

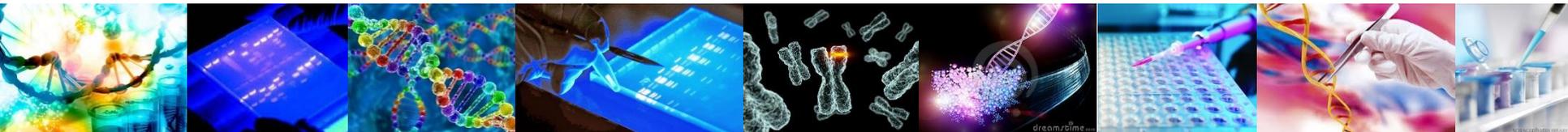
PRINCÍPIOS BÁSICOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

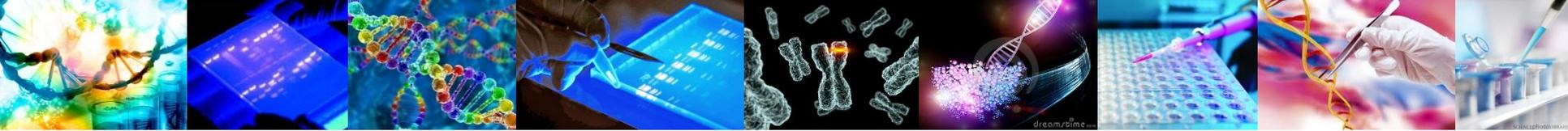
Noemi C. Baron Cozentino

Doutoranda em Microbiologia Agropecuária

Ms. Microbiologia Aplicada

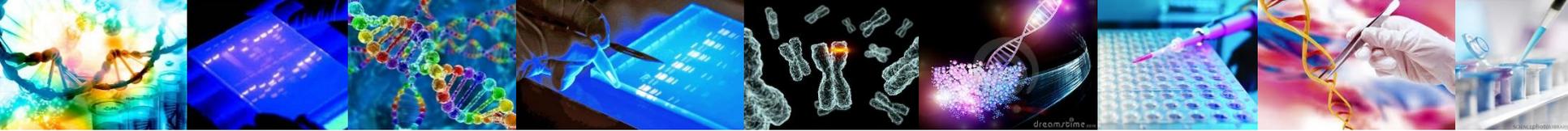
Orientador: Prof. Dr. Everlon Cid Rigobelo





A Biologia Molecular...

- É um ramo da Biologia que explora o estudo da vida em escalas moleculares
- Estuda as interações, a função e a estrutura dos genes a nível molecular
- Está intimamente envolvida com a bioquímica, pois as interações genéticas ocorrem a níveis de átomos e moléculas
- Visa o estudo dos processos de replicação, transcrição, tradução, suas regulações e seus possíveis erros e características.



Contexto Histórico

- O Início – Descoberta da molécula de DNA



Johann F. Miescher
(1869)

- Estudo do núcleo de glóbulos brancos
- Nucleína: molécula grande, rica em P e N



Albrecht Kossel
(1880)

- Nucleína tem bases nitrogenadas



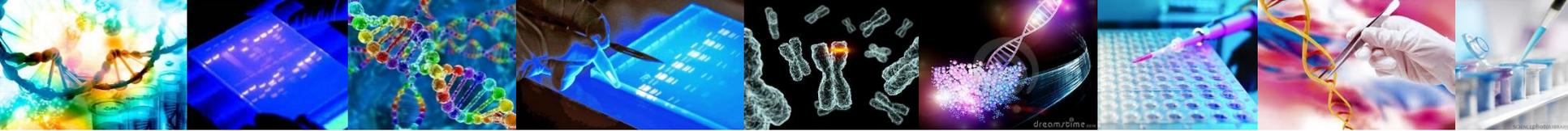
Richard Altmann
(1889)

- Nucleína tem natureza ácida = Ácido nucleico



Phoebus Levine e
Walter Jacobs (1912)

- Estrutura do nucleotídeos
- Ácidos nucleicos são polinucleotídeos



Contexto Histórico

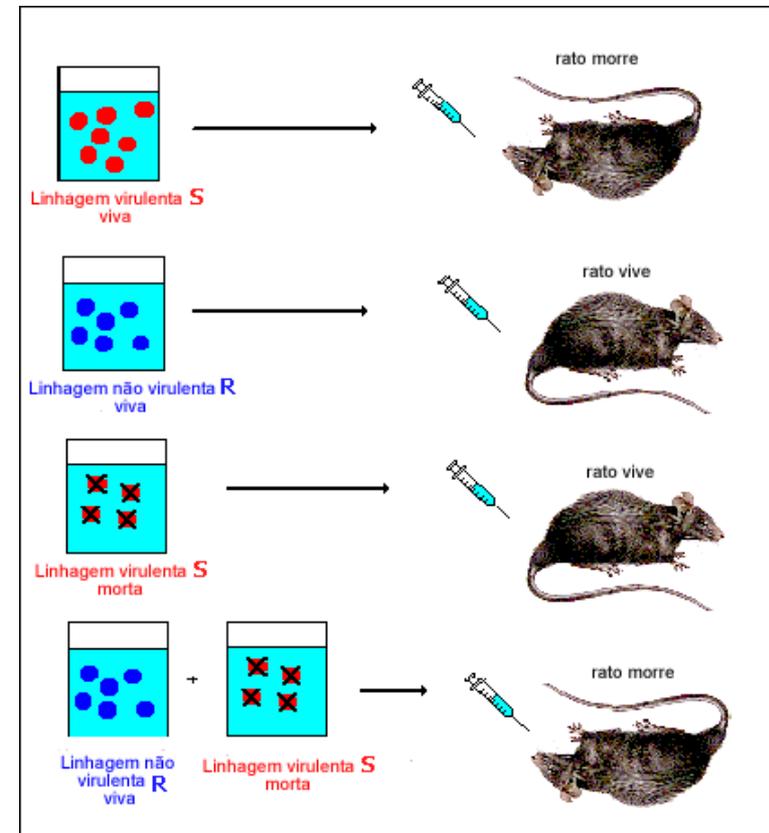
- Cientistas conheciam a composição do DNA mas não sabiam sua função

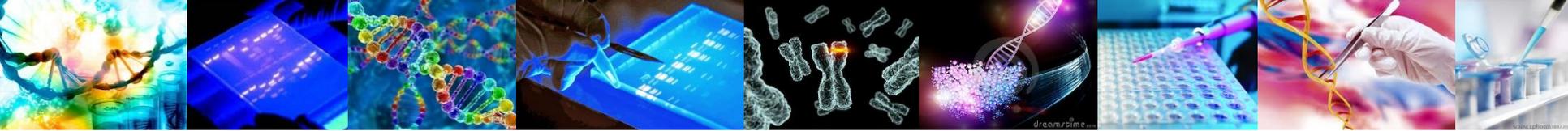


- 1944 – Oswald Avery
“DNA É A MOLÉCULA QUE CONTÉM AS INFORMAÇÕES HEREDITÁRIAS”



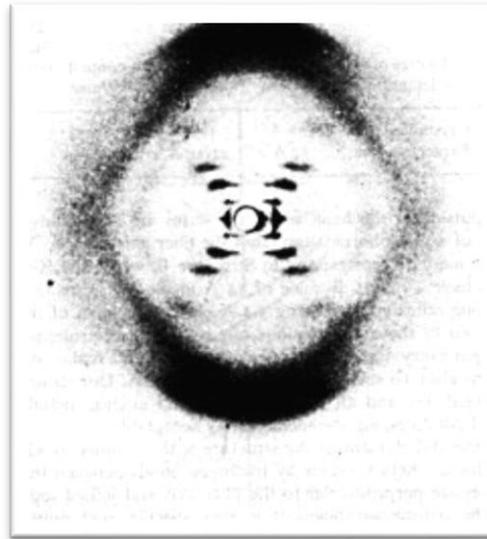
- Elucidação a partir de testes com *Streptococcus pneumoniae* - Frederick Griffith (1928)



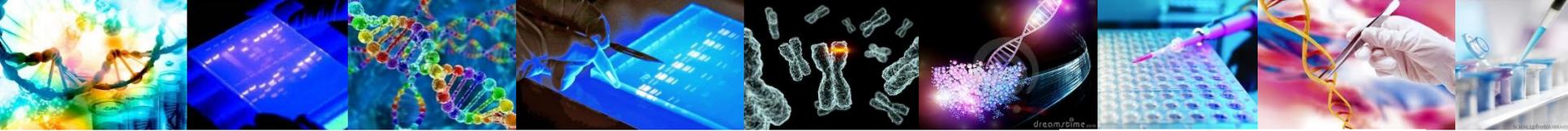


Contexto Histórico

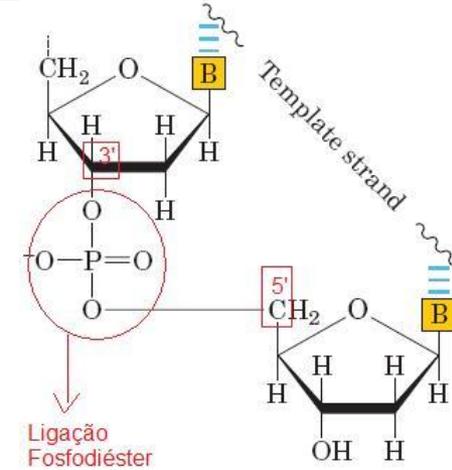
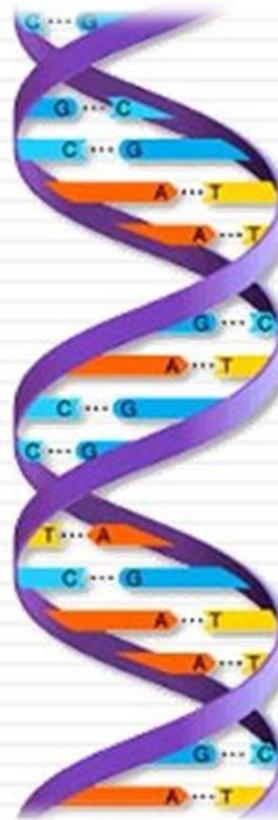
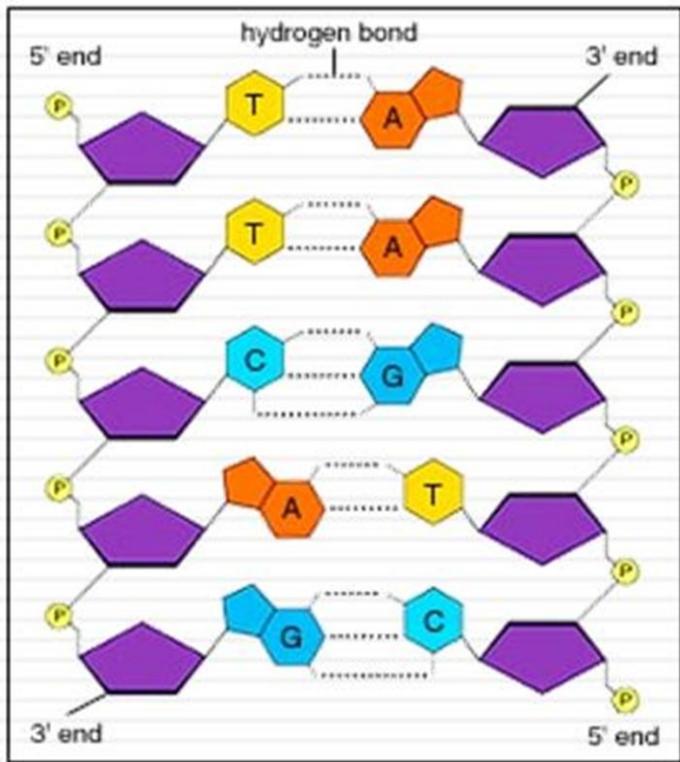
- Francis Crick e James Watson - 7 de março de 1953
 - a molécula do DNA tem a estrutura de uma dupla



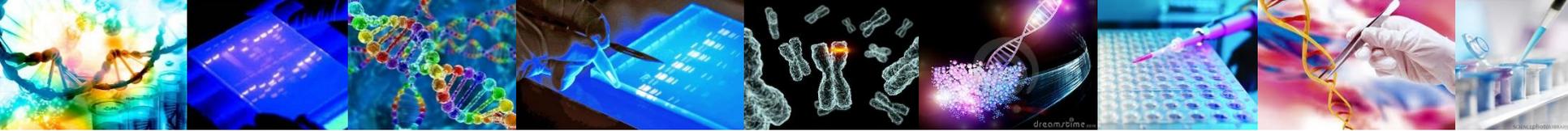
A partir de então, a biologia molecular tornou-se, de fato, uma ciência que hoje, após 63 anos de avanços, traz à cena a transgênese, a genômica e a possibilidade da clonagem reprodutiva.



Estrutura do DNA

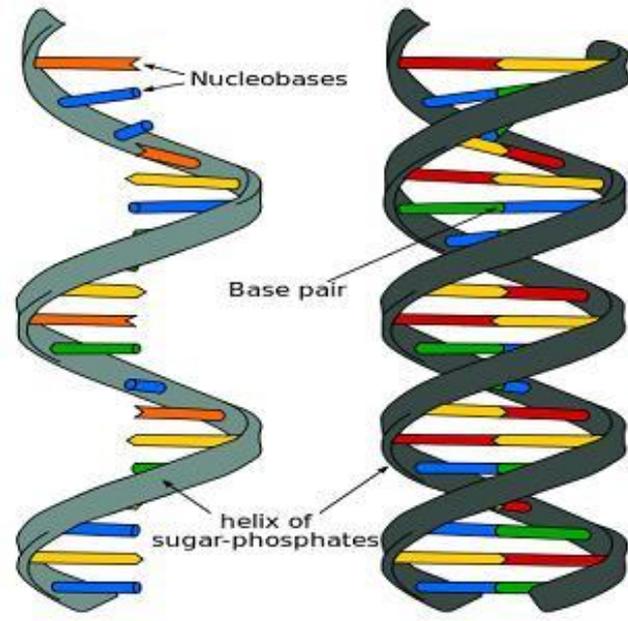
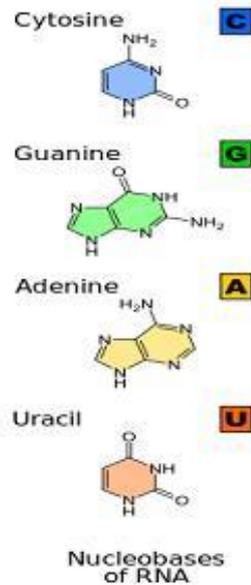


- Dupla hélice de nucleotídeos
- Fitas em sentido antiparalelo com sequência de pares de bases complementares
- Pontes de hidrogênio entre as bases nitrogenadas A-T; C-G



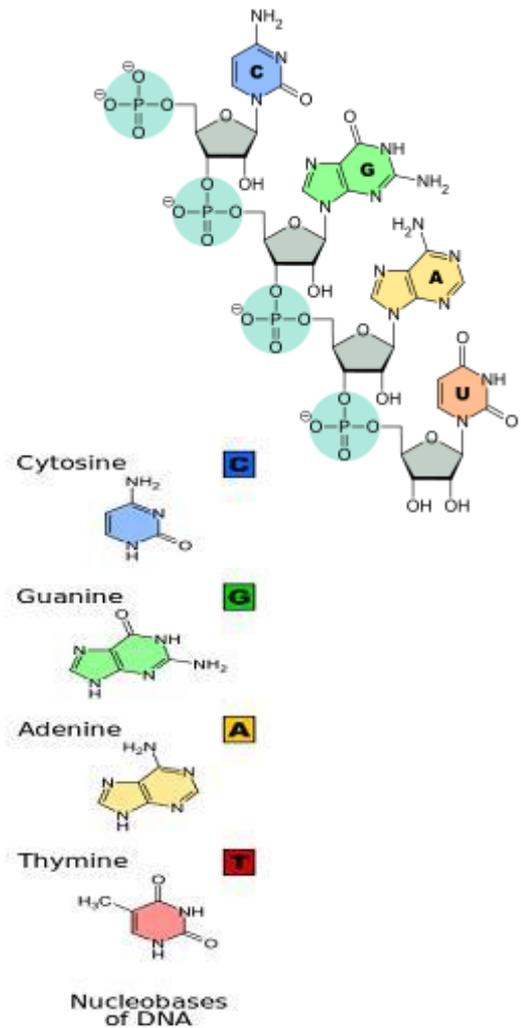
Estrutura do RNA

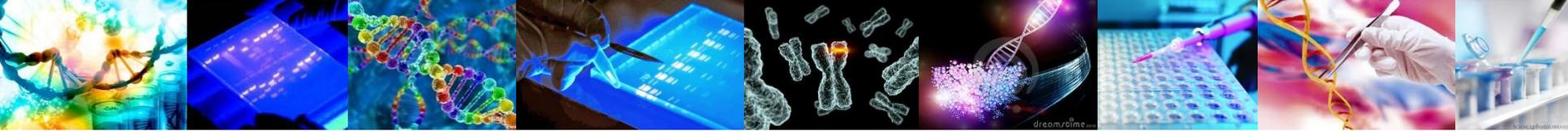
- Fita simples
- Ribose
- A, U, C e G
- Obtido pela transcrição do DNA



RNA
Ribonucleic acid

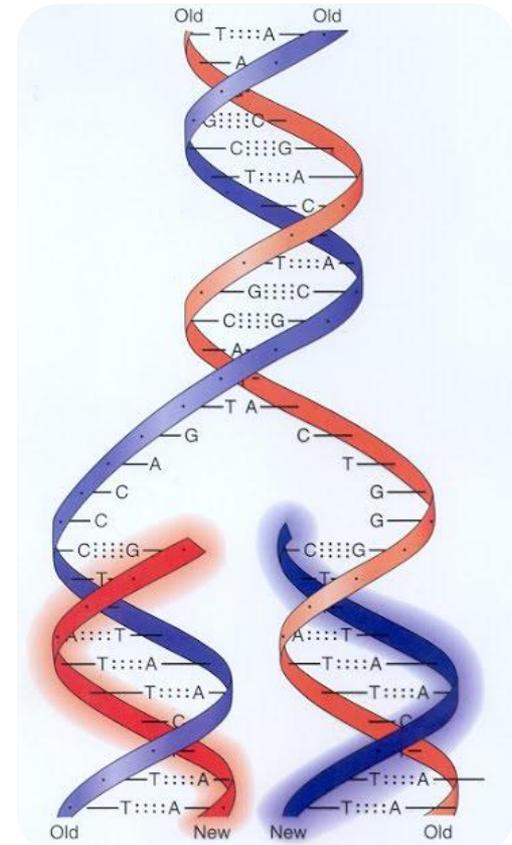
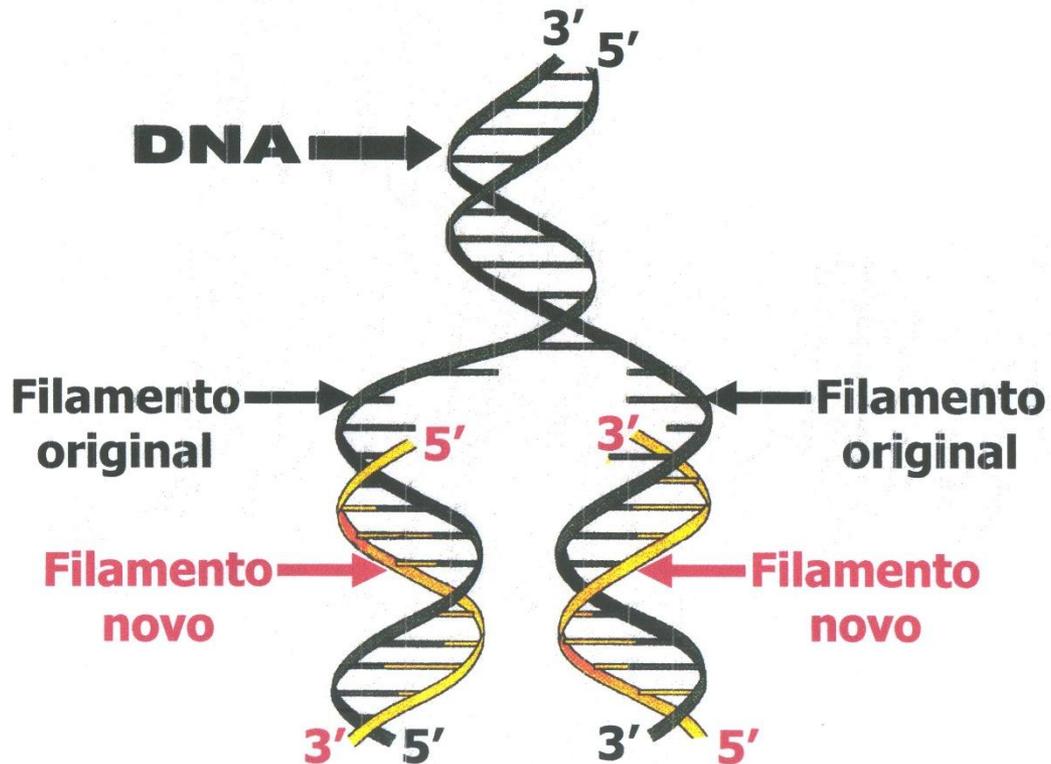
DNA
Deoxyribonucleic acid

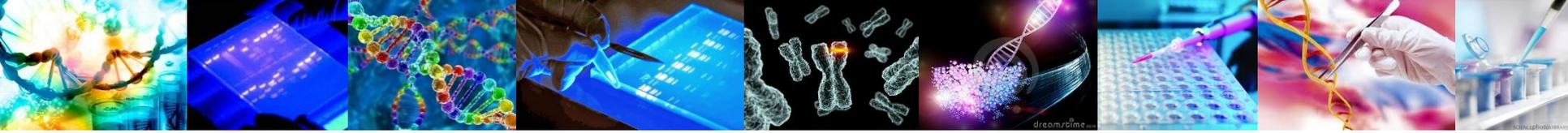




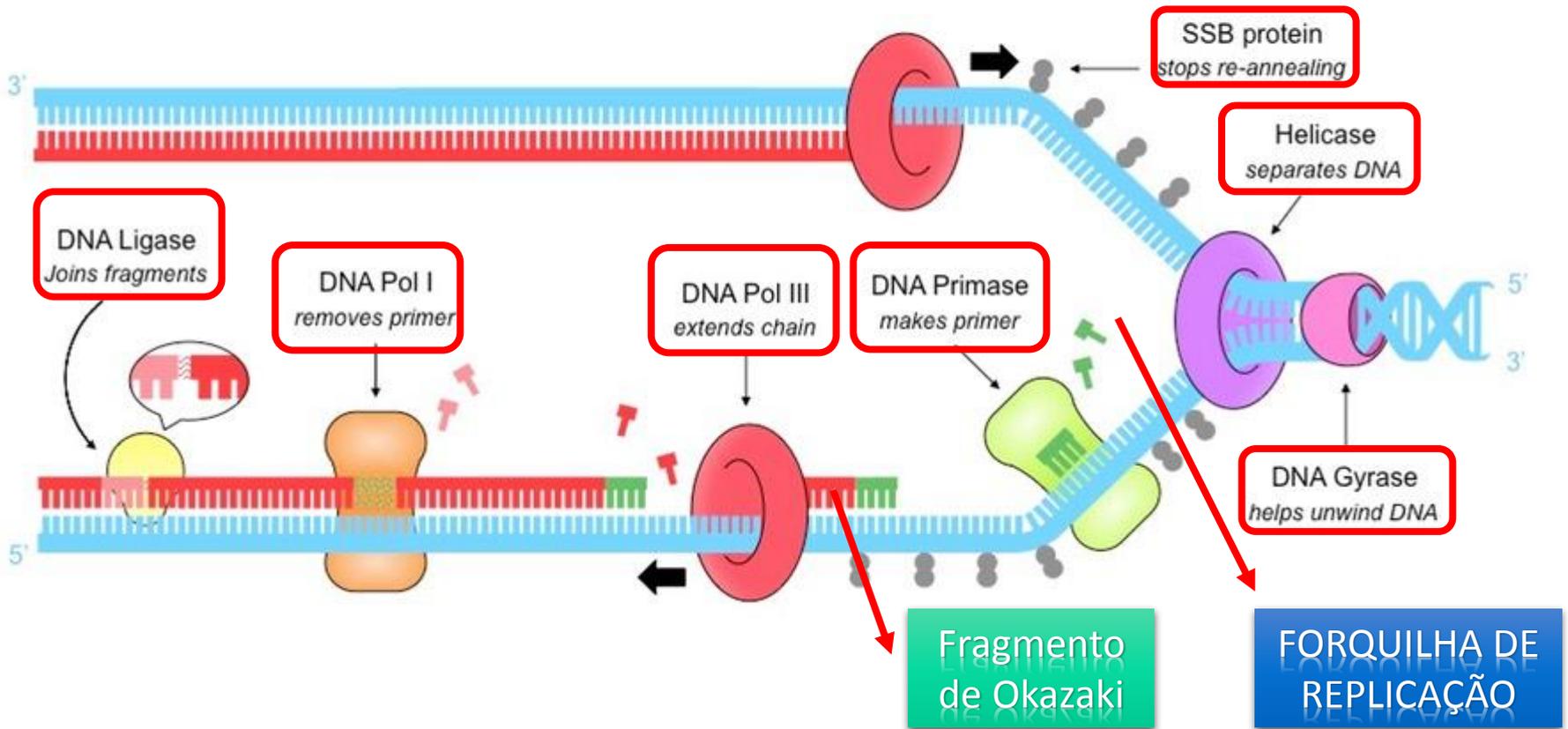
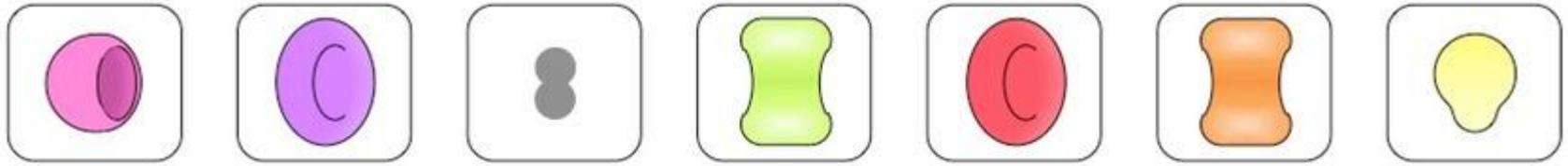
Replicação do DNA

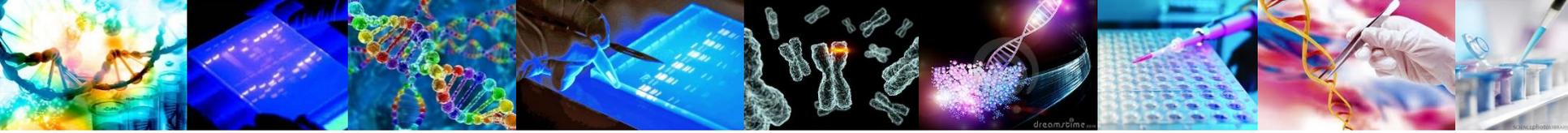
- Necessária para a divisão celular
- Processo **semiconservativo**
- Sentido 5' → 3'



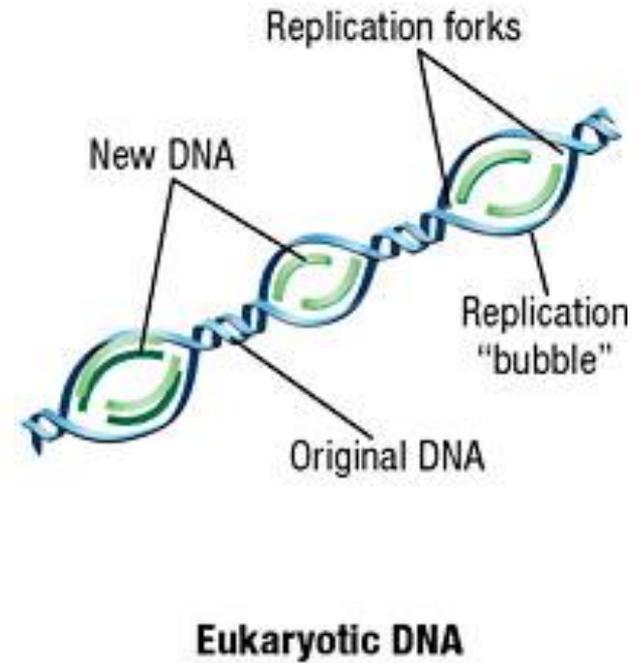
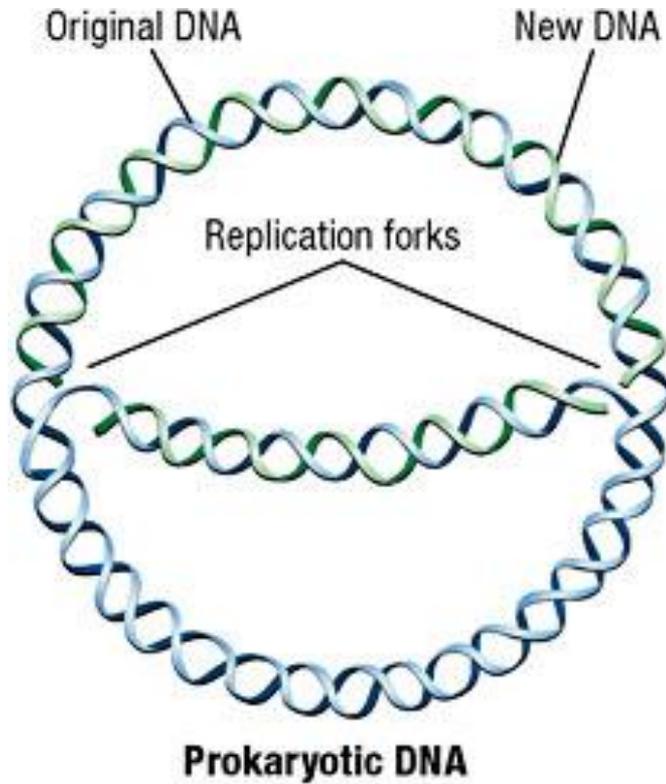


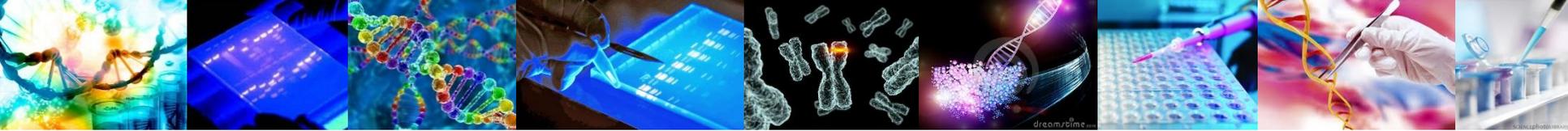
Replicação do DNA





Replicação do DNA – Procariotos x Eucariotos



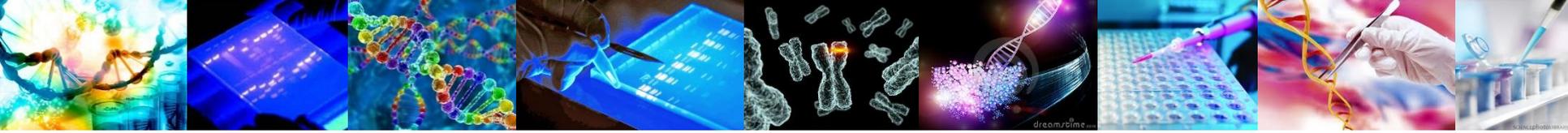


Transcrição do DNA – Síntese de RNA

- Leitura da informação genética contida no DNA nos genes

Genes são segmentos funcionais de DNA: sequência de nucleotídeos que codifica uma proteína

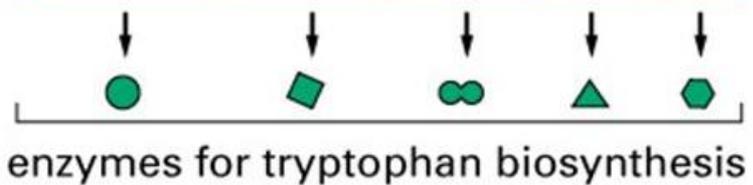
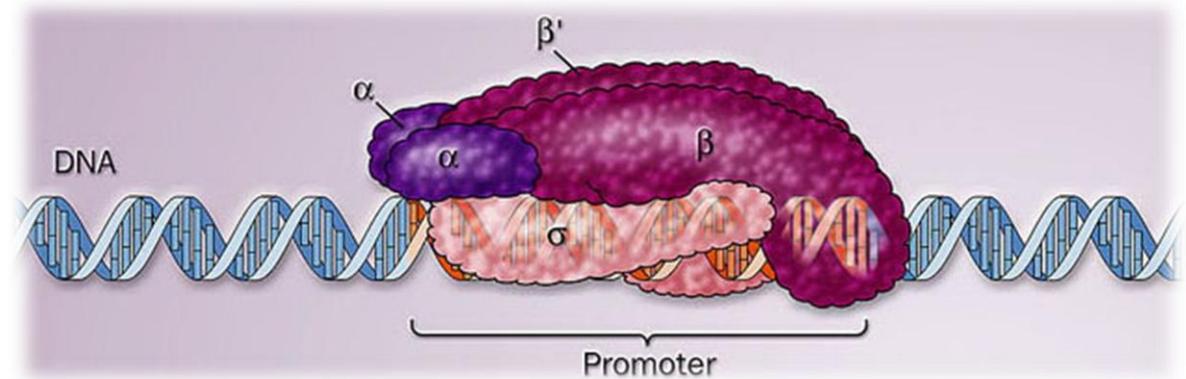
- Três tipos principais de RNA
 - RNAm – mensageiro – informacional
 - RNAr – ribossômico – funcional e estrutural
 - RNAt – transferência – funcional



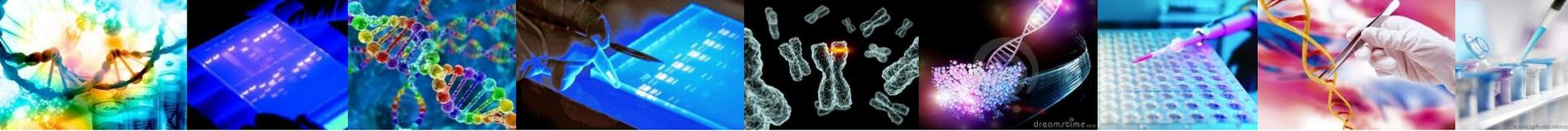
Transcrição do DNA – Síntese de RNA

- Realizada pela RNA polimerase

Em procariotos



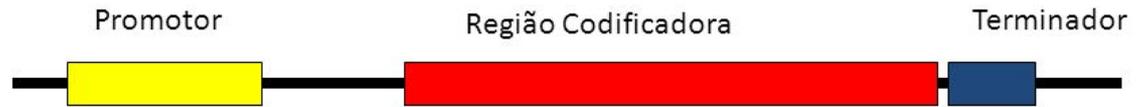
RNAm policistrônico



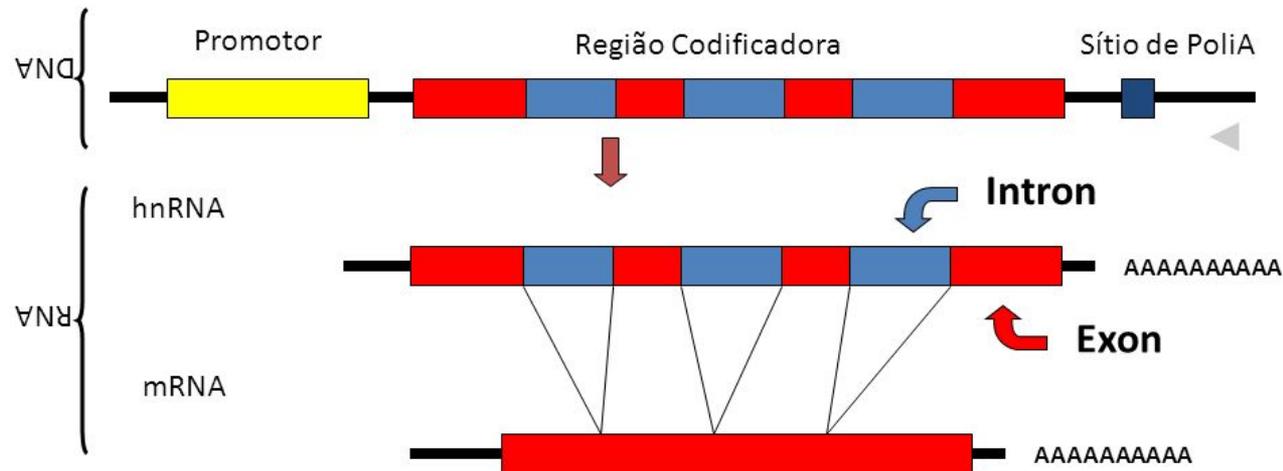
Em Eucariotos

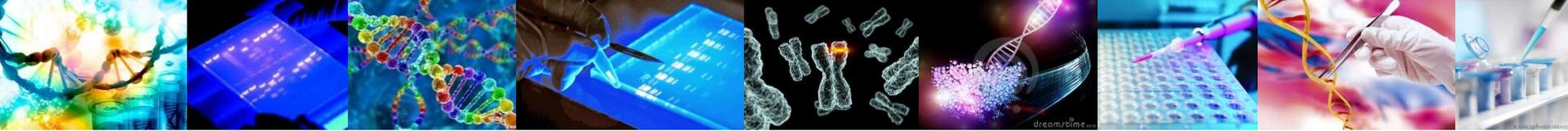
- DNA monocistrônico
- Várias RNA polimerase (I, II, e III)
- Íntrons e éxons
- Processamento do RNAm
 - *Cap* – G metilada em 5'
 - *Splicing*
 - *Cauda poli A*

Estrutura de um Gene de Procaríoto



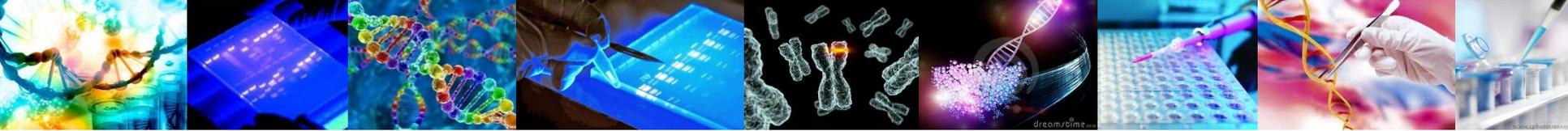
Estrutura de um Gene de Eucarioto





Síntese de DNA *in vitro* - PCR





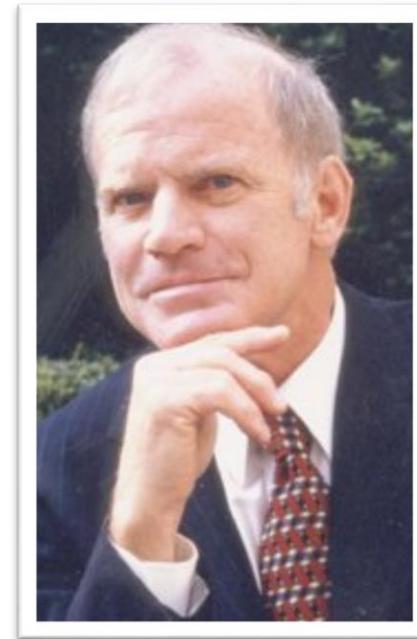
PCR – Polymerase Chain Reaction

Science, 1985 vol. 230, n. 4732 p. 1350 -1354

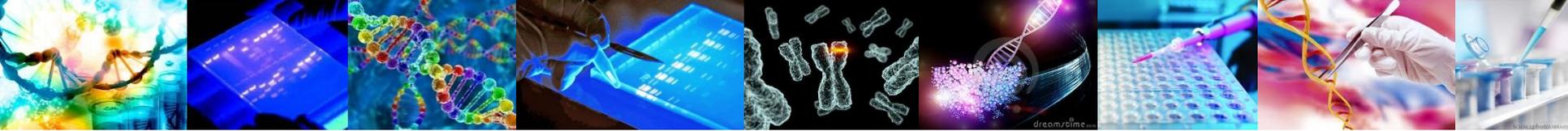
RESEARCH ARTICLE

Enzymatic Amplification of β -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia

Randall K. Saiki, Stephen Scharf, Fred Faloona, Kary B. Mullis
Glenn T. Horn, Henry A. Erlich, Norman Arnheim

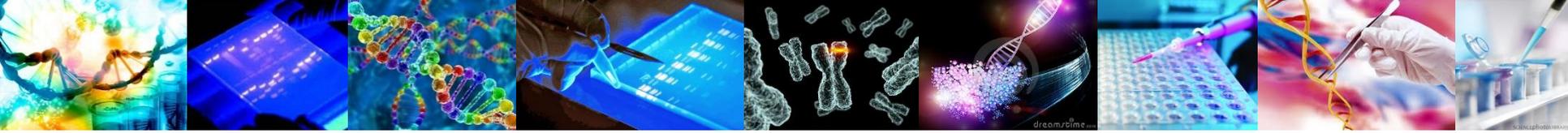


Kary B. Mullis

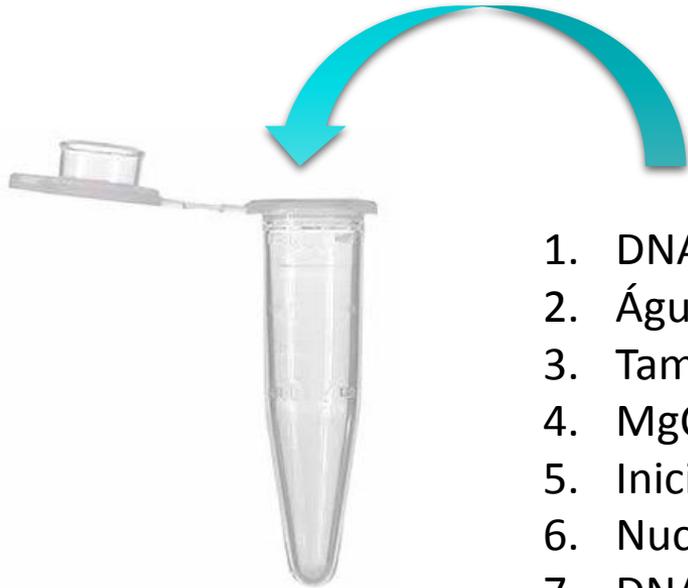


PCR – Polymerase Chain Reaction

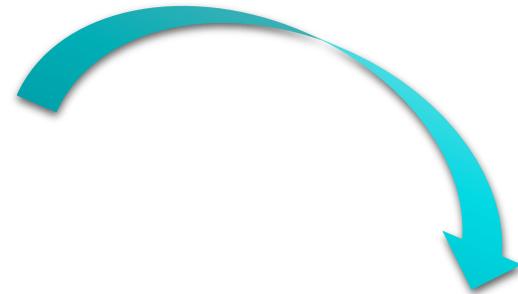
- É um método de amplificação (de criação de múltiplas cópias) de DNA sem o uso de um organismos vivo.
- O que é necessário para se fazer cópias de DNA *in vitro*?
 1. DNA molde
 2. Iniciadores
 3. DNA polimerase
 4. Nucleotídeos



PCR – Polymerase Chain Reaction

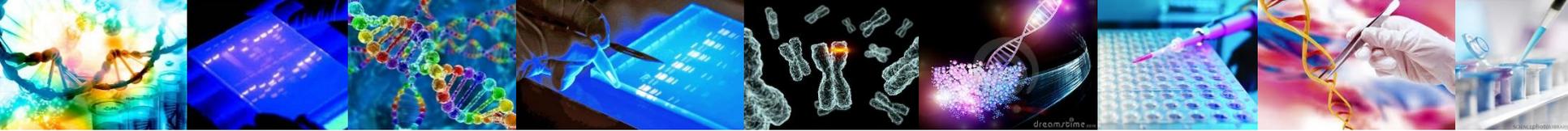


1. DNA Molde
2. Água
3. Tampão
4. MgCl₂
5. Iniciadores (*primers*)
6. Nucleotídeos
7. DNA polimerase



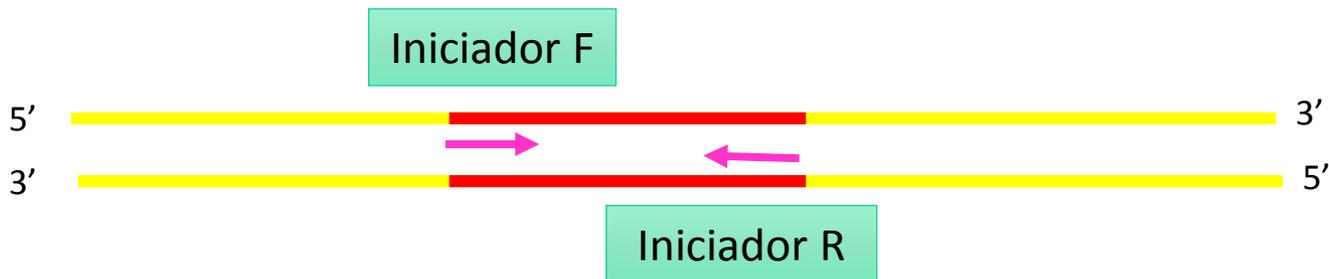
Termociclador: Equipamento que realiza oscilações de temperatura em ciclos definidos para que a amplificação do DNA aconteça

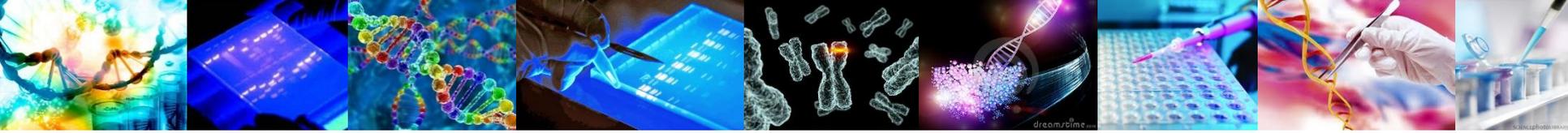




PCR – Polymerase Chain Reaction

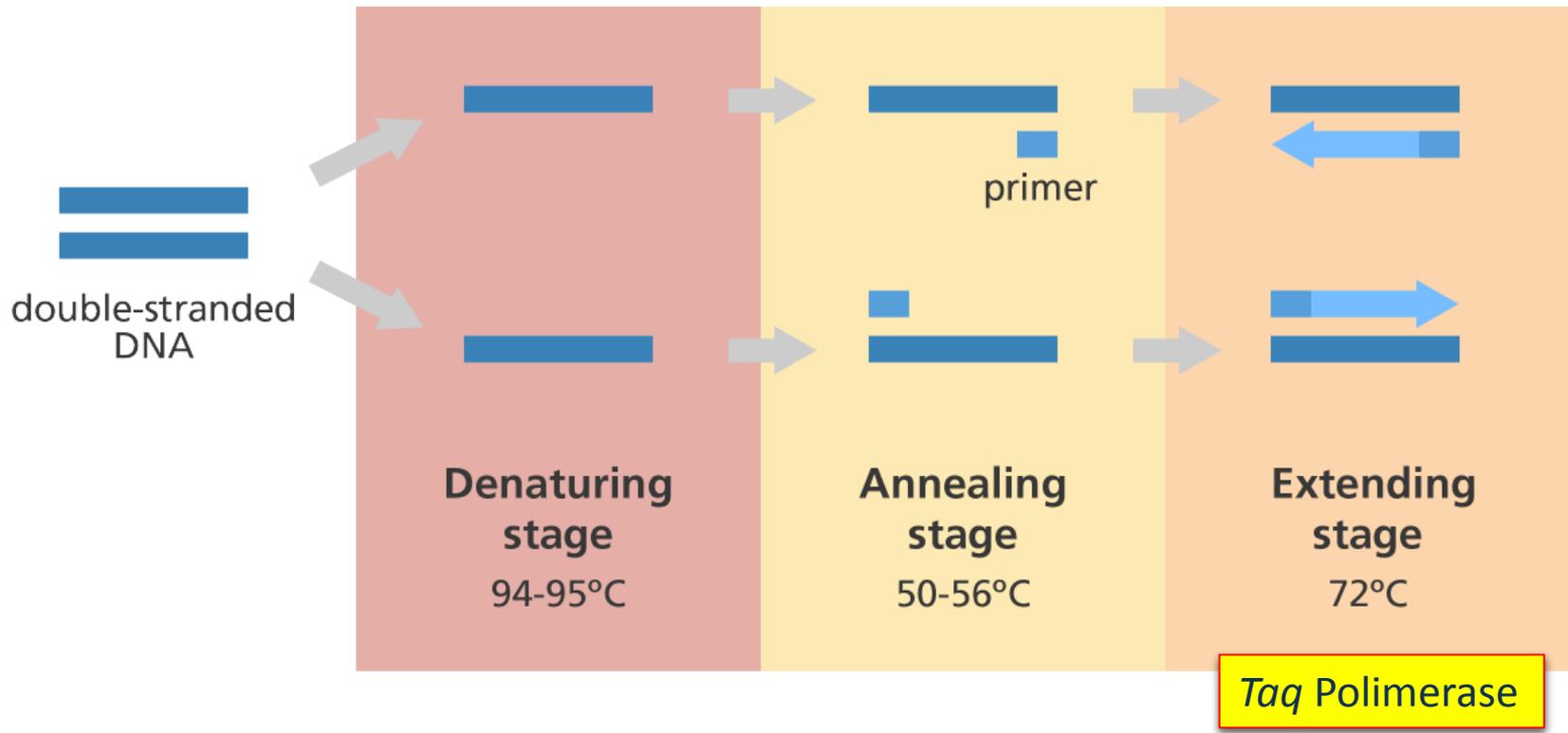
- Iniciadores (*primers*)
 - Em pares para cada gene
 - Iniciador F (Forward)
 - Iniciador R (Reverse)



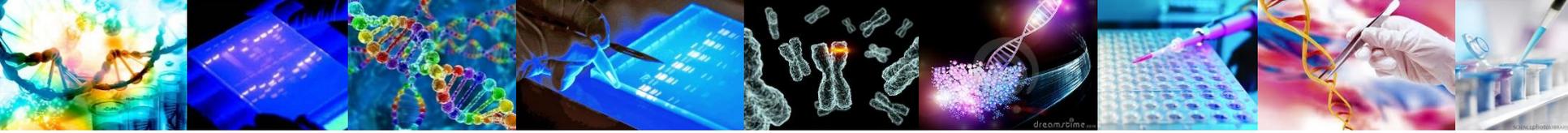


PCR – Polymerase Chain Reaction

- Temperaturas no ciclo da PCR

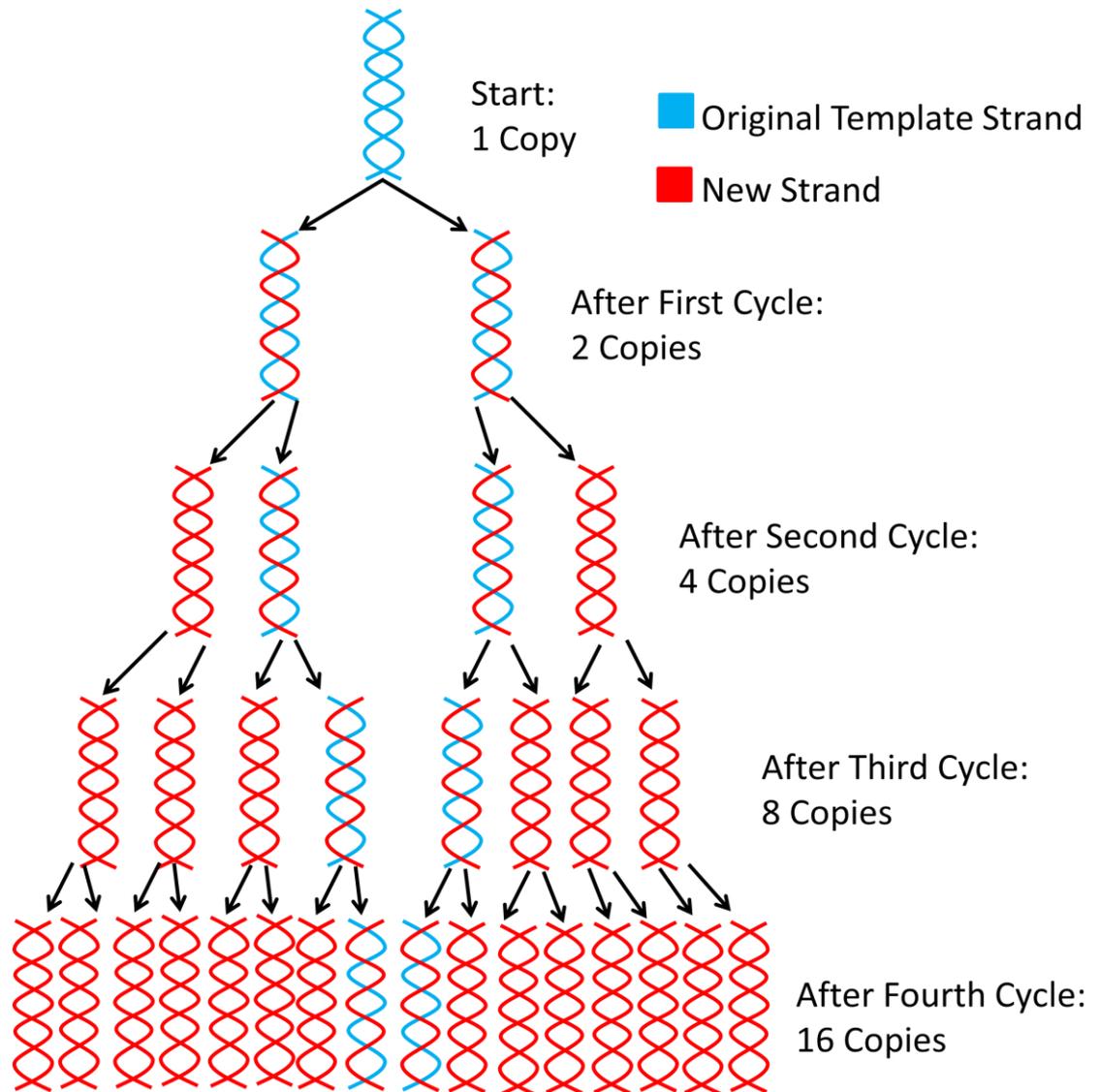


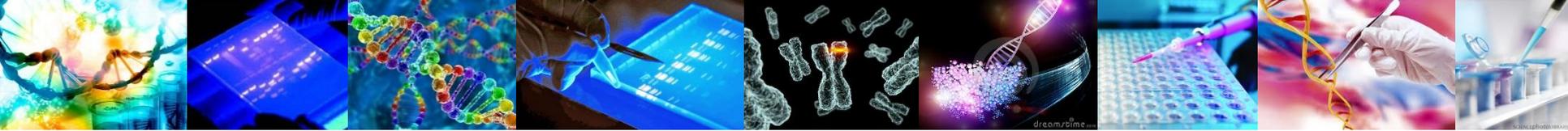
Taq - *Thermus aquaticus* – polimerase termoestável – bactéria hipertermófila (fontes hidrotermais)



PCR – Polymerase Chain Reaction

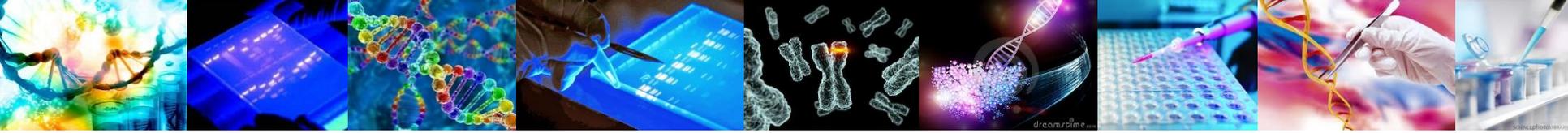
- Ciclos são repetidos de forma a obter-se quantidade suficiente de DNA alvo amplificado
- 25 a 40 ciclos em média
- Milhares de cópias do DNA alvo ao final do processo



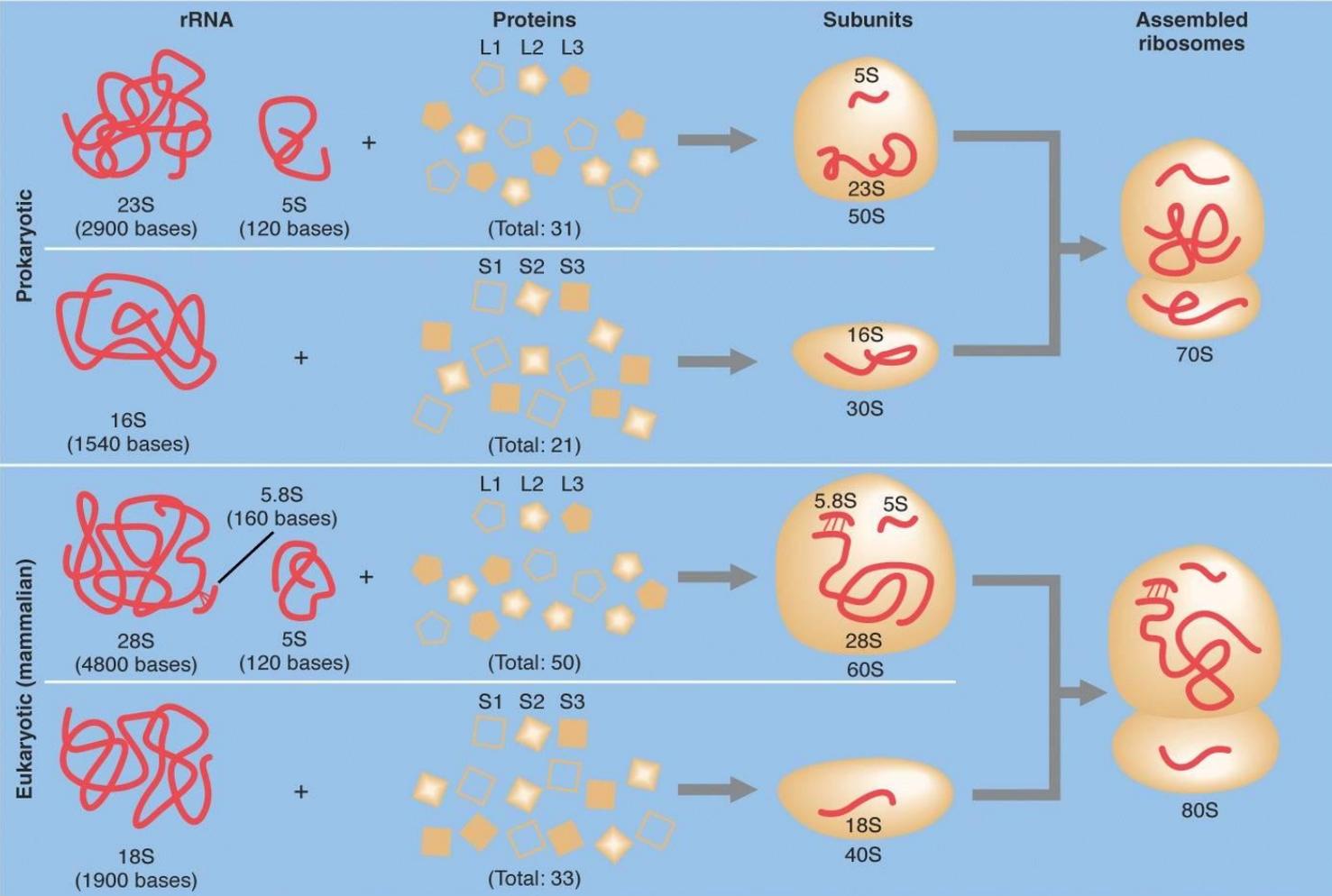


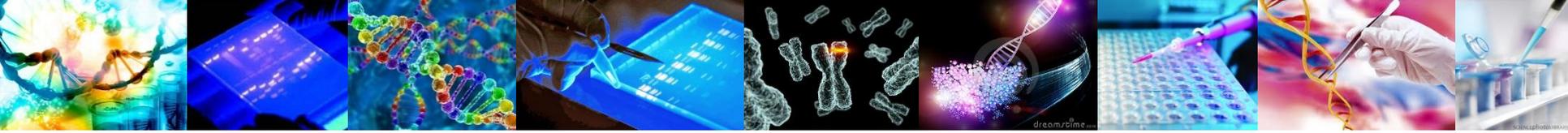
Genes amplificados na PCR

- Qualquer gene pode ser amplificado desde que os iniciadores corretos sejam utilizados
- Amplificação mais comum: fins taxonômicos – DNA ribossomal
- DNA ribossomal: codifica RNA ribossomal
- Todos os seres vivos possuem ribossomos

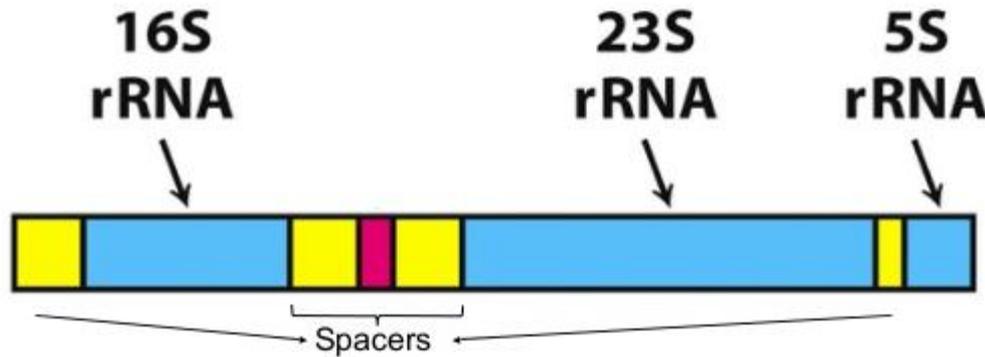


Genes amplificados na PCR – DNA ribossomal



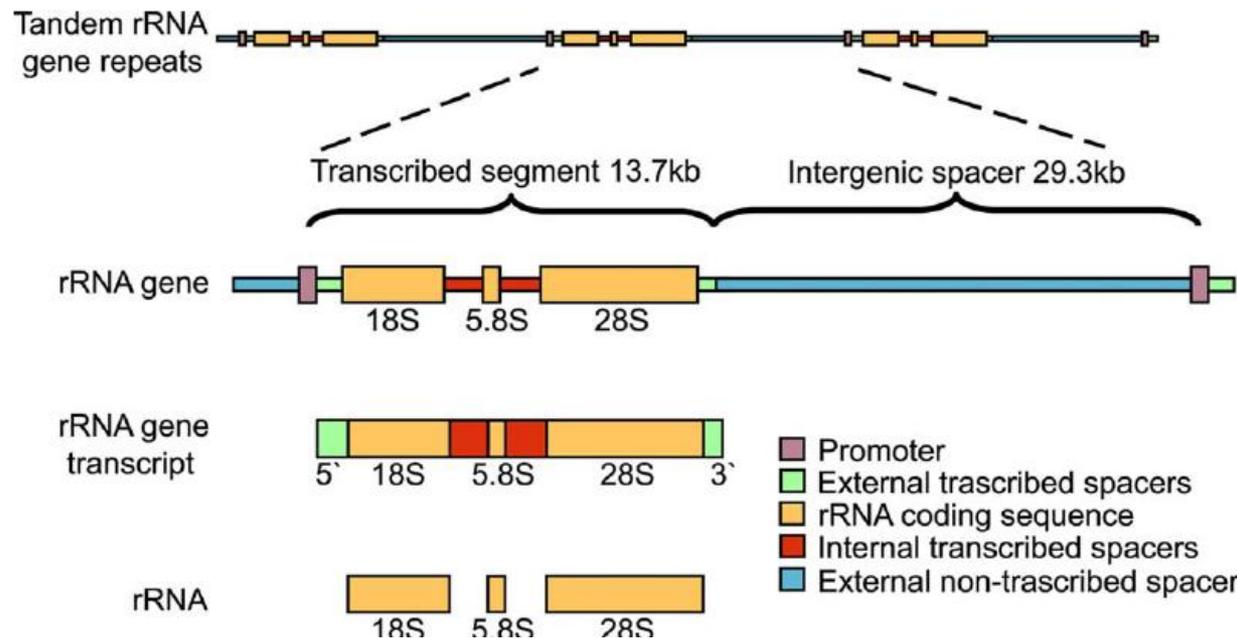


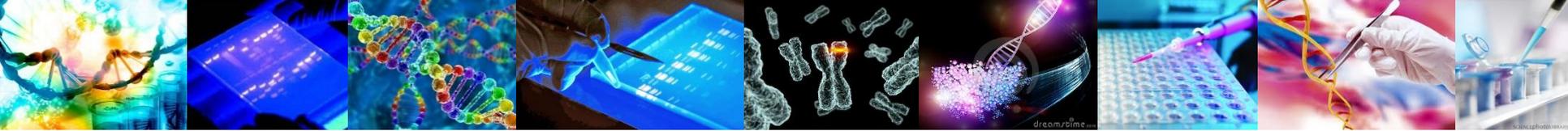
DNA ribossomal Procarioto x Eucarioto



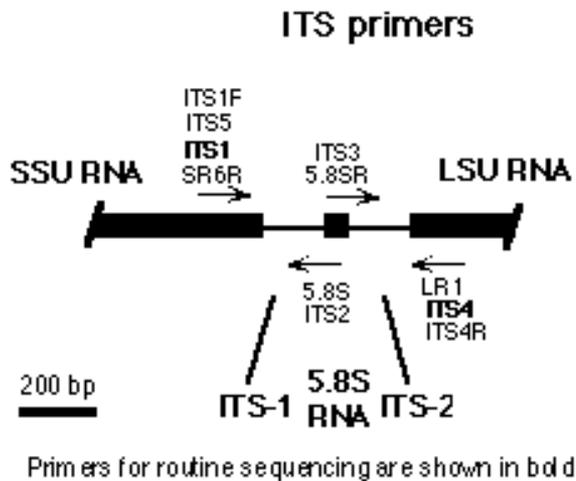
rDNA procarioto:
gene mais utilizado: 16S

rDNA eucarioto: genes mais utilizados: ITS e 28S

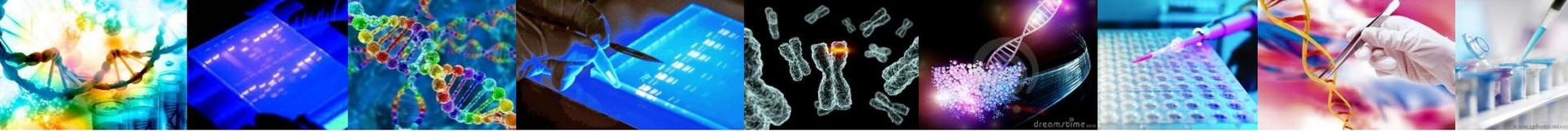




DNA ribossomal – Iniciadores Região ITS de Eucariotos

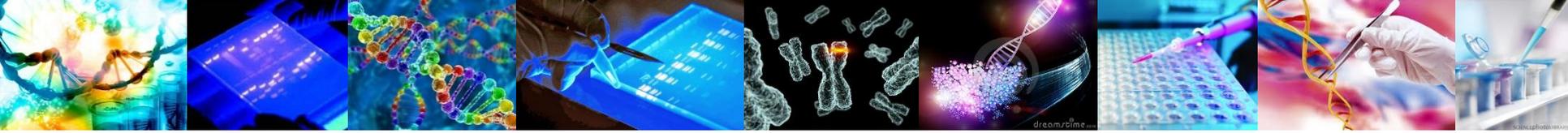


| Iniciador | Sequência (5'->3') | Referência |
|-----------|-------------------------|---------------------|
| ITS1 | TCCGTAGGTGAACCTGCGG | White et al., 1990 |
| ITS2 | GCTGCGTTCTTCATCGATGC | White et al., 1990 |
| ITS3 | GCATCGATGAAGAACGCAGC | White et al., 1990 |
| ITS4 | TCCTCCGCTTATTGATATGC | White et al., 1990 |
| ITS5 | GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG | White et al., 1990 |
| ITS1-F | CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA | Gardes; Bruns, 1993 |
| ITS4-B | CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG | Gardes; Bruns, 1993 |



Visualização dos produtos de PCR - Eletroforese

- Separação de moléculas mediante sua migração em um determinado gel durante a aplicação de uma diferença de potencial
- As moléculas são separadas de acordo com o seu tamanho, sendo que as de menor massa migram mais rapidamente
- É comumente utilizada para a separação de proteínas e ácidos nucleicos (DNA e RNA)
- É realizada em géis de poliacrilamida ou agarose

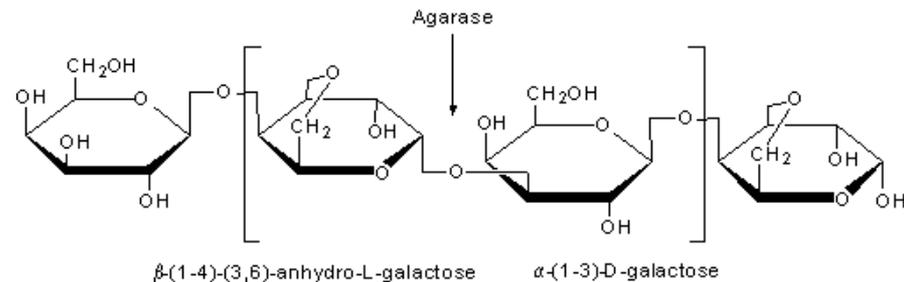
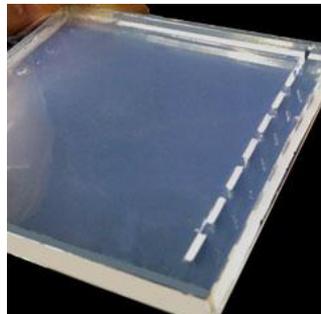
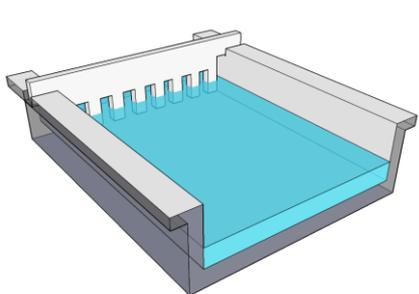
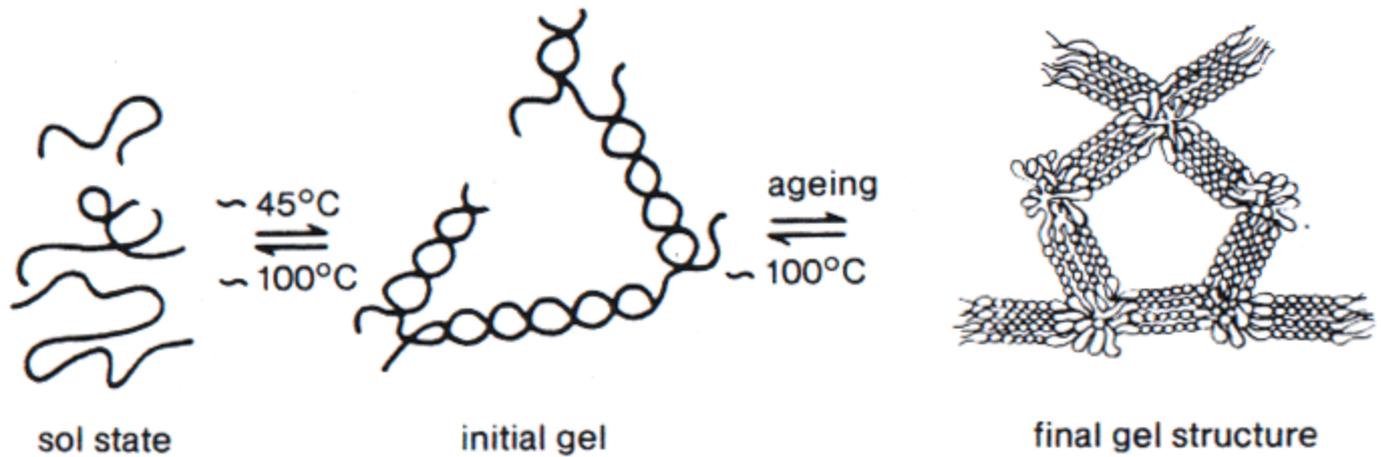


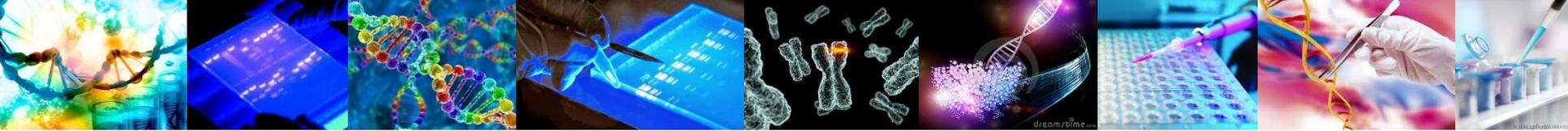
Eletroforese em gel de agarose

Agarose = polímero polissacarídico (D-galactose e 3,6-anidro-L-galactopirranose)

Agarose gelifica - não há polimerização!

% de agarose no gel varia com a amostra em análise



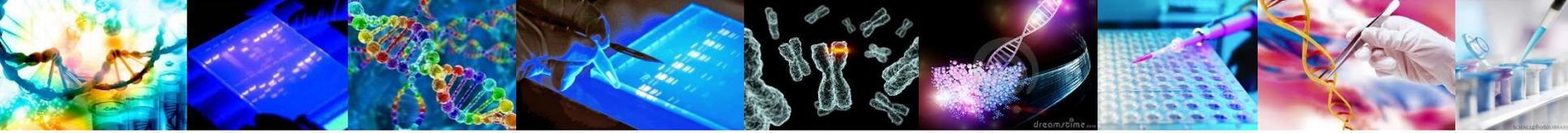


Eletroforese em gel de agarose

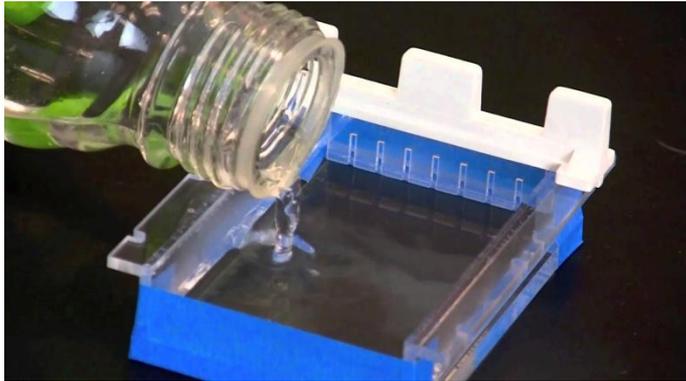
- Equipamento = Cuba de eletroforese



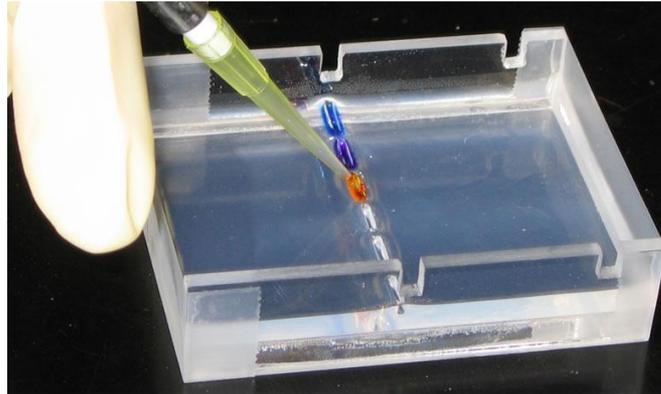
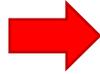
**Gel = Agarose + TBE (Tris-
Ácido Bórico – EDTA)**



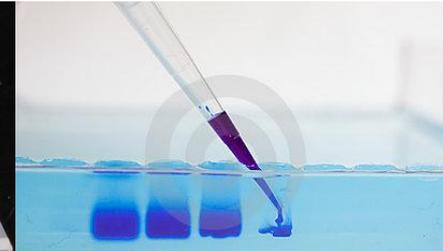
Eletroforese em gel de agarose



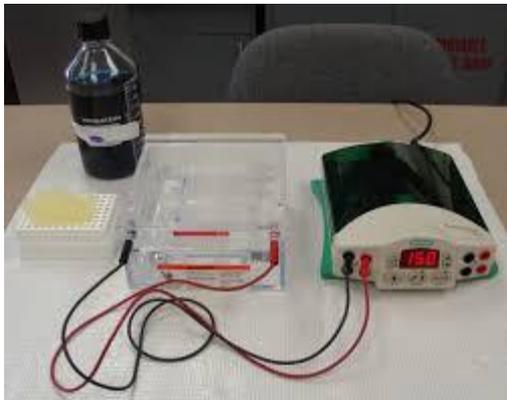
Preparo do gel



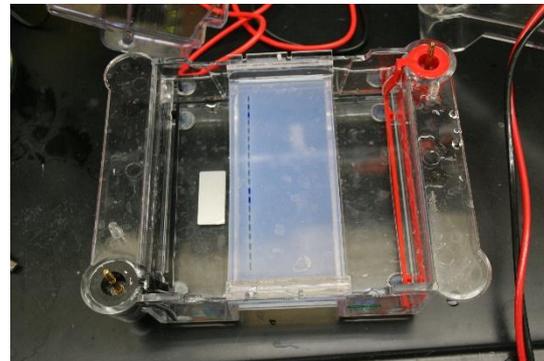
Aplicação da amostra de DNA no Gel (DNA + Corante + intercalante + glicose)

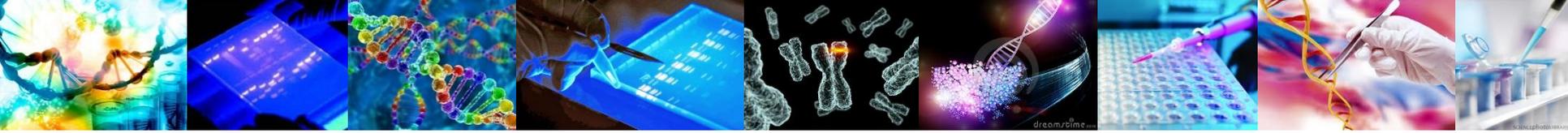


Posicionar o gel na cuba e cobrir com TBE

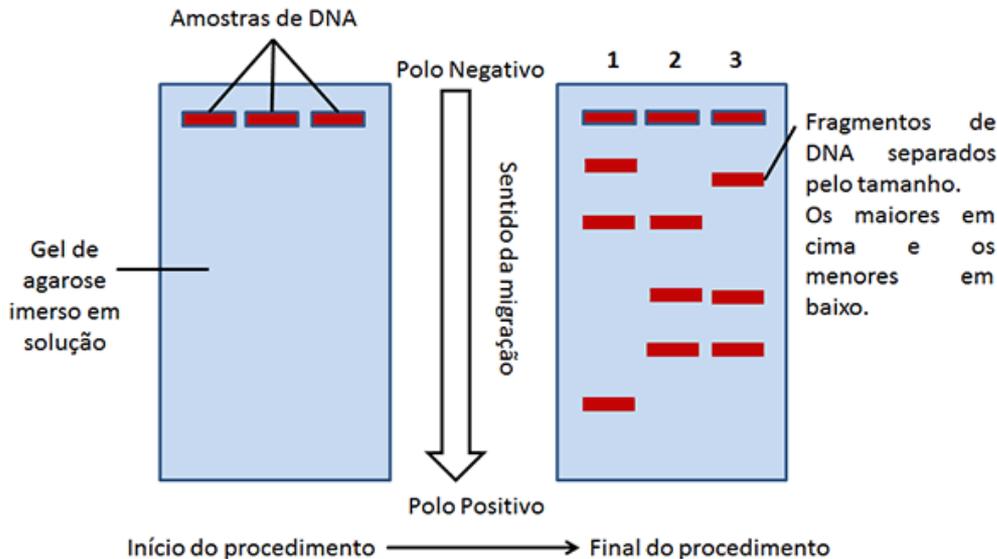
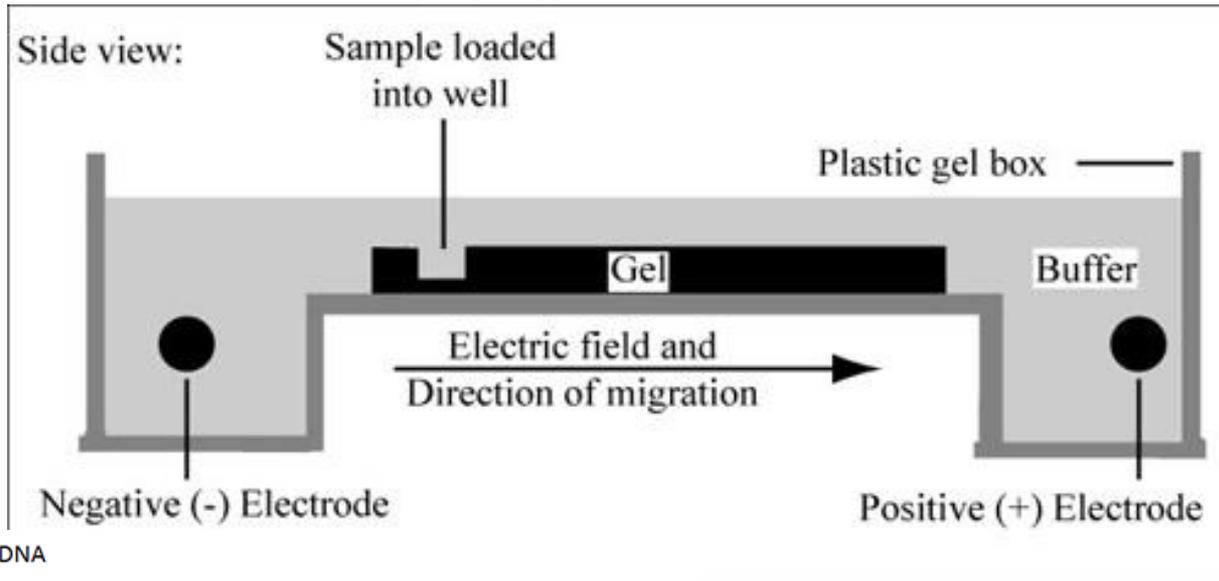


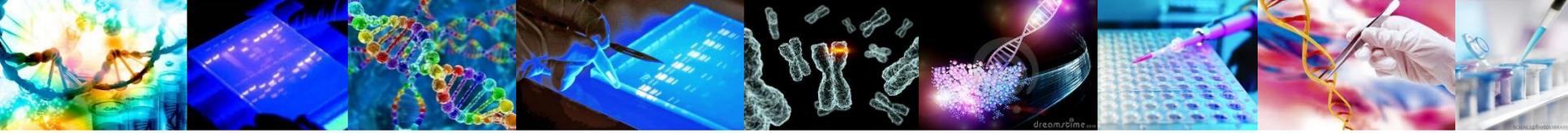
Ligar à cuba à uma fonte de energia para aplicação do potencial





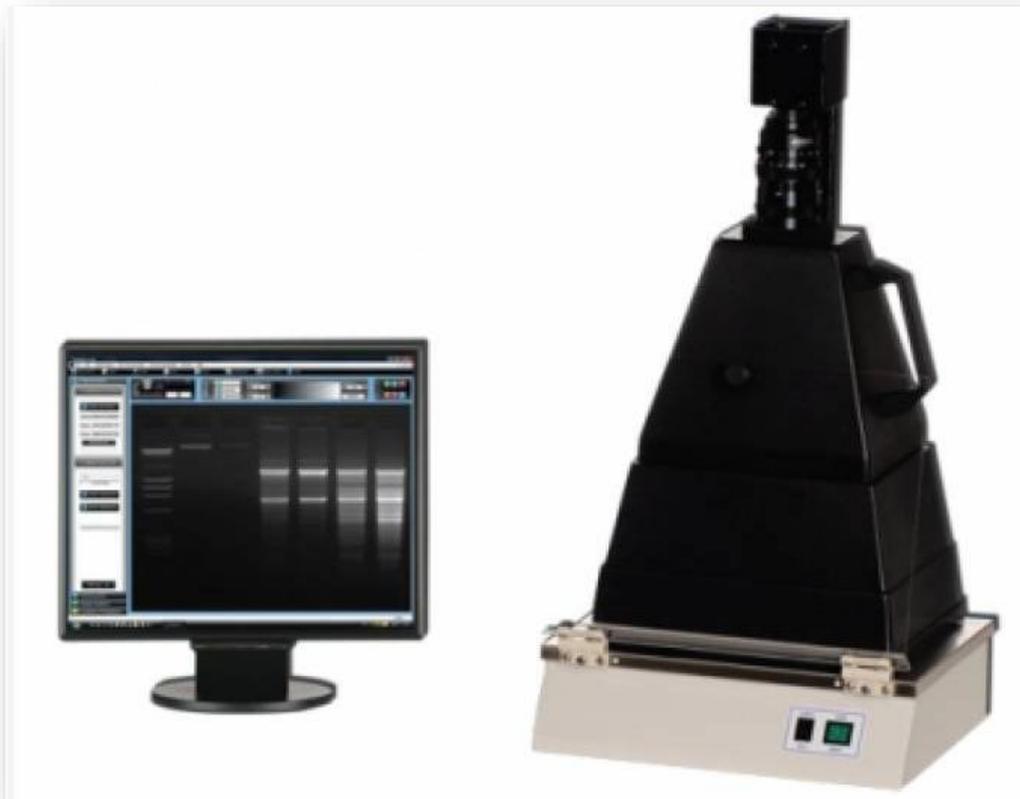
Eletróforese em gel de agarose

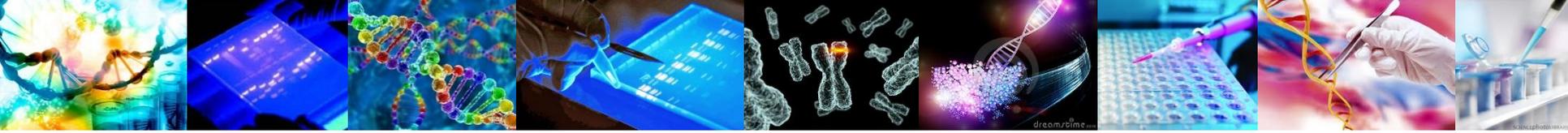




Eletroforese em gel de agarose

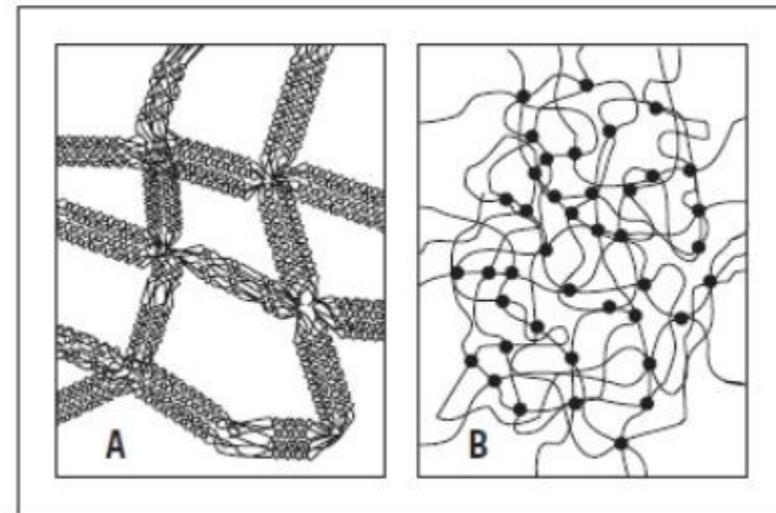
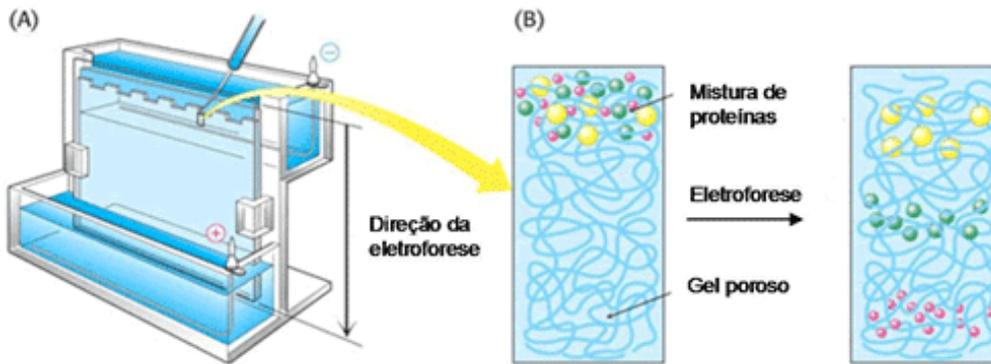
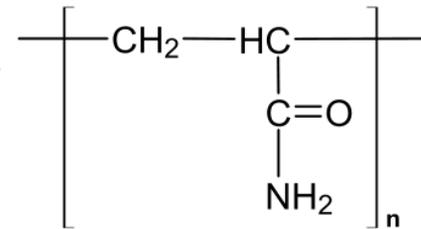
- Visualização das bandas em transiluminador ultravioleta

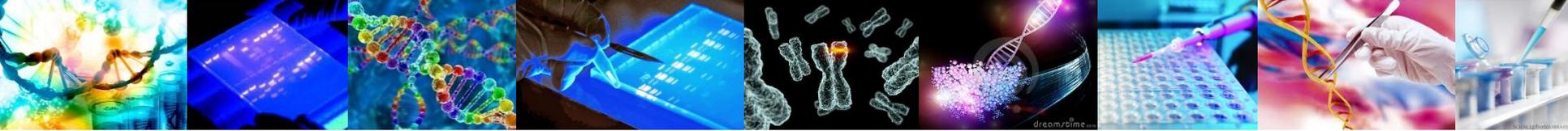




Eletroforese em gel de poliacrilamida

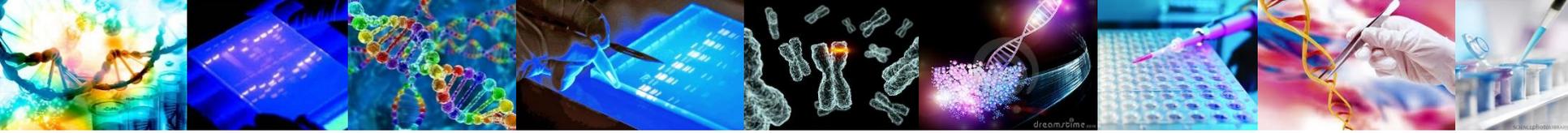
- Os princípios são os mesmos da eletroforese em gel de agarose
- A poliacrilamida polimeriza = acrilamida + bisacrilamida
- Garante maior resolução na separação das bandas
- Géis verticais



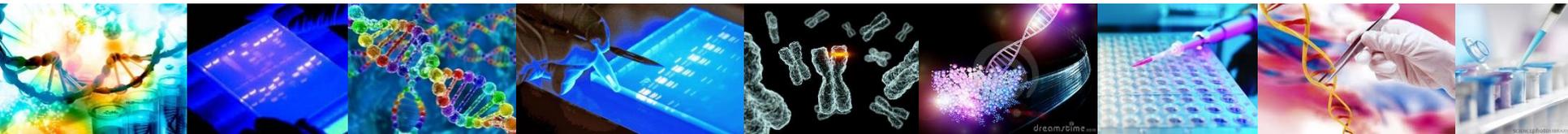
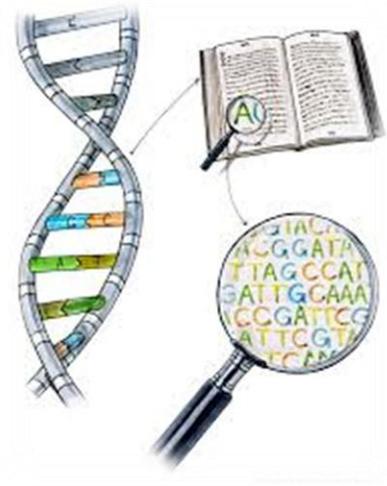


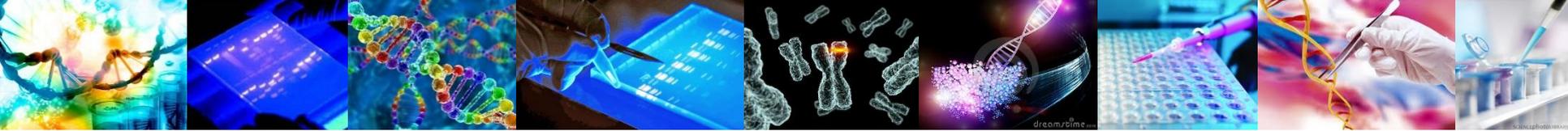
TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR BASEADAS NA UTILIZAÇÃO DA PCR

- Sequenciamento de DNA
- Técnicas de *fingerprinting* genético
 - Microssatélite
 - RAPD
 - DGGE
 - ARDRA



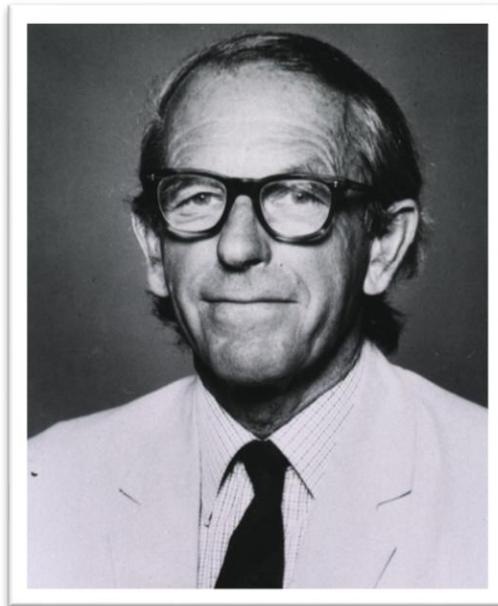
Sequenciamento de DNA



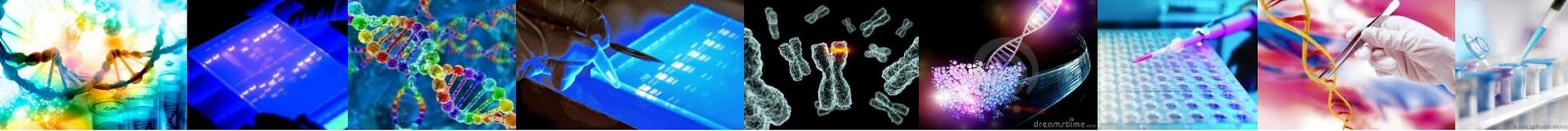


Sequenciamento de DNA

- Determinação da ordem precisa dos nucleotídeos em uma molécula de DNA
 - Determinar a ordem das bases nitrogenadas
- Método tradicional – Método Didesoxi de Sanger (1980)

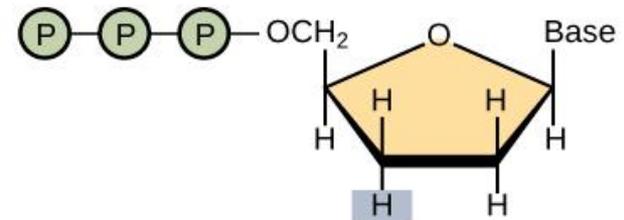


Frederick Sanger

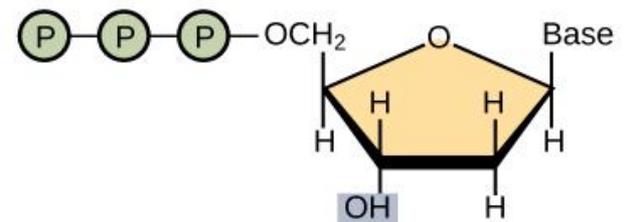


Sequenciamento de DNA – Método de Sanger

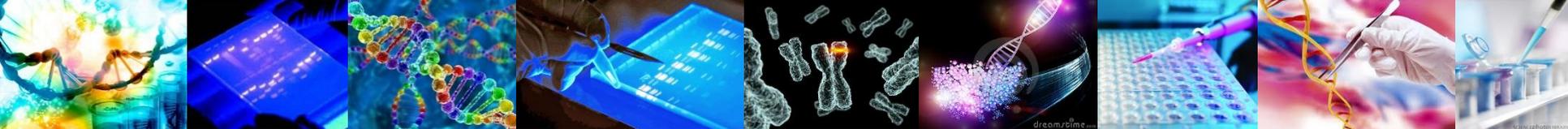
- Novas reações de PCR, porém com nucleotídeos normais e modificados
- Iniciadores unidirecionais: primers F ou R
- Nucleotídeos modificados:
Didesoxinucleotídeos: interrompem
elongação da fita de DNA
- Marcados radioativamente



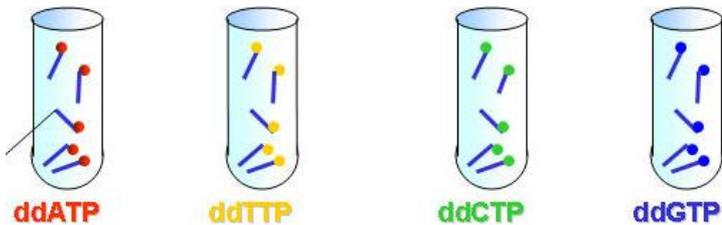
Dideoxynucleotide (ddNTP)



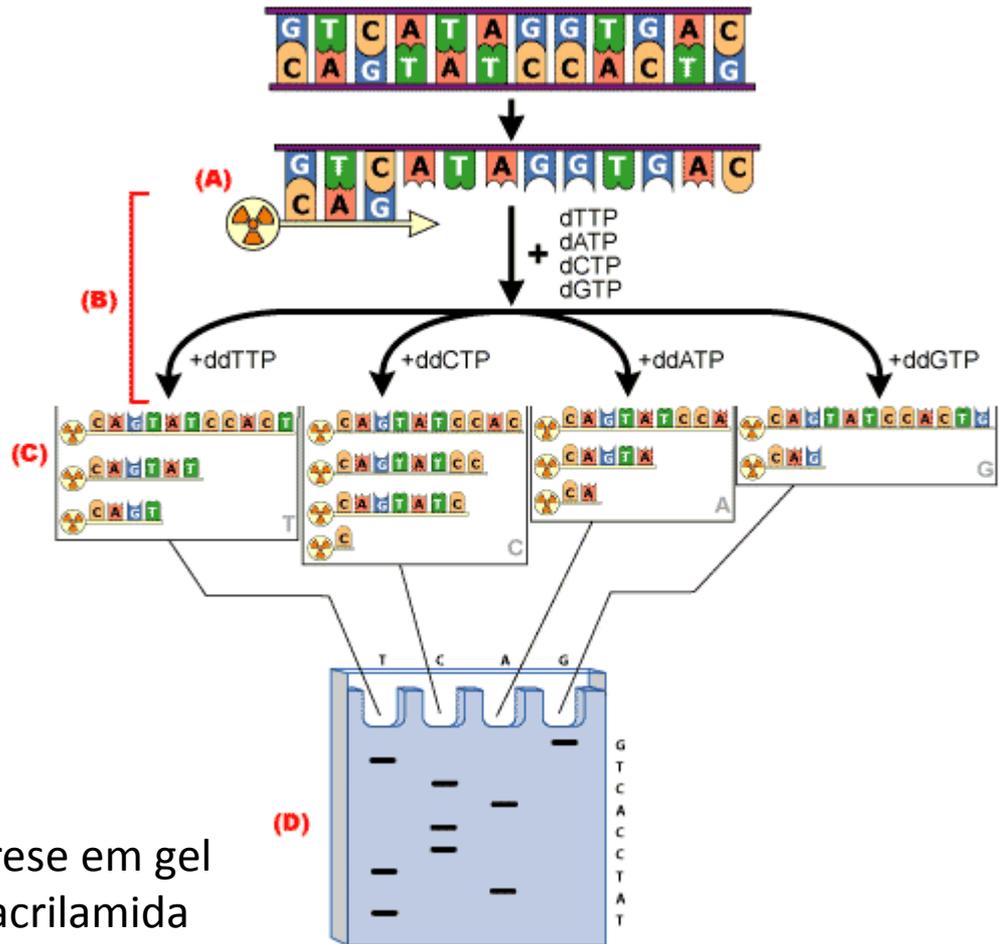
Deoxynucleotide (dNTP)



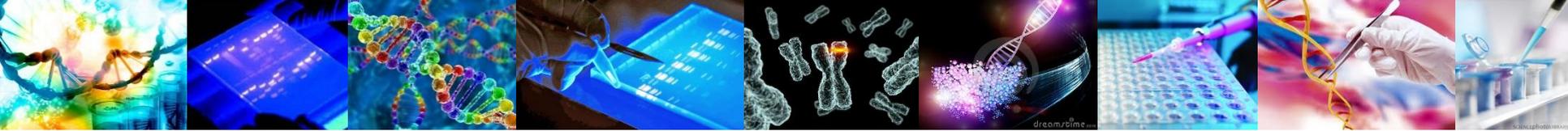
Sequenciamento de DNA – Método de Sanger



- DNA molde
- Iniciador
- Taq polimerase
- dNtps (nucleotídeos normais)
- ddNtps (modificados)
- MgCl₂
- Tampão

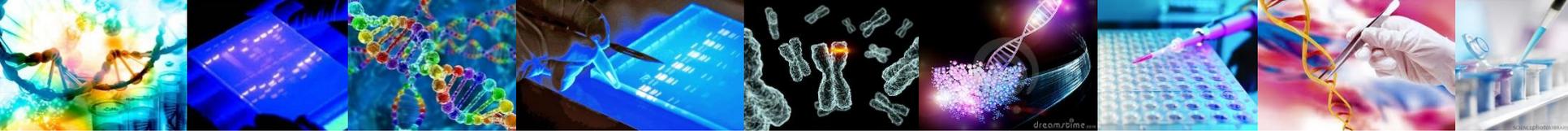


Eletroforese em gel de poliacrilamida



Sequenciamento de DNA – Método Automático

- Reações baseadas no método de Sanger – polimerização em cadeia de uma fita simples
- Nucleotídeos modificados marcados com fluorescência distinta
 - Não são necessárias quatro reações separadas: todos os nucleotídeos em uma mesma reação
- Eletroforese capilar em gel capilar de poliacrilamida
- Leitura por espectroscopia de fluorescência (laser)
- Gera gráfico - eletroferograma



Sequenciamento de DNA – Método Automático

DNA Fragments with Dye Terminators
(Smaller fragments pass through the capillary first)

A A T G C A G C T T C G

A A T G C A G C T T C

A A T G C A G C T T

A A T G C A G C T

A A T G C A G C

A A T G C A G

A A T G C A

A A T G C

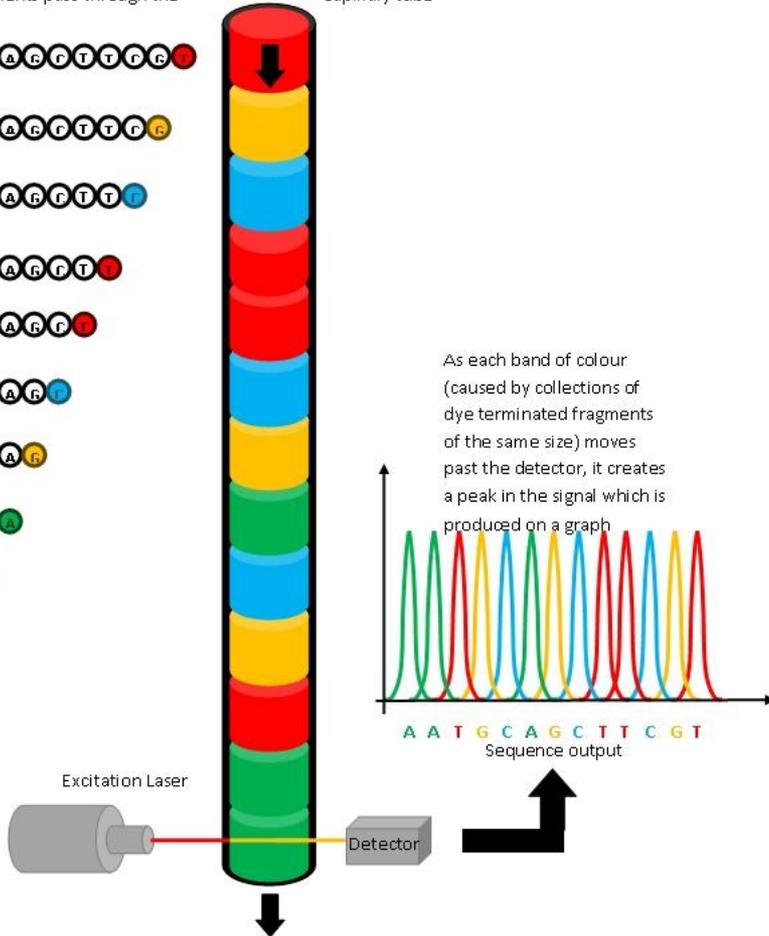
A A T G

A A T

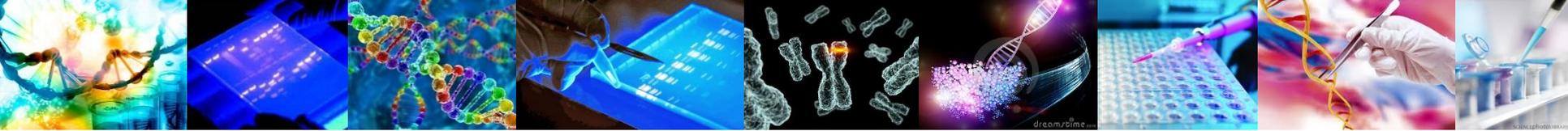
A A

A

Capillary tube

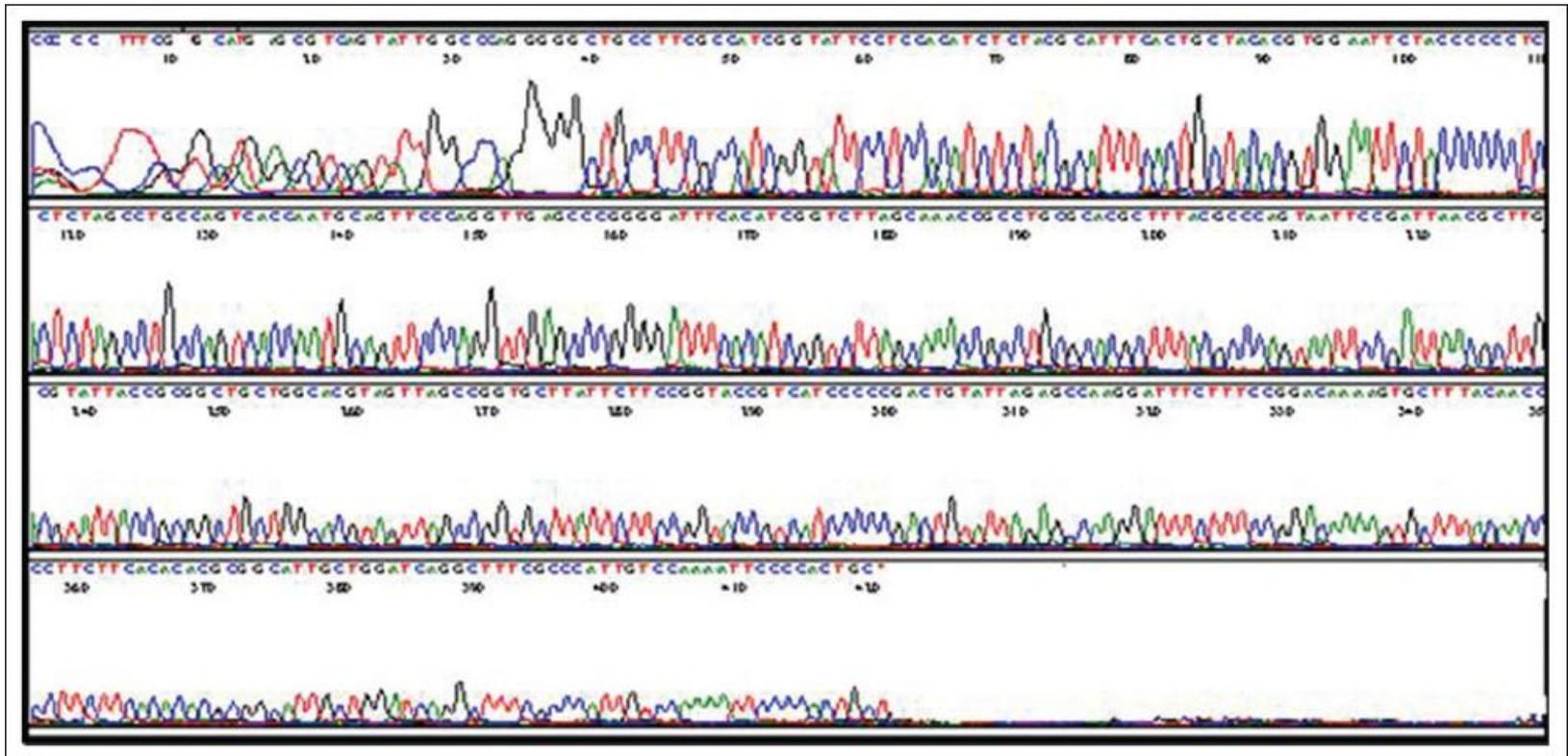


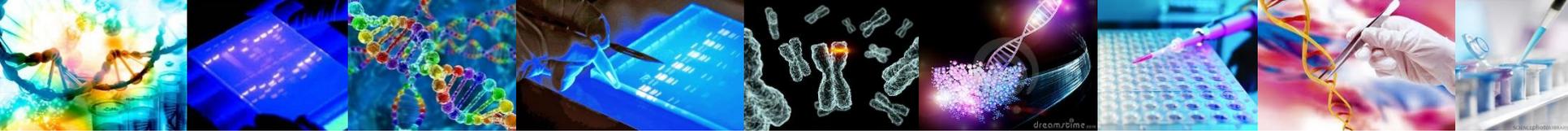
- Método efetivo e muito utilizado
- Custo elevado
- Leitura de sequências longas (em média até 2000 pares de bases)



Análise das sequências de DNA

- Qualidade – picos elevados e definidos
- Geralmente o início e fim das sequência são de baixa qualidade





Análise das sequências de DNA

- Edição das sequências em softwares
 - Bioedit
- Comparação das sequências com outras em bancos de dados
 - NCBI – Genbank
 - Uso da ferramenta Blast

The screenshot shows the NCBI BLAST website. At the top, there are logos for NIH (U.S. National Library of Medicine) and NCBI (National Center for Biotechnology Information), along with a "Sign in to NCBI" link. The main heading is "BLAST" with a registered trademark symbol. Navigation links include "Home", "Recent Results", "Saved Strategies", and "Help".

Basic Local Alignment Search Tool

BLAST finds regions of similarity between biological sequences. The program compares nucleotide or protein sequences to sequence databases and calculates the statistical significance. [Learn more](#)

NEWS

Magic-BLAST 1.1.0 available

The new version offers support for HTTPS, accession.version as the primary sequence identifier, and fixes problems with SAM flag values.

Mon, 07 Nov 2016 09:00:00 EST [More BLAST news...](#)

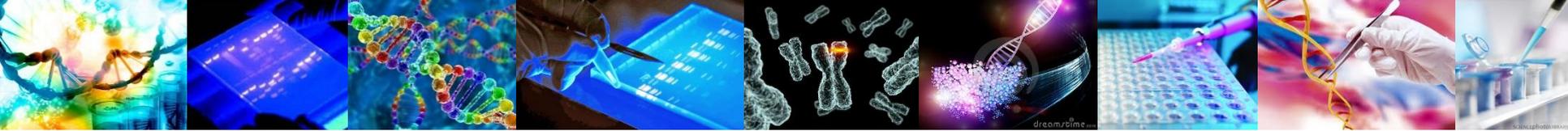
Web BLAST

Nucleotide BLAST
nucleotide ▶ nucleotide

blastx
translated nucleotide ▶ protein

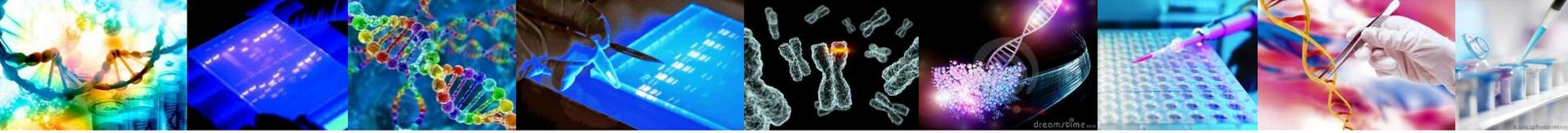
tblastn
protein ▶ translated nucleotide

Protein BLAST
protein ▶ protein

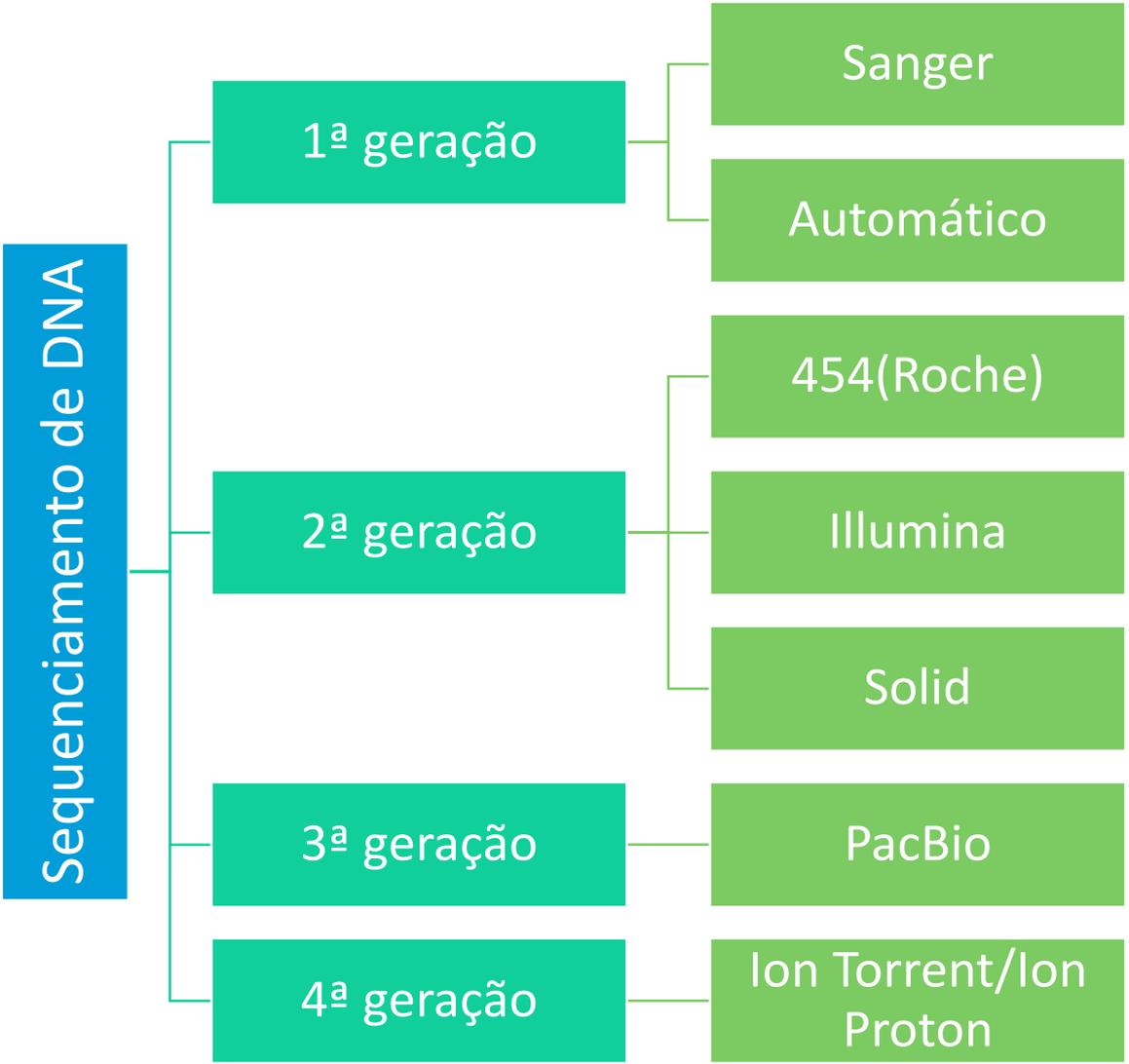


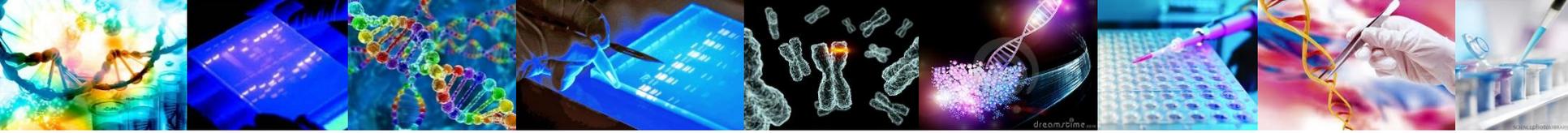
Sequenciamento de DNA – Nova geração

- Os métodos de nova geração (2^a, 3^a e 4^a gerações) visam tornar o sequenciamento de DNA mais rápido, mais barato, mantendo a confiabilidade das sequências obtidas
- As tecnologias atuais permitem o sequenciamento de genomas completos de micro-organismos em questão de horas
- Porém, exigem o acoplamento de softwares e hardwares de grande capacidade de processamento
 - Geram sequências curtas em grande quantidade

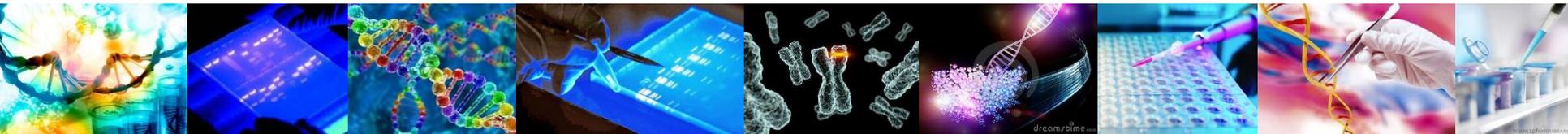


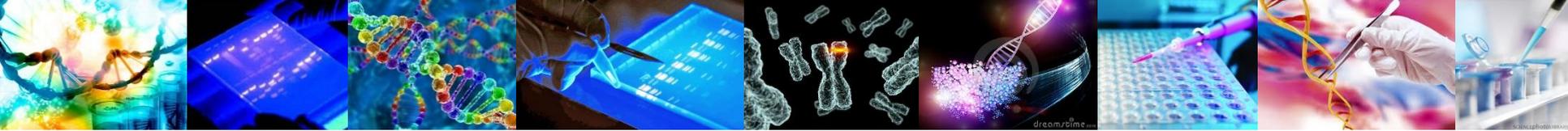
Sequenciamento de DNA – Nova geração





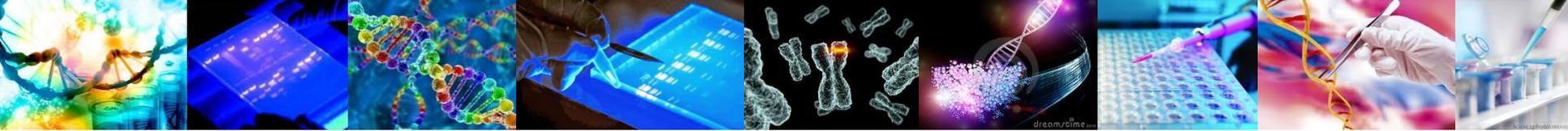
Métodos de *fingerprinting* genético





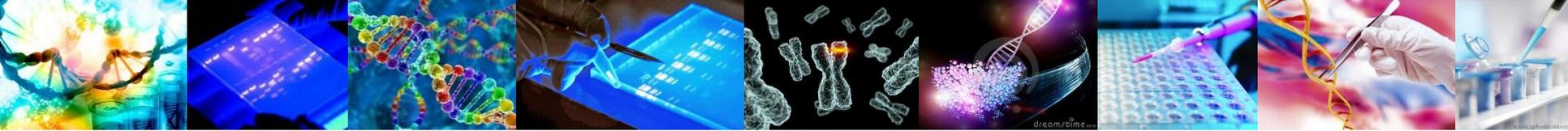
Métodos de *fingerprinting* genético

- O DNA tem a mesma composição química nos seres vivos, o que muda é a sequência dos pares de bases
- As técnicas de *fingerprinting* visam elucidar essas diferenças mediante o uso da técnica de PCR associada à diversos aspectos metodológicos
- A visualização é feita em gel de agarose ou poliacrilamida: Cada técnica leva à geração de padrões de bandas que variam entre os diferentes grupos de organismos



Métodos de *fingerprinting* genético - Utilidade

- Testes de paternidade
- Identificação criminal
- Análises forenses
- Identificação de doenças
- Análises em processos industriais
- Diferenciação de micro-organismos
 - Diversidade genética
 - Comportamento ao longo do tempo
- Etc.

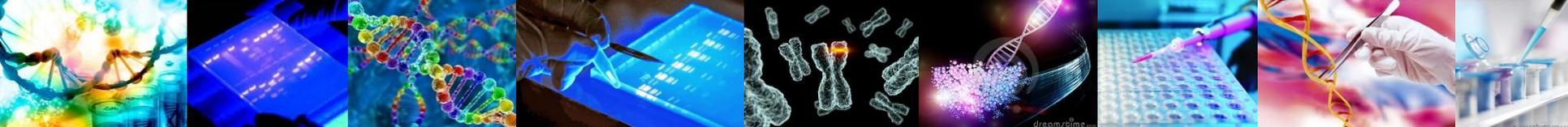


Métodos de *fingerprinting* genético

Podem ser baseados na técnica de PCR, e no uso em conjunto da mesma com processos de restrição enzimática do DNA

Etapas

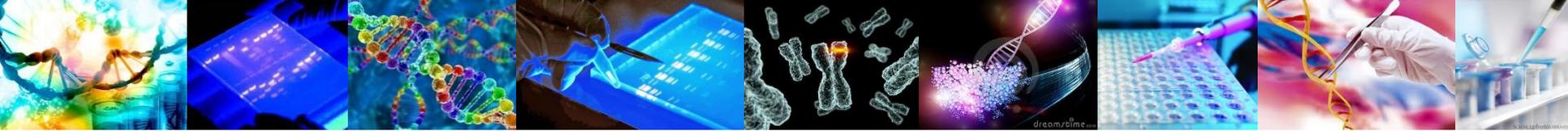
1. Extração do DNA
2. Amplificação do DNA alvo (marcadores genéticos) e/ou digestão com enzimas de restrição
3. Visualização em gel de agarose ou poliacrilamida
4. Análise dos perfis de bandas



Microssatélites

Microssatélites são unidades de repetição de pares de bases do DNA

- Contém de 1 a 6 nucleotídeos repetidos *in tandem* por dezenas a centenas de vezes
- Existem em grande quantidade nos genomas eucariotos e também podem ser encontrados em procariotos
 - Foram considerados “DNA lixo”
 - Possuem altas taxas de mutação
- Formam padrões de distribuição específicos do DNA – variação entre táxons



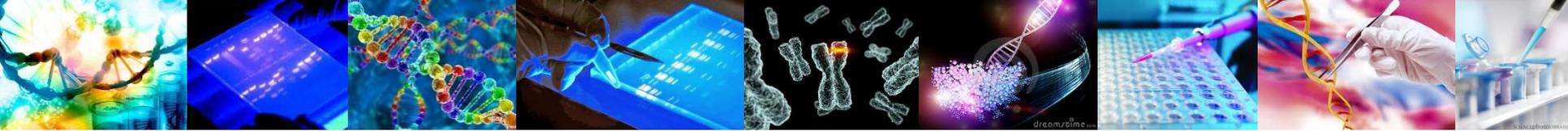
Microssatélites

- Princípio da técnica:

- Execução da técnica de PCR utilizando iniciadores para as regiões repetidas (microssatélites) – contém entre 15 e 30 pares de bases

- (GTG)₅
- (CTG)₅
- (ACG)₅
- (GACA)₄

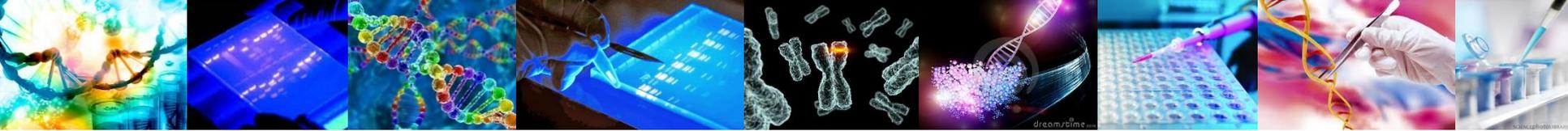
Aplicação em gel de agarose ou poliacrilamida



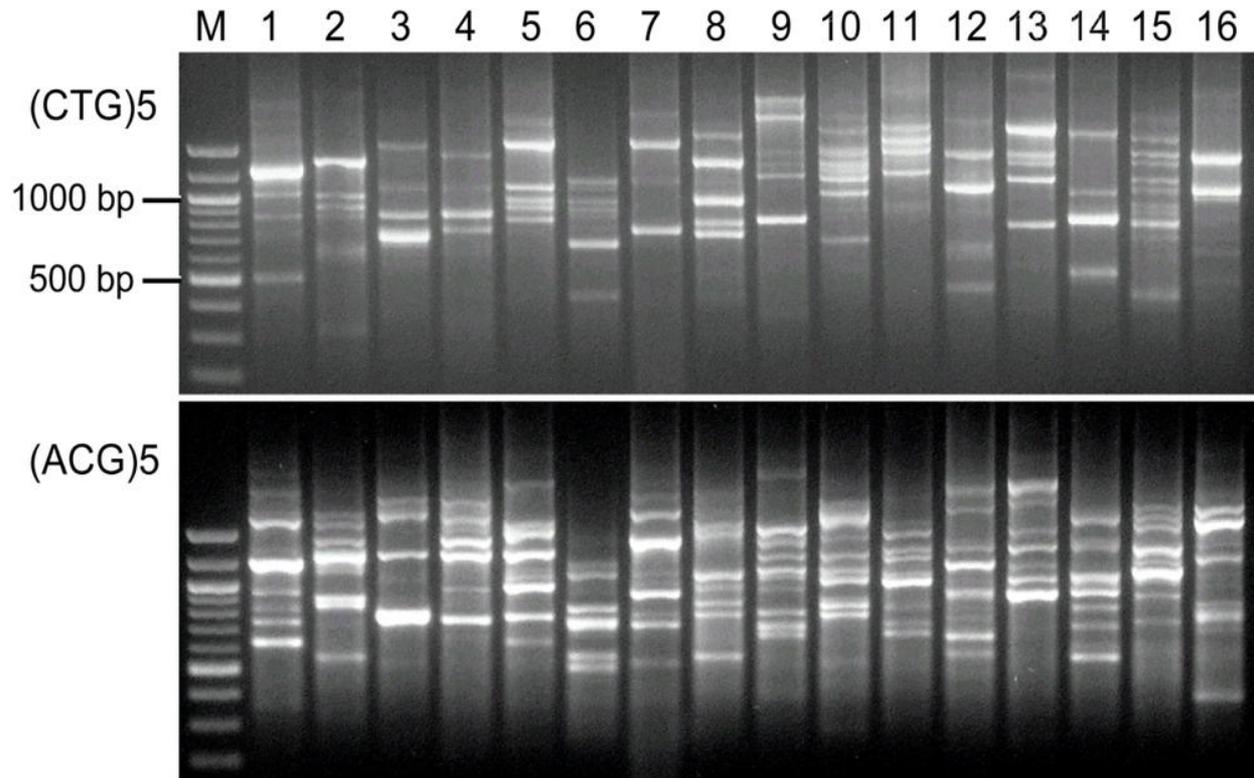
Microssatélites



Gel de Microssatélite de isolados de *Cladosporium* sp. Utilizando iniciador (GACA)₄

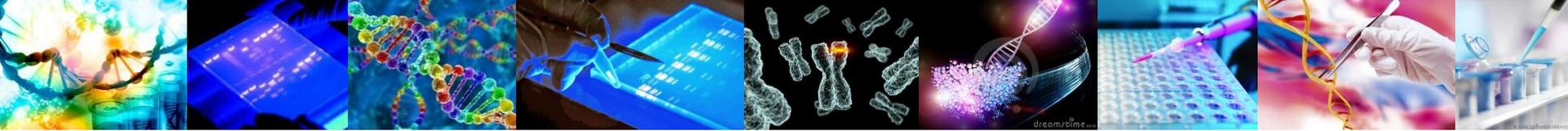


Microssatélites



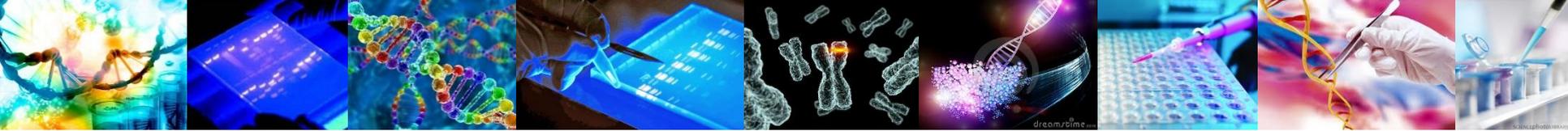
Bahkali et al. (2012)

Figure 1. DNA fingerprinting profiles amplified from 16 different common phytopathogenic fungal species using the two newly designed primers (CTG)5 and (ACG)5. Twenty μL of PCR products were separated by electrophoresis on a 1.5% agarose gel for 1.5 h at 7.0 V/cm^2 . Lanes 1 to 16 are *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, *F. solani*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *Macrophomina phaseolina*, *Trichoderma harizinum*, *Stagonospora nodorum*, *Septoria tritici*, *Pyrenophora tritici-repentis*, *P. teres*, *Pseudocercospora herpotrichoides*, *Penicillium* sp., *Alternaria* sp., *Cercospora beticola*, *Chaetomium* sp. M is the 100-bp DNA ladder.



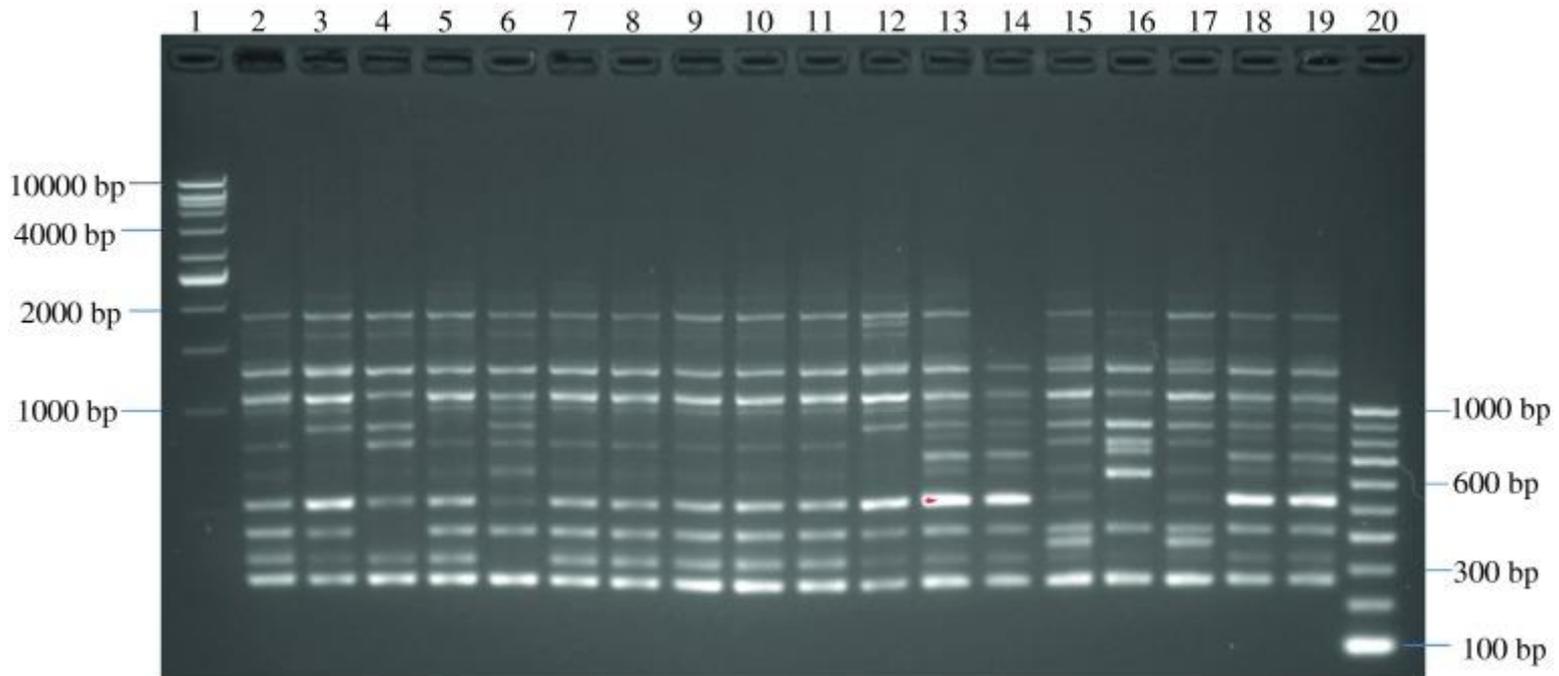
RAPD - Randomly Amplified Polimorphic DNA

- Princípio da técnica:
 - Utilização de iniciadores inespecíficos que se anelam em diversas regiões ao longo o DNA genômico
 - Iniciadores curtos: 8 a 12 pares de bases
 - Para cada linhagem/indivíduo a quantidade e o tamanho dos fragmentos de DNA amplificados oriundos do anelamento inespecífico será diferente

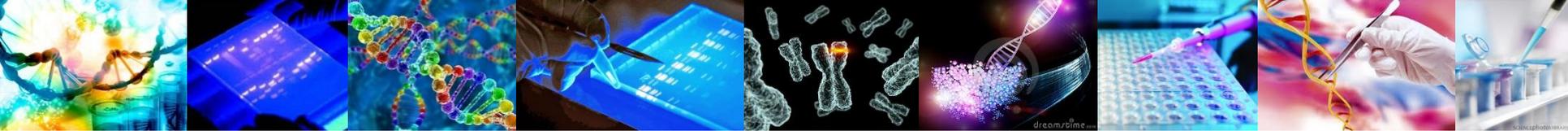


RAPD - Randomly Amplified Polimorphic DNA

Adzitey et al., 2013

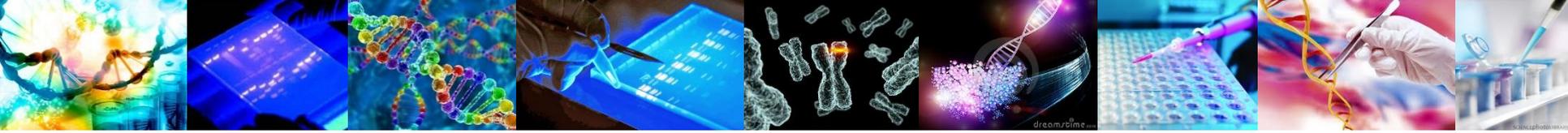


Representative RAPD agarose gel showing DNA fingerprints of Salmonella strains. Lane 1, 1 kb DNA ladder; lanes 2–19, Salmonella strains isolated from ducks and their environmental samples; lane 20, 100 bp DNA ladder

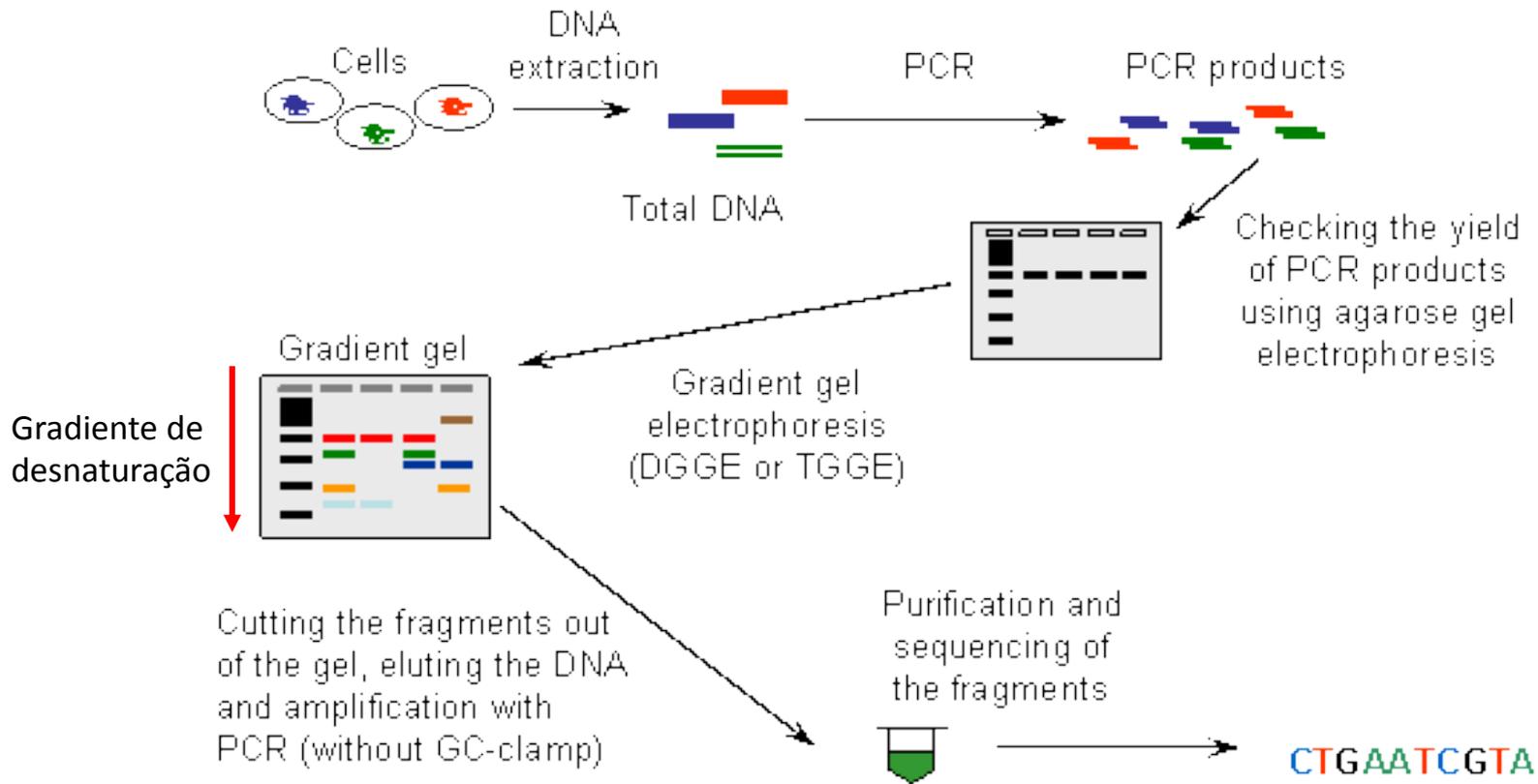


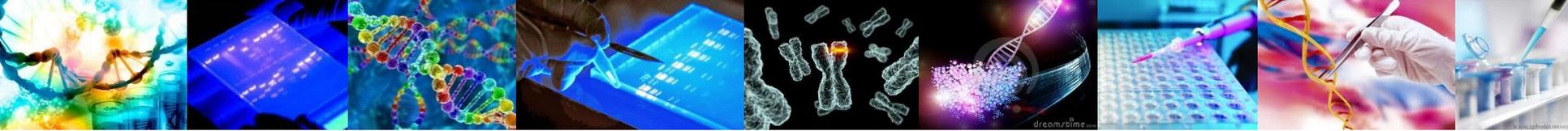
DGGE - Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

- Muito utilizada na caracterização de comunidades microbianas
- Princípio da técnica
 - PCR convencional com DNA genômico total extraído de amostras ambientais – geralmente com iniciadores para DNA ribossomal
 - Iniciadores com grampo GC
 - Aplicação dos produtos de PCR em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes de DNA (ureia e formamida) em gradiente crescente
 - Separação de fragmentos com diferença de um par de base
 - Cada banda = uma população
 - Excisão das bandas - sequenciamento



DGGE - Denaturing Gradient Gel Electrophoresis





DGGE - Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

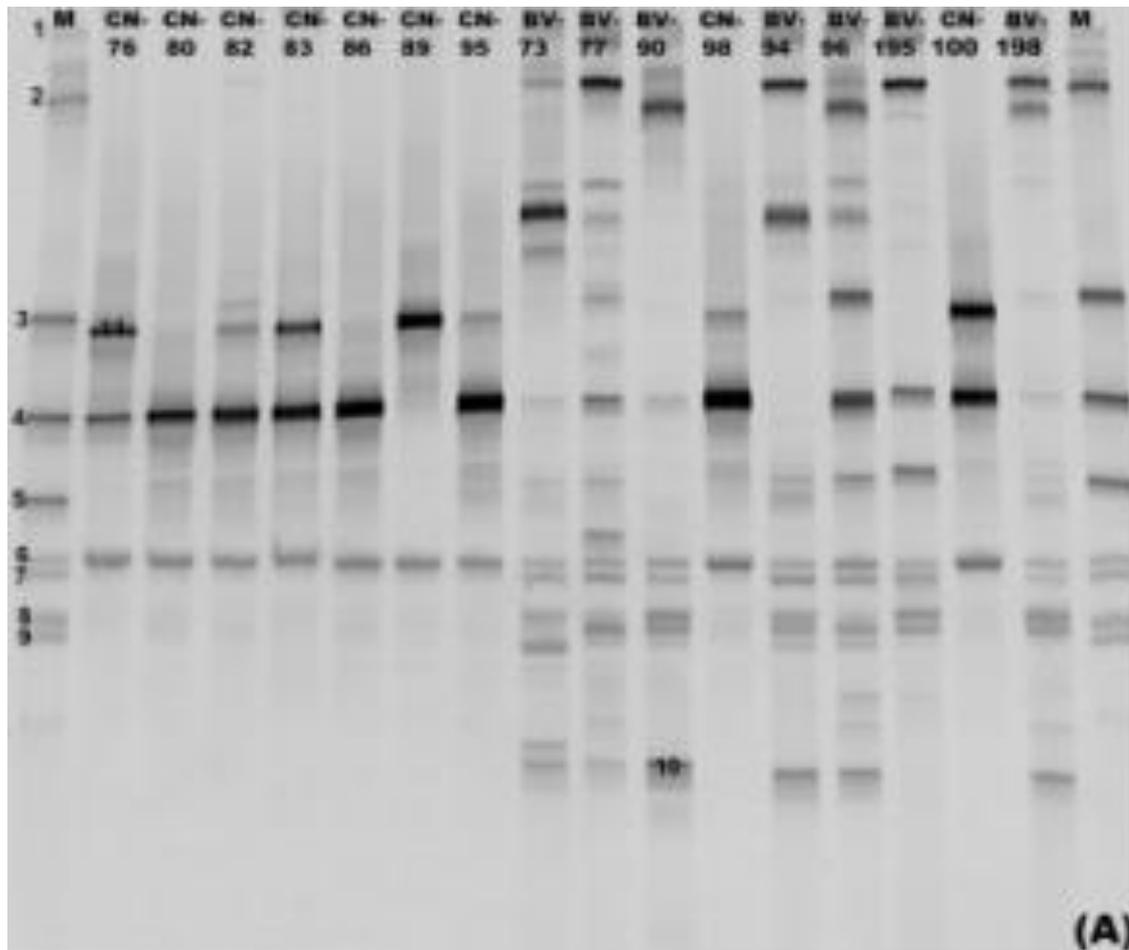
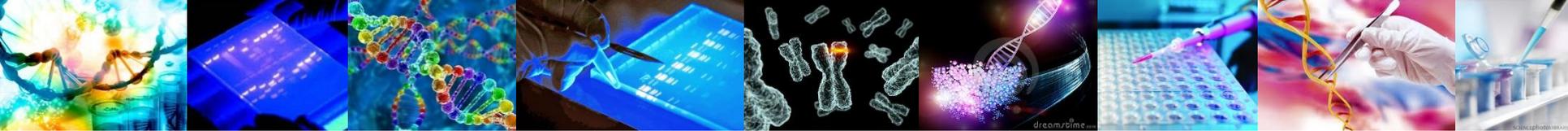


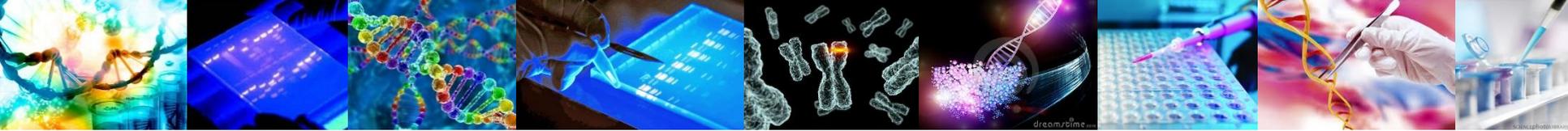
Figure 1: Figure 1 PCR-DGGE analysis of the predominant bacterial communities in vaginal swabs from bacterial vaginosis (BV group) and healthy women (CN group). (A) Each lane of the PCR-DGGE gel represented one subject which was selected in its group at random. M represents a marker constructed in this study with the identified bands to facilitate the interpretation of the figure. Bands: 1: Uncultured *Sneathia* sp.; 2: *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586; 3: *Clostridium thermocellum* ATCC 27405; 4: *Lactobacillus iners*; 5: *Clostridium acetobutylicum*; 6: *Lactobacillus iners*; 7: *Clostridium thermocellum* ATCC 27405; 8: *Atopobium vaginae*; 9: uncultured *Eggerthella* sp.; 10: uncultured *Megasphaera* sp.; 11: *Lactobacillus crispatus*.

kong et al., 2010



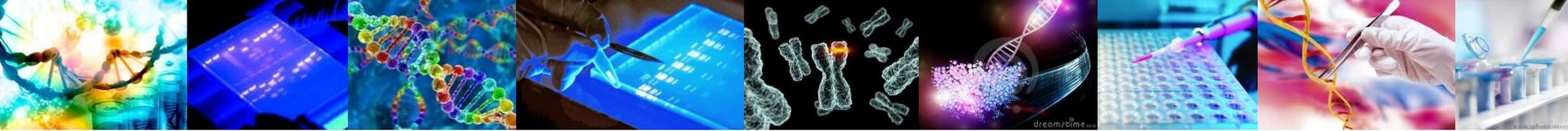
DGGE - Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

- Estudo de comparação de populações microbianas em diferentes ambientes
- Estudo de populações microbianas em um mesmo ambiente ao longo do tempo
- Estudo de populações microbianas em ambientes submetidos à alterações ambientais
 - Contaminação com poluentes
 - Petróleo e derivados
 - Agrotóxicos
 - Corantes
 - Etc.
- Estudo de populações microbianas associadas à plantas
 - Endofíticos
 - Epifíticos
 - Rizoféricos
 - Micorrízicos



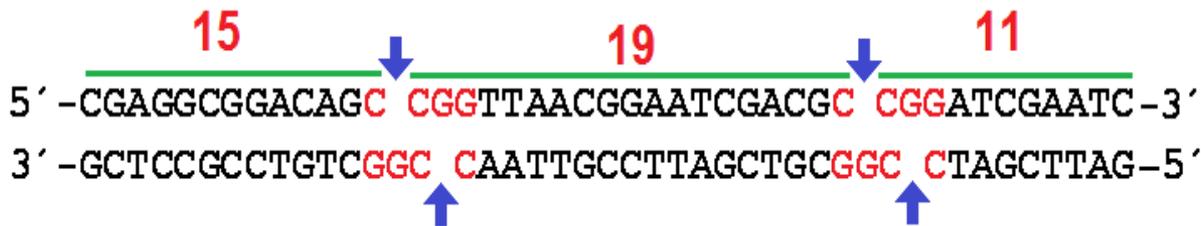
ARDRA - Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis

- Diferenciação entre isolados – separação de espécies para identificação
- Princípio da técnica
 - Realização de PCR convencional utilizando iniciadores para DNA ribossomal
 - Após a PCR, o DNA amplificado é submetido à digestão com enzimas de restrição
 - Eletroforese em gel de agarose
 - Padrões de banda diferentes indicam espécies diferentes

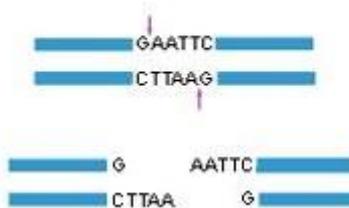


ARDRA - Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis

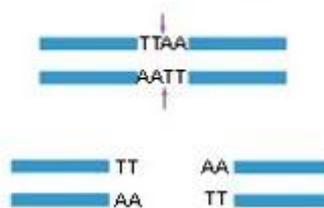
- Enzimas de restrição: reconhecem seqüências específicas do DNA e promovem a clivagem da molécula em tais pontos - tesouras biológicas
- Pontos de clivagem: seqüências palindrômicas (repetições invertidas) de 4 a 8 pares de base

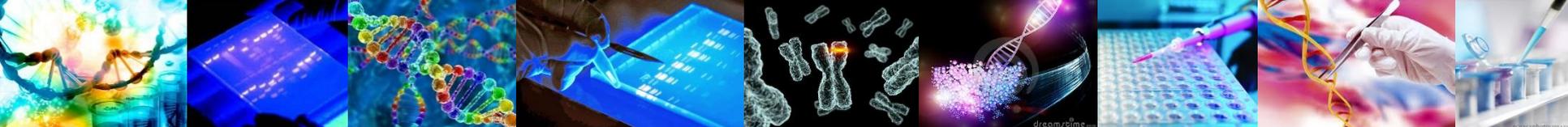


Extremidades coesivas

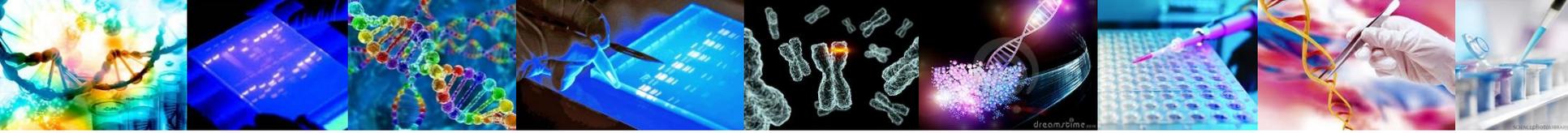


Extremidades cegas

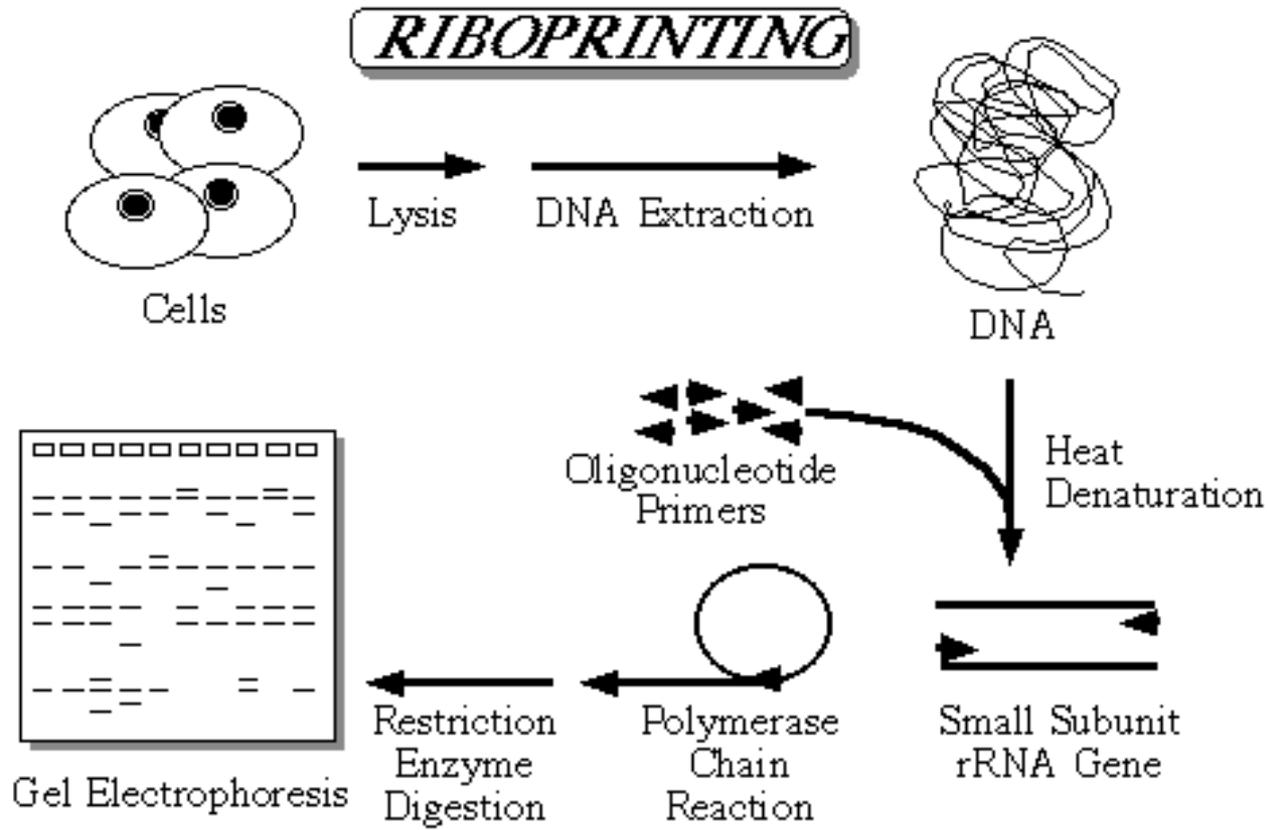


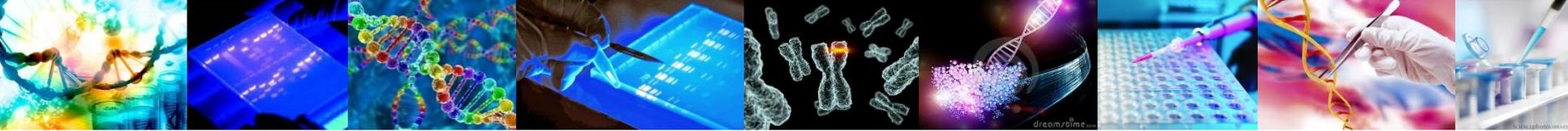


| Microorganismo | Enzima | Sequência Alvo |
|-------------------------------------|----------------|--|
| <i>Escherichia coli</i> | <i>EcoRI</i> | <pre> G A A T T C C T T A A G ↑ ↓ </pre> |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens H</i> | <i>BamHI</i> | <pre> G G A T C C C C T A G G ↑ ↓ </pre> |
| <i>Bacillus globigii</i> | <i>BglII</i> | <pre> A G A T C T T C T A G A ↑ ↓ </pre> |
| <i>Haemophilus aegyptius</i> | <i>HaeII</i> | <pre> Pu G C G C Pi Pz C G C G R ↑ ↓ </pre> |
| <i>Haemophilus aegyptius</i> | <i>HindIII</i> | <pre> A A G C T T T T C G A A ↑ ↓ </pre> |
| <i>Providencia stuartii</i> | <i>PstI</i> | <pre> C T G C A G G A C G T C ↑ ↓ </pre> |
| <i>Streptococcus albus G</i> | <i>SaII</i> | <pre> G T C G A C C A G C T G ↑ ↓ </pre> |
| <i>Thermus aquaticus</i> | <i>TaqI</i> | <pre> T C G A A C C T ↑ ↓ </pre> |
| <i>Brevibacterium albidium</i> | <i>BalI</i> | <pre> T G G C C A A C C G G T ↑ ↓ </pre> |
| <i>Haemophilus aegyptius</i> | <i>HaeIII</i> | <pre> (A G G G C T T C C G G A ↑ ↓ </pre> |
| <i>Serratia marcescens</i> | <i>SmaI</i> | <pre> C C C G G G G G C C C C ↑ ↓ </pre> |



ARDRA - Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis





ARDRA - Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis

Tian et al., 2009

Bactérias isoladas da rizosfera de plantas de tabaco

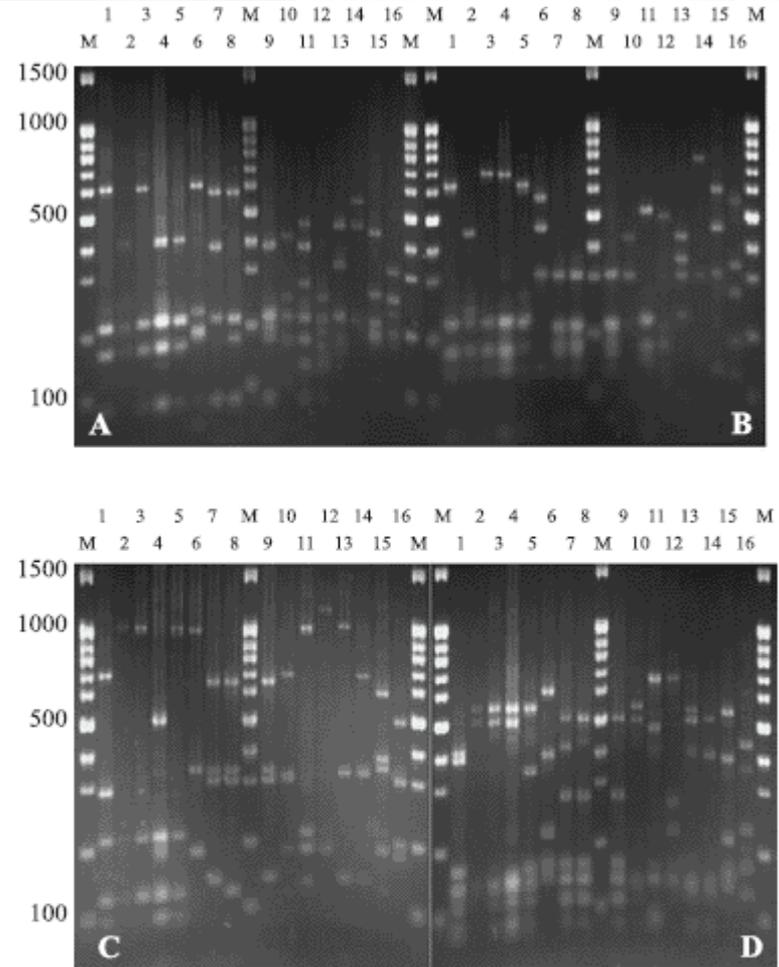


Figure 2. 16S-ARDRA patterns obtained from restriction digestion gel photos with *Alu* I, *Hae* III, *Hinf* I, and *Msp* I. Lanes (1-16) represent the ARDRA groups 1, 2, 4, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 18, 21, 24, 25, 26, and 27. Lanes M are the marker 100 bp + 1.5 kb DNA ladder; A, B, C, and D represent restriction digestion gel photos with *Alu* I, *Hae* III, *Hinf* I, and *Msp* I.

