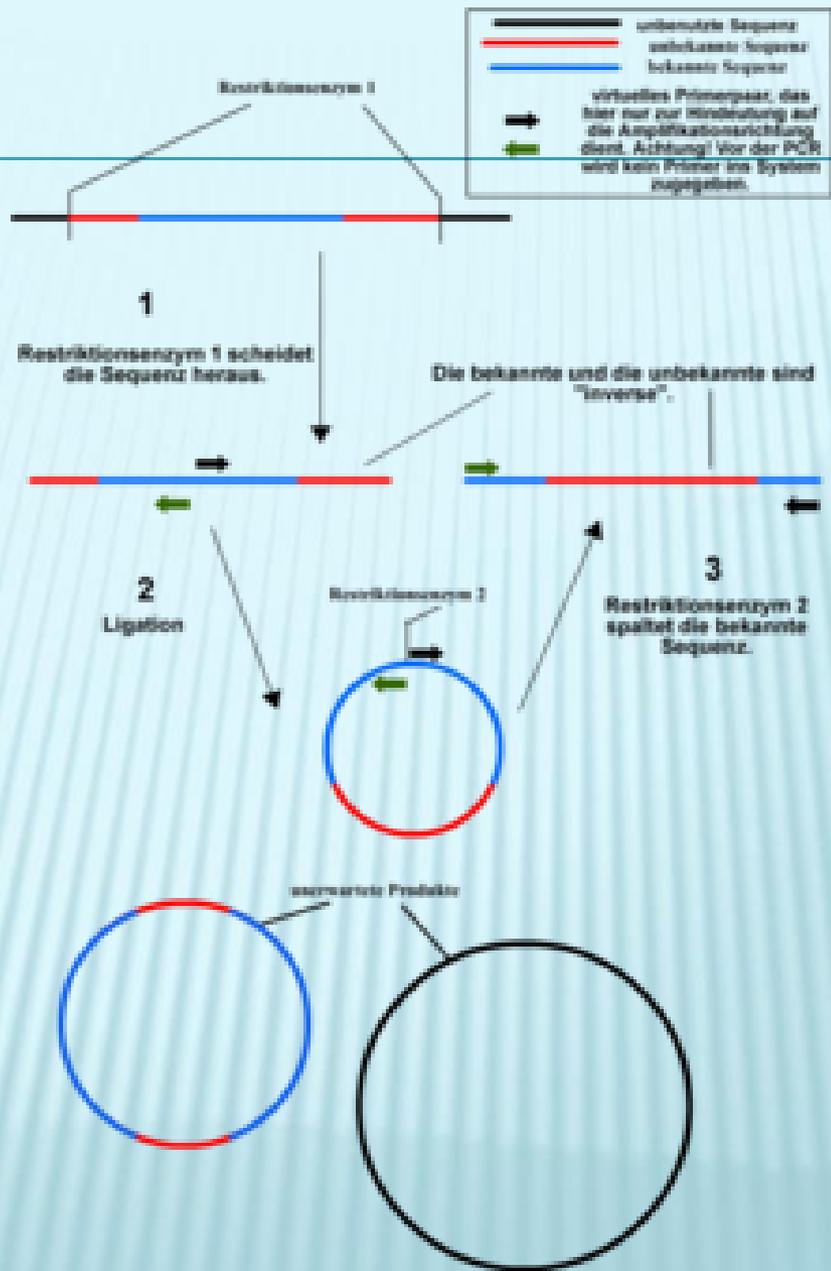
Figura 5. Dendrograma gerado de acordo com os perfis de amplificação das 41 linhagens de *R. solanacearum* utilizando o iniciador BOX AR1, baseado no método UPGMA, utilizando coeficiente de similaridade Dice.

Inverse PCR (iPCR)

- Método de PCR que permite a amplificação de regiões desconhecidas.

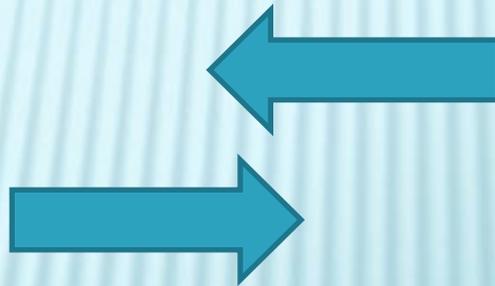
INVERSE PCR

- × Criado por Ochman em 1988
- × Regiões conhecidas
- × Regiões de Flanqueamento
- × Presença de Sítios de restrição
- × Determina regiões desconhecidas de até 4kb
- × Determinar sítios de inserção estranhos integrados ao DNA, por exemplo retrovírus e transposons.



Os Primers..

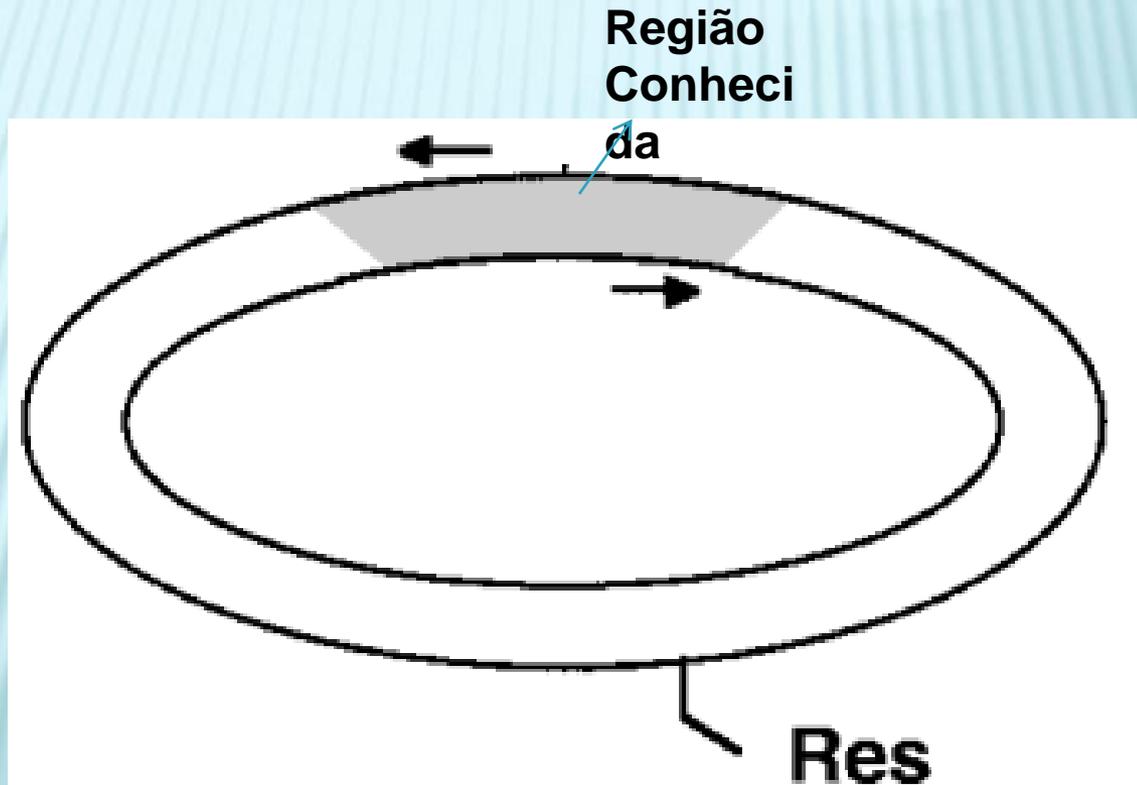
- × A partir de uma região conhecida são criados primers inversos hibridizados
- × Primers inversos amplificam opostamente a primers de PCR padrão (se distanciando um do outro e para fora)



Técnica

1. Seleção do DNA molde;
2. Clivagem upstream e downstream (área conhecida)
3. Purificação (remoção de possíveis inibidores)*
4. Circularização do DNA (ligase)
5. Amplificação usando os primers inversos.

- × Após seguidas fragmentações, ocorrerá uma circularização de fragmentos contendo a região de interesse



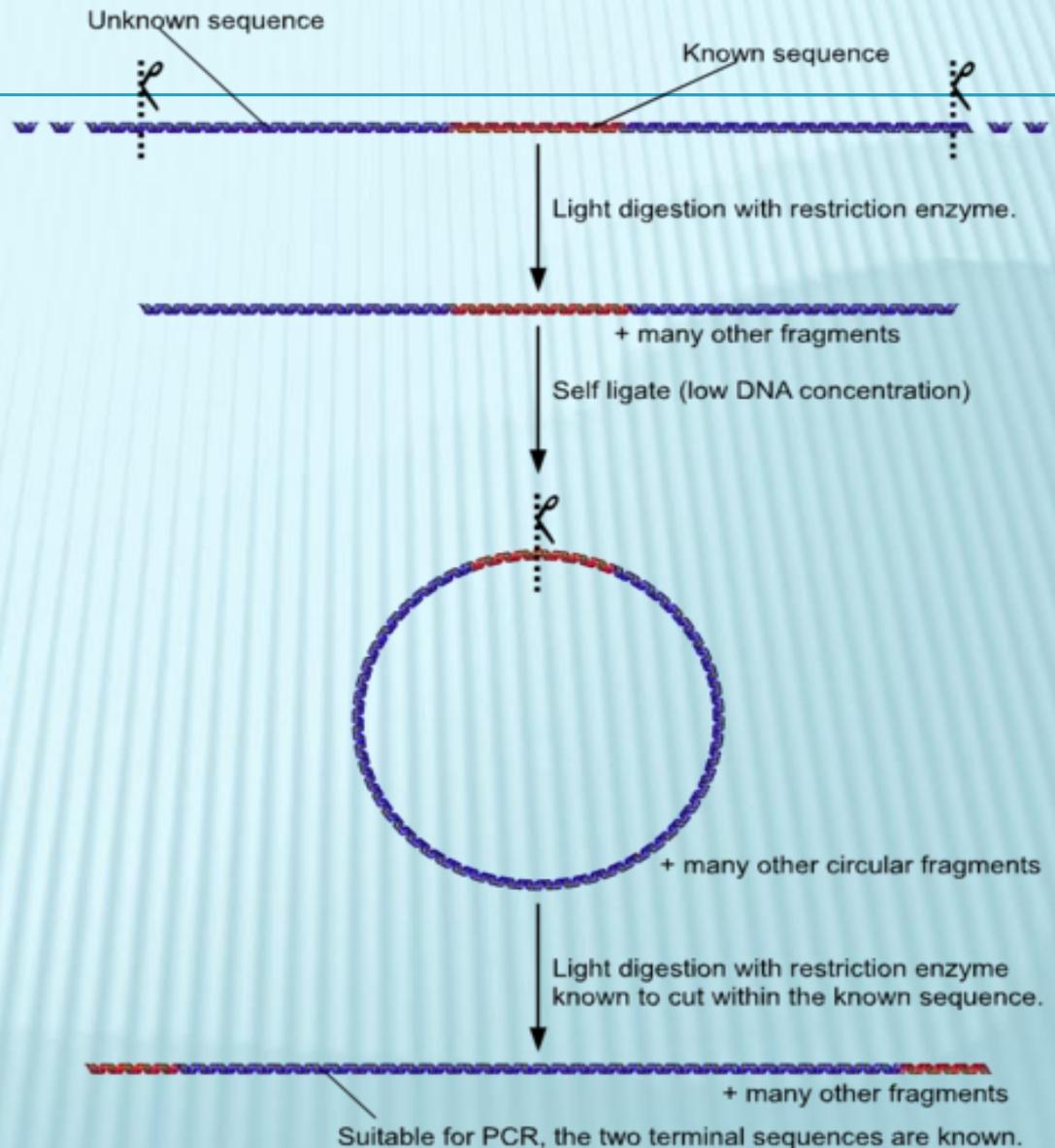
- Ocorrerá uma clivagem na região conhecida do DNA circular, linearizando-o e fazendo com que existam áreas conhecidas nas regiões upstream e downstream.



Sítio se torna aberto para amplificação

Resumindo...

- Clivagem nos sítios de restrição;
- Circularização do fragmento;
- Clivagem da área conhecida;
- Polimerase seguindo primers invertidos;



VECTORETTE PCR

Processo que permite ampliações quando se conhece apenas uma sequencia de primers

UTILIDADES..

**Análise de regiões
homólogas em
diferentes genes;**

**Mapeamento de íntrons do DNA
a partir de clones de cDNA;**

**Mapeamento e seqüenciamento de de
deleções, inserções, translocações.**

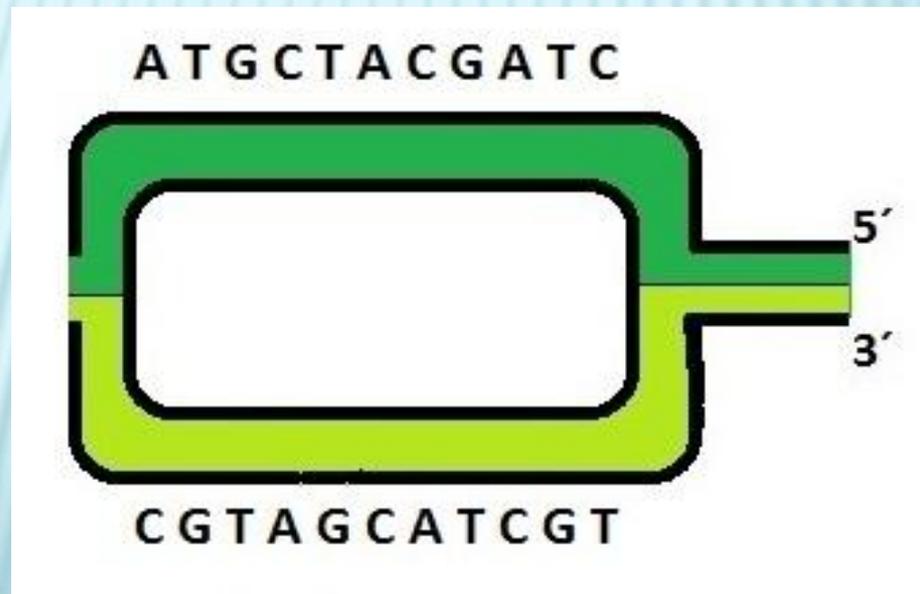
Genomic Walking

A TÉCNICA

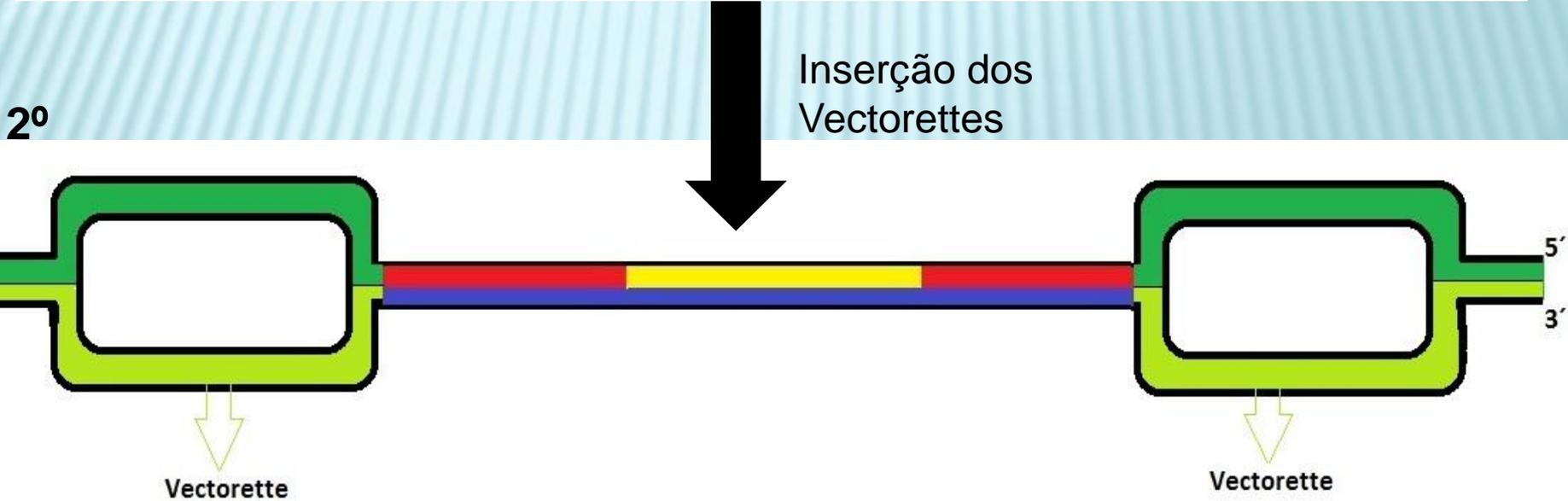
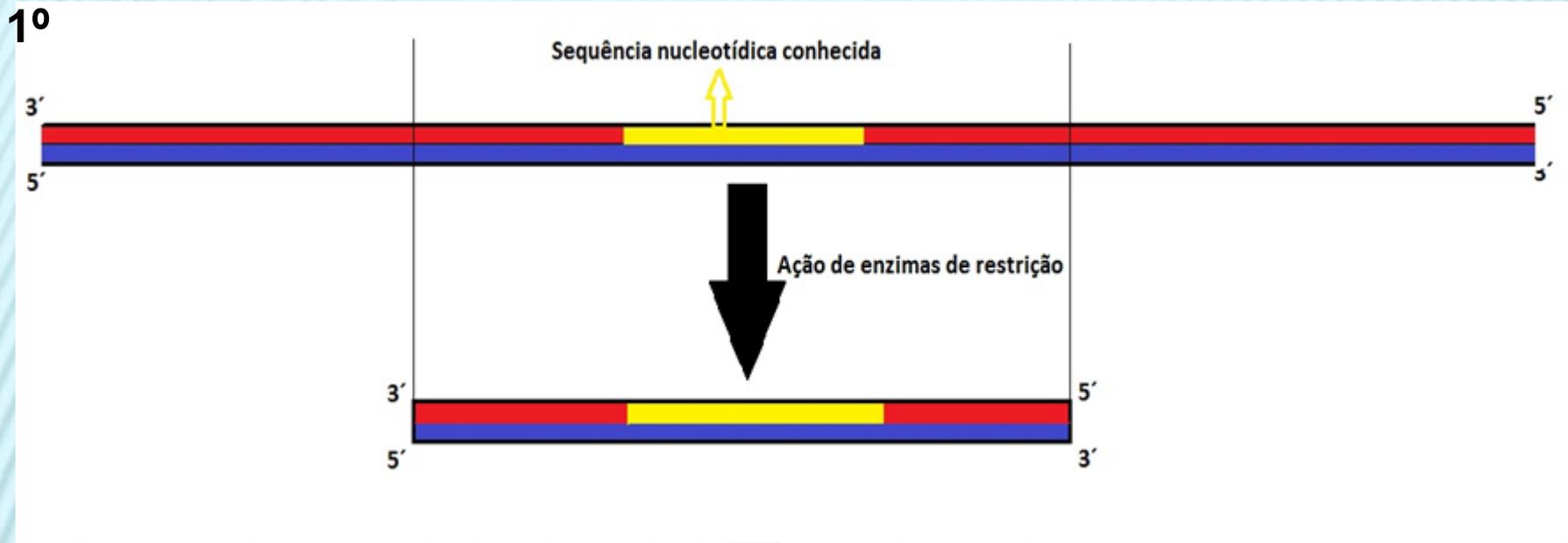
- × 1º: Seleção da região de interesse e clivagem da sequência formando fragmentos desejados.
- × 2º: Adição dos oligonucleotídeos (Vectorettes) nas regiões terminais dos fragmentos.
- × 3º: Desnaturação das fitas de DNA
- × 4º: Anelamento do primer conhecido e formação da nova fita que contém o fragmento de vectorette internalizado.
- × 5º: Anelamento do primer do vectorette e formação de uma nova fita.

VECTORETTE

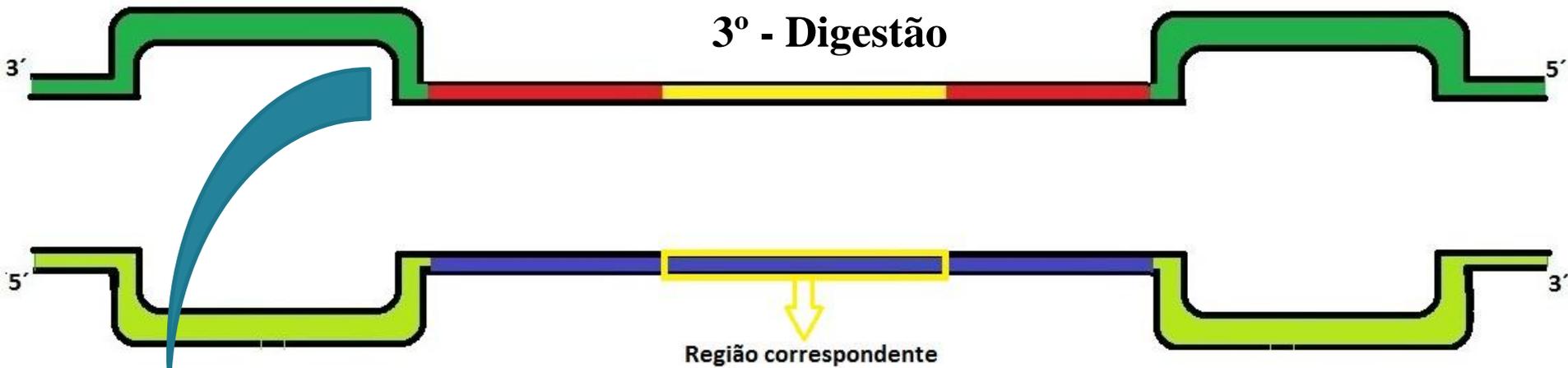
- × É uma sequencia sintética de oligonucleotídeos não pareados;
- × O não pareamento causa o formato particular.



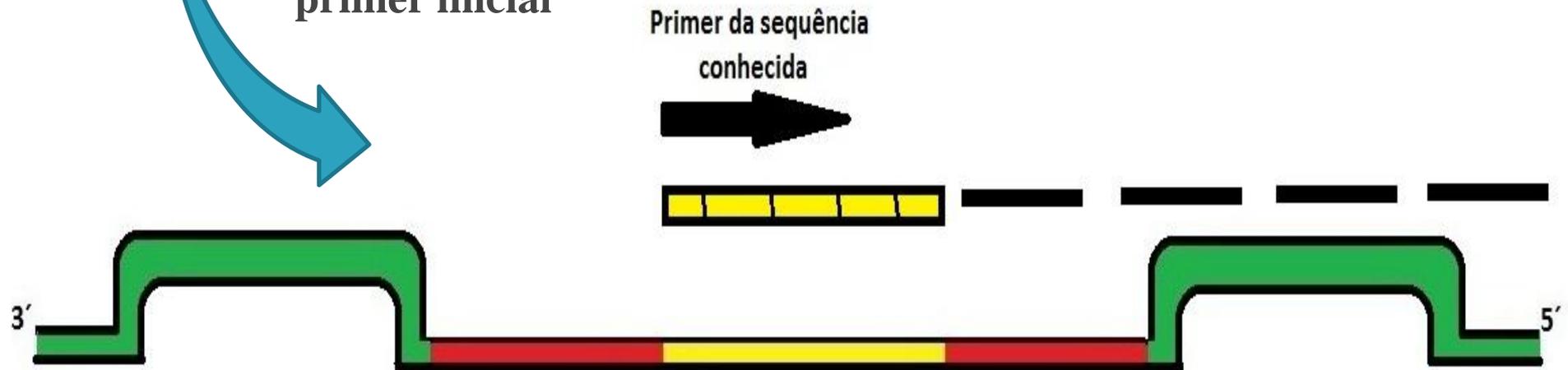
EM AÇÃO..



EM AÇÃO..



4° - Anelamento do primer inicial



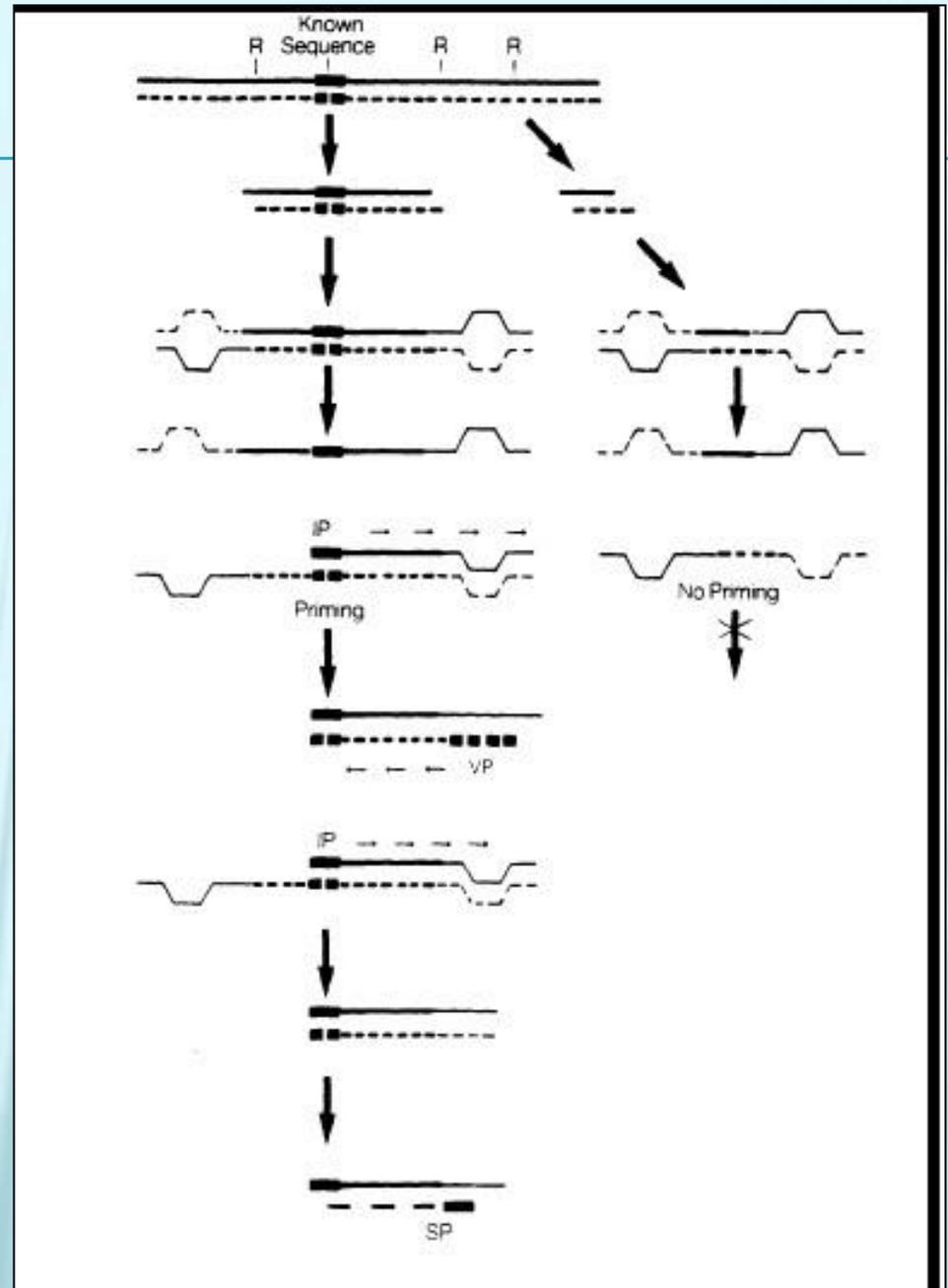
EM AÇÃO..

× 5º Anelamento do primer vectorette:



Resumindo...

- Digestão da região de interesse;
- Ligação dos Vectorretes nos fragmentos
- PCR com o primer conhecido
- PCR dos Vectorettes



Vectorette PCR: A Novel Approach to Genomic Walking

C. Arnold and I.J. Hodgson

CRB Ltd., Gadbrook Park, Northwich, Cheshire, CW9 7RA, UK

Vectorette PCR (or chemical genetics) is a method that enables the amplification of specific DNA fragments in situations where the sequence of only one primer is known.^(1,2) Thus, it extends the application of PCR to stretches of DNA where the sequence information is only available at one end. In this report, we describe the chemical genetics method and demonstrate its use in one specific application. In addition, we demonstrate how fragments generated by this procedure can be sequenced rapidly and simply using methods that have the potential for automation.

The steps involved in the chemical genetics method, or vectorette PCR, are shown in Figure 1. There are three basic steps: (1) digestion of target DNA with a suitable restriction enzyme; (2) ligation of suitable synthetic oligonucleotides onto the digested DNA; and (3) PCR using a specific primer and a primer directed toward the synthetic oligonucleotides.

Nonspecific amplification of all digested fragments is avoided by the design of specific fragments of synthetic DNA, called vectorettes. Vectorettes are designed so that they can be amplified only if they are attached to the DNA sequence of interest. The vectorette is only partially double-stranded and contains a central mismatched region (see Fig. 2). The vectorette PCR primer has the same sequence as the bottom strand of this mismatched region and therefore has no complementary sequence to anneal to in the first cycle of PCR. In the first cycle of PCR, only the known primer, which is directed toward the sequence of interest, will prime DNA synthesis. This will produce a complementary strand for the vectorette PCR primer to anneal to in the second cycle of PCR. In the second and subsequent cycles of PCR, both primers can prime synthesis with the end result being that the only

MATERIALS AND METHODS

Preparation of DNA

Chlamydia trachomatis DNA was prepared as described previously.⁽⁴⁾

Digestion, Ligation, and PCR

Prepared DNAs were digested with appropriate restriction enzymes in suitable buffers at 37°C for 1 hr. ATP and dithiothreitol (DTT) were added to a concentration of 2 mM each, and appropriate vectorette units were added along with one unit of T4 DNA ligase (without a change of buffer). The samples were then incubated at 20°C for 1 hr followed by 37°C for 30 min. This incubation cycle was carried out a further two times, because the vectorettes have been designed so that the restriction enzyme site is not reformed on ligation of vectorette to target DNA; this incubation cycle leads to increased target-vectorette constructs. The incubation at 37°C leads to digestion of target-target DNA, but not target-vectorette constructs. PCRs were performed using the appropriate known biotinylated primer and vectorette PCR primer in 1x *Taq* PCR buffer with 2.5 units of *Taq* polymerase (Promega). PCRs were carried out on Techne PHC-1 unit, with 40 cycles of 96°C 1 min, 64°C 1 min, and 74°C 1.5 min. PCR

VECTORETTE, UMA NOVA VISÃO PARA *GENETIC WALK*

- × -Artigo que explora a capacidade do vectorette de ser uma ferramenta no método de genetic Walk, que consiste em selecionar regiões genômicas de acompanhamento adjacentes a regiões conhecidas e as sequenciar
- × Foi utilizado o DNA da bactéria *chlamydia trachomatis*

RESULTADOS..

- × O processo foi capaz de isolar diversos fragmentos de diferentes tamanhos, permitindo a utilização de outros processos de automação para amplificá-los e sequenciá-los
- × Foi possível analisar mais de 1,5kb de DNA antes não caracterizado usando apenas um primer biotinado e um primer de sequenciamento em menos de quatro dias

COMPARANDO...

REP-PCR	INVERSE-PCR	VECTORETTE-PCR
Reconhece sequências repetitivas	Determina sítios de inserção	Reconhecimento de regiões específicas
Variações de primers (3)	Primers inversos	Vetores em forma de bolha
Diferenciação de sub-espécies	Amplifica regiões não conhecidas	Amplificação a partir de um único primer

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Artigos

- × ARNOLD C., HODGSON, I. J. Vectorette PCR: a novel approach to genomic walking. *Genome Res.* 1991 1: 39-42
- × DAVID, K.; AKASHI. A Vectorette PCR-based approach for sequencing homologous regions from different genomes. Hiroshi Akashi Lab Biology Department Pennsylvania State University.
- × OCHMAN, H, GERBER A.S., HARTL DL. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics.* 1988;120:621–623

Sites

- × Evrogen. **Genome walking.** Disponível em: <<http://www.evrogen.com/technologies/genome-walking.shtml>>. Acesso em 1 dez. 2010.
- × Microbe Inotech , Inc. **Repetitive Sequence-based PCR (repPCR).** Disponível em: <<http://www.microbe-industrial.com/services/reppcr>>. Acesso em 1 dez. 2010.
- × Biomerieux. **Aplicações Bio-Farmacêuticas.** Disponível em: <http://www.biomerieux.com.br/servlet/srt/bio/brazil/dynPage?open=BRZ_IND_BPA_PRD&doc=BRZ_IND_BPA_PRD_G_PRD_NDY_4&pubparams.sform=5&lang=pt_br>. Acesso em 1 dez. 2010.
- × Silliker. **Microbial Identification: Tracking the Great Unknown with Innovative and Advanced Technologies.** Disponível em: <http://www.silliker.com/usa/html/publications/eresearch_volume6_issue2.php>. Acesso em 1 dez. 2010.
- × Michigan State University. **Characterization and classification of microbes by rep- pcr genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis.** Disponível em: <<https://www.msu.edu/~debruijn/dna1-4.htm>>. Acesso em 1 dez. 2010.
- × Annual reviews. **The three DS of PCR-based genomic analysis of phyto bacteria: Diversity, Detection, and Disease Diagnosis.** Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev.phyto.37.1.81>>. Acesso em 1 dez. 2010.
- × Clinical lab products. **Rep-PCR technology speeds shift to DNA fingerprinting** Disponível em: <http://www.clpmag.com/issues/articles/2003-05_04.asp>. Acesso em 1 dez. 2010.

OBRIGADO!

OBRIGADO!