



INSTITUTO FEDERAL
Piauí
Campus Pedro II

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO PIAUÍ
CAMPUS PEDRO II
LINCENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ELOY ISNEI NEVES MARINHO

DESENHO DE PRIMERS *IN SILICO* PARA O GENE 16S rRNA

PEDRO II

2021

ELOY ISNEI NEVES MARINHO

DESENHO DE PRIMERS *IN SILICO* PARA O GENE 16S rRNA

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial para
aprovação na disciplina de TCC II do curso
de Licenciatura de Ciências Biológicas do
Instituto Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia do Piauí (IFPI) – Campus Pedro
II.

Orientador

Prof. Dr. Willame Rodrigues.

PEDRO II

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Marinho, Eloy Isnei Neves

M338d Desenho de primers in silico para o gene 16S rRNA / Eloy Isnei Neves

Marinho. - 2021.

41 f.: il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Biológicas) -

Instituto Federal do Piauí, Campus Pedro II, 2021.

Orientador : Prof. Dr. Willame Rodrigues do Nascimento Sousa.

1. Genética - marcadores moleculares. 2. Gene 16S rRNA. 3. Bioinformática.

I. Título.

CDD - 570

Elaborado por Wirllanna Naira da Silva Torres CRB 3/1088

ELOY ISNEI NEVES MARINHO

DESENHO DE PRIMERS *IN SILICO* PARA O GENE 16S rRNA

Aprovado em 04 / 06 / 2021.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Willame Rodrigues do Nascimento Sousa
Instituto Federal do Piauí – IFPI/Campus Pedro II



Dr. Geice Ribeiro da Silva (Membro externo)
UFPI



Profa. Dra. Antônia Maria de Farias (Membro externo)

DEDICATÓRIA

Dedico primeiramente este trabalho científico, ao Dono de toda ciência e o Formador da existência DEUS e ao SENHOR, Jesus Cristo. Decido também a toda minha família, aos amigos, a todos os meus professores que fizeram, e que ainda fazem parte desta minha jornada.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente quero dar graças a Deus pelo que Ele está fazendo em vida, desde o início dela, e ajudando a todo momento, dando-me coragem, paciência, conhecimento e paz para continuar a caminhada. Em segundo, aos meus pais, que não mediram esforços para me ajudar, minha mãe Ismênia, minha primeira professora, que desde minha infância instruiu-me a estudar mesmo sem possuir uma formação, sempre foi uma pessoa batalhadora, e meu pai Edmundo, um homem de fé, olho para ele e me orgulho de tê-lo como pai. Quero também agradecer a meus familiares, meus avós, tias, primos e a toda árvore genealógica de minha família. Agradecer também aos meus amigos aos antigos, aos que ganhei ao longo da vida acadêmica, aos irmãos em Cristo e aos meus professores, professor Willame que iniciou a minha orientação na metade do curso, sempre propondo um aprimoramento pessoal em outras áreas do conhecimento principalmente bioinformática, estimulando a criatividade, me fez desafiar-me a estar sempre em evolução com o conhecimento, e sendo sempre atencioso, e um exemplo de sabedoria, agradeço a professora Esterfânia Farias que teve um papel muito importante ao me ajudar em determinadas fases do curso, com seu conhecimento e sua didática incrível, ao professor Etielle Andrade por ser um profissional exemplar em vários aspectos dedicação, comprometimento, superação e conhecimento, sou grato por alguns conselhos das poucas vezes que conversamos, e aos demais professores que fizeram parte da minha vida. Agradeço ao Diretor Raimundo Nonato pelos conselhos de sabedoria, e a todos que compõem o Campus Pedro II, que é formado por excelentes profissionais em todas as áreas dos aos servidores e todos que compõe a nossa Jóia de Campus meu mais puro e sinceros agradecimentos.

“ Confia ao Senhor as tuas obras, e teus pensamentos serão estabelecidos. ”

Provérbios 16:3

RESUMO

O gene 16S rRNA, é o mais útil para estabelecer relacionamentos distantes, por causa de seu alto conteúdo de informações, e de sua natureza conservadora para a distribuição universal. pois trata-se de um componente altamente conservado, sendo extensivamente utilizado para identificação de gêneros, espécies, e definições taxonômicas de bactérias e arqueias. Graças a sua taxa de conservação, e seu número pequeno de variações entre suas espécies, sua taxa de modificação é estimada em nove zonas hipervariáveis, que contêm dados taxonômicos consideráveis, sendo assim ideal para a filogenia. Os marcadores moleculares têm demonstrado uma grande importância em procedimentos de melhoramento genético. Neste trabalho foi utilizado o método de desenho de primers *in silico*, e as programas de bioinformática, voltadas para o alinhamento genético, foi desenhado e validado um conjunto de primers, entre as regiões de interesse do gene estudado, localizadas entre V2, V3 e V4 do gene 16S rRNA, com as informações genéticas de 33 gêneros de bactérias distintas, subdivididas e classificadas em dois grupos, gram positivo e gram negativo, Os resultados obtidos nas análises foram, dois primers com cobertura de consulta entre 100% e 81%, o par de primer ELY-1Fx ELY-R1, foi escolhido, por sua pontuação, por apresentar bases degeneradas e obter um maior número de gêneros e espécies e, foi eficaz na identificação dos organismos para a região V3, do gene 16S.

Palavras-chave: gene 16S rRNA; bioinformática; marcadores moleculares; *in silico*.

ABSTRACT

The 16S rRNA gene is the most useful to establish relations, because of its high information content, and its conservative nature for universal distribution. because it is a component too conserved, being used extensively to identify genera, species, and taxonomic definitions of bacteria and archaea. Thanks to its conservation rate, and its small number of variations between its species, its modification rate is estimated in nine hypervariable zones, which configured considerable taxonomic data, making it ideal for phylogeny. Molecular markers have a great importance in genetic improvement procedures. In this work the *in silico* primer design method was used, and the programs of bioinformatics, aimed at the genetic alignment, was found and validated a set of primers, between the interest of interest to the studied gene, going between V2, V3 and V4 of the 16S rRNA gene, with the genetic information of 33 different bacterial genera, subdivided and classified into two groups, gram positive and gram negative. The results obtained in the analyzes were, two primers with query coverage between 100% and 81%, the ELY-1Fx ELY-R1 primer pair was chosen for its score, for presenting degenerate bases and for obtaining a greater number of species genera, and it was effective in identifying organisms for the V3 region of the 16S gene.

Keywords: 16S rRNA gene; bioinformatics; molecular; *in silico* markers.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NCBI- Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia.

GenBank- É o banco de dados de sequências genéticas, uma coleção anotada de todas as sequências de DNA disponíveis, ao público.

IN SILICO- É uma expressão usada no âmbito da simulação computacional.

GAP'S e SNPs - Termo utilizado para indicar lacunas.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01: Gene 16S rRNA	17
Figura 02: Genoma bacteriano e os genes ribossomais	18
Figura 03: Árvore filogenética universal	
Figura 04: Ribossomo.....	19
Figura 05: Bioinformática, técnicas e programas	21
Figura 06: Técnica de PCR ilustrada.....	22 e 23
Figura 07: NCBI(Centro Nacional para Informação Biotecnológica	
Figura 08: Clustal Omega.....	24
Figura 09: Bioedit	
Figura 10: Primer-BLAST	25
Figura 11: Primer3Plus	
Figura 12: IDT oligo analyzer.....	26
Figura 13: Sequence Manipulation(SMS).....	27
Figura 14: Análise das formações de Hairpin do primer ELY-F1.....	32

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1: Primers desenhados.....	30
Tabela 2: Informações geradas pelo SMS produto da PCR in silico.....	33

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2.	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL:	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	16
3	REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1	MARCADORES MOLECULARES	17
3.2	GENE 16S rRNA.....	18
3.3	BIOINFORMÁTICA	21
4	METODOLOGIA	28
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
6	CONCLUSÃO	34
	REFERÊNCIAS.....	35
	ANEXOS	39

1 INTRODUÇÃO

Os marcadores moleculares têm demonstrado uma grande importância em procedimentos de melhoramento genético, que utilizam softwares. Tem aplicabilidade na classificação de novos seres vivos ou na distinção de integrantes de algum grupo filogenético, na composição dos mapas genéticos, o reconhecimento dos locos que estão relacionados aos caracteres e principalmente no monitoramento da variação genética.(DALE; CHAPARRO,1997; GRATTAPAGLIA, 1997; RIBEIRO et al., 1997).

De tal forma que a possibilidade de substituíram os marcadores morfológicos em pesquisas populacionais de seres vivos, gradativamente. Pois possuem vantagens em seu manuseio, exatidão nos prognósticos, e a sua rapidez é um dos principais fatores, que auxiliam a culturas de ciclo tardios, pois determinadas particularidades tardam anos para aparecerem em organismos. Segundo Pigatto (2001) e Lopes (2001).

Entre os tipos de alinhamento mais utilizados, encontra-se o do tipo global e o local. Para o global, o algoritmo busca o melhor alinhamento entre sequências inteiras, sendo aplicado quando se tem sequências similares e de tamanho parecido, e recomendado, por exemplo, na análise de mutações por trocas de bases. No Alinhamento local, o algoritmo busca regiões conservadas entre elas, alinhando-as, porém este possui uma maior utilidade quando se tem sequências de tamanhos diferentes (PERANCONI, 2005).

O gene 16S é consideravelmente bom pois ele codifica o RNA de bactérias e arqueas, é um componente evolutivo bem conservado, que auxilia em definições taxonômicas para identificar gêneros e espécies, com suporte nos alinhamentos de bioinformática. (CD GENOMICS, 2018).

O RNA de procariotos que possuem uma alta taxa de conservação e pequenas variações de uma espécie para outra, onde ocorrem comumente no 16S rRNA. Com base nestas diferenças, pode-se calcular as relações evolutivas, permitindo a construção de uma árvore filogenética que evidência uma possível rota evolutiva pela qual as espécies divergiram de um ancestral comum. (DALE; PARK, 2004).

O rRNA ribossômico é um carreador de informações genéticas, pois ele é encarregado de dirigir a síntese de proteínas do rRNA, que deriva do DNA contido nos cromossomos.(PEVSNER, 2009; XIONG, 2006). Deste modo os rRNAs ribossômicos, são as estruturas básicas que catalisam a síntese proteica.

Em procariotos, encontra-se a partícula de ribonucleoproteína 70S, que é composta pelas subunidades 30S, contendo o rRNA 16S e 50S, possuindo o rRNA 23S e 5S. (COX; DOUDNA; O'DONNELL, 2012; PEVSNER, 2009).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

Desenhar e validar *in silico* potenciais marcadores moleculares para região a V3 do gene 16S rRNA em procariotos dos gêneros Gram positivos e Gram negativos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Identificar regiões conservadas e variáveis no gene 16S rRNA;
- Avaliar o uso das ferramentas da bioinformática, com dados armazenados em bancos genômicos on-line, a fim de integrar potenciais marcadores moleculares *in silico*, para experimentos *in vitro*.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 MARCADORES MOLECULARES

Ao desenhar primers, deve-se compreender o conceito do alinhamento de sequências, essencial para a realização de tarefas mais complexas. O software busca meios de alinhá-las, inserindo espaços em posições arbitrárias de maneira que haja correspondência dos nucleotídeos semelhantes, levando em conta o grau de semelhança entre elas, permitindo então a visualização das regiões conservadas e variáveis (SETUBAL; MEIDANIS,1997).

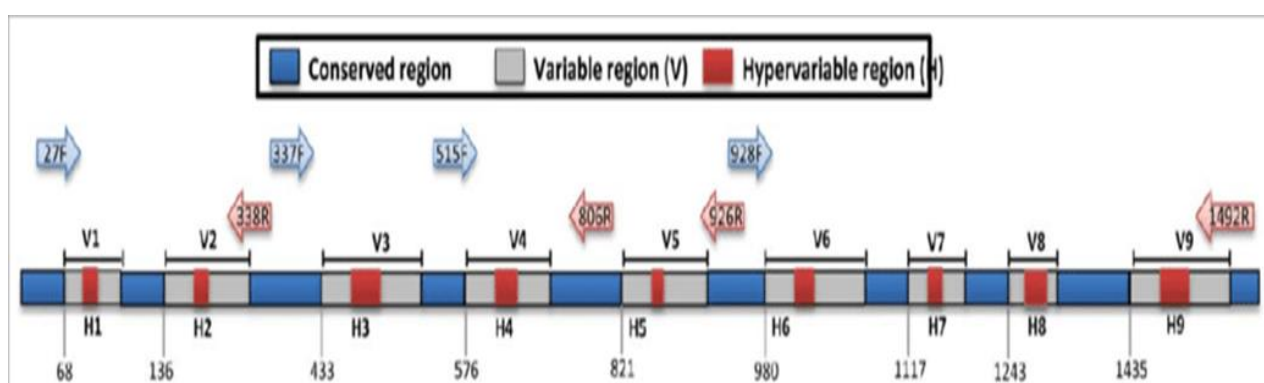


Figura 1: Gene 16S rRNA, representado com suas nove regiões conservadas, na coloração azul, locais variáveis coloração cinza e regiões hipervariáveis representadas pela cor vermelha, e disposto em setas alguns marcadores moleculares, em azul no sentido forward (senso), em vermelho os marcadores no sentido reverse (anti-senso), as regiões variáveis representadas pela letra V e o número de regiões variáveis, de mesmo modo as regiões hipervariáveis representadas pela letra H e pelo número de regiões hipervariáveis.

Como é notório nesta figura, o gene 16S possui aproximadamente cerca de 1.500bp (pares de bases), podendo variar de acordo com a espécie. Possui uma característica peculiar, apresenta nove regiões bem conservadas, é uma característica muito importante para o desenho de oligonucleotídeos (primers), também possui nove regiões variáveis, que são utilizadas, de estimativa para as relações filogenéticas em estudos de diversas populações microbianas (WEISBURG et al., 1991; NEEFS, 1993; WANG, 2009). A amplificação e sequenciamento do gene 16S têm sido amplamente utilizados para estudos de táxons mais distantes.

3.2 GENE 16S rRNA

As tecnologias que estão sendo empregadas no estudo da ecologia microbiana são baseadas na filogenia molecular do RNA ribossômico (rRNA), particularmente o rRNA da menor subunidade (SSU ou 16S), pois é uma aproximação para estudar a evolução microbiana. Podemos notar nesta figura como está classificada as informações do genoma bacteriano

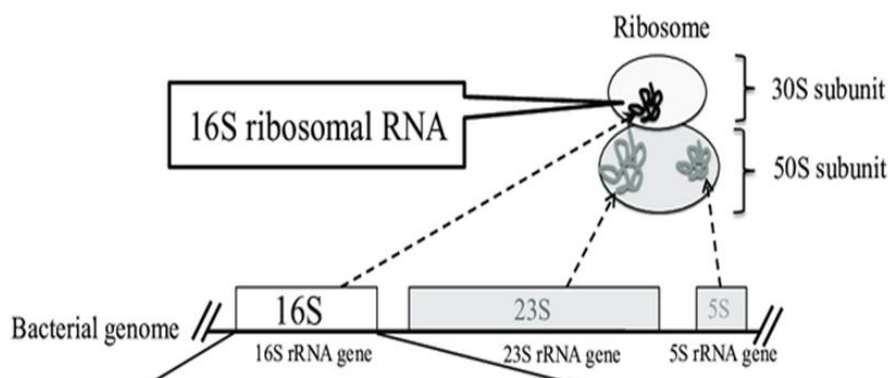


Figura 2: Genoma bacteriano e os genes ribossomais, 5S, 16S e 23S e as subunidades.

Fonte: (https://www.researchgate.net/profile/Kazumasa_Fukuda/publication/308040658/figure/fig2/AS:667697964666884@1536203008308/The-schema-of-ribosome-complex-and-16S-rRNA-gene-The-white-and-grey-boxes-indicate.png).

O operon do DNA ribossômico, em bactérias, compreende três genes conservados funcionalmente e evolutivamente, sendo o gene da subunidade menor 16S (rRNA), seguido por um espaço, o gene da subunidade maior, 23S e 5S (rRNA). (INNUI et al., 2012), (MENNA et al., 2005), (RIBEIRO et al., 2009) (SCARITTO, 2009). Os RNAs ribossômicos apresentam sua classificação baseada em seu coeficiente de sedimentação quando sob ultracentrifugação, que deriva tanto do tamanho, como da densidade da molécula, em unidades denominadas como Svedberg (“S”). Existem três tipos de rRNAs nos procariotos: 5S (120 nucleotídeos), 16S (1542 nucleotídeos) e 23S (2904 nucleotídeos) (GORAB, 2001).

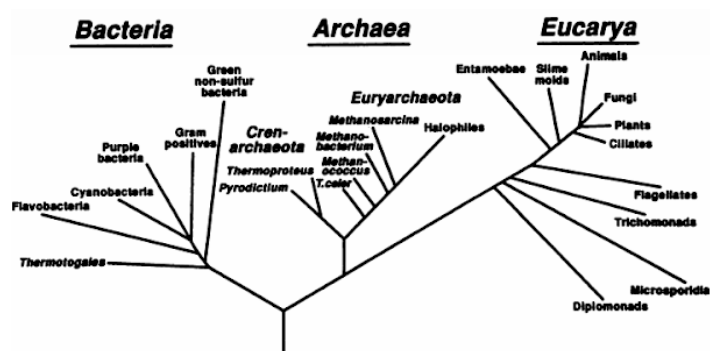


Figura 3: Árvore filogenética universal enraizada mostrando os três domínios com base em sequências de rRNA 16S **Fonte:** (Olsen & Woese).

Nesta imagem da árvore universal podemos notar a presença dos três principais domínios taxonômicos, Bactéria, Arquea e Eukarya. E suas respectivas classificações, além de fornecer informações filogenéticas das sequências, como por exemplo a ancestralidade, as relações evolutivas entre as espécies e diferenciando os domínios, é ideal para estudos de comparação. É um método que pode ser usado para explorar mais amplamente a história de um genoma. (Olsen, G. J., Woese, C. R. 1993).

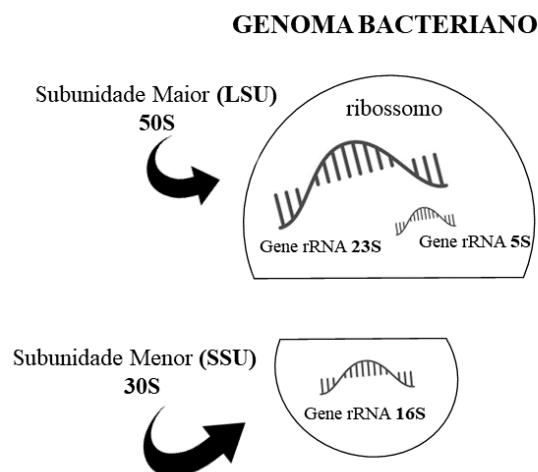


Figura 4: Ribossomo **Fonte:** (Próprio autor).

Podemos observar nesta ilustração o ribossomo é uma organela na célula onde ocorre a síntese de proteína e possui subunidades que são designadas conforme seu coeficiente de sedimentação quando submetidas à ultracentrifugação, S – Svedberg, em homenagem ao físico Theodor Svedberg (1884-1971).

Em procariotos, encontra-se a partícula de ribonucleoproteína 70S, que é composta pelas subunidades 30S, contendo o rRNA 16S e 50S, possuindo o rRNA 23S e 5S. (COX; DOUDNA; O'DONNELL, 2012; PEVSNER, 2009).

Noller (2005) afirma que os genes codificadores de RNA ribossômico (rRNA) são elementos genéticos relacionados e têm sido bem estudados por mais de seis décadas, estas investigações estendem-se por áreas, como as farmacêuticas, bioquímicas e até estudos biológicos para fins comparativos, acumulando uma riqueza de informações sobre as características estruturais, funcionais e evolutivas.

3.3 BIOINFORMÁTICA

Atualmente a bioinformática é imprescindível para a manipulação dos dados biológicos. Ela pode ser definida como uma modalidade que abrange todos os aspectos de aquisição, processamento, armazenamento, distribuição, análise e interpretação da informação biológica. Através da combinação de procedimentos e técnicas da matemática, estatística e ciência da computação são elaboradas várias ferramentas que nos auxiliam a compreender o significado biológico representado nos dados genômicos dinamizando investigações, auxiliando a medicina, biotecnologia e agronomia. (BORÉM & SANTOS, 2001).

No manuseio do desenho de primers, deve-se atentar aos padrões de qualidade que irão determinar a eficiência de um primer, os quais são efetuados por meio de programas computacionais (BANAGANAPALLI et al., 2019).



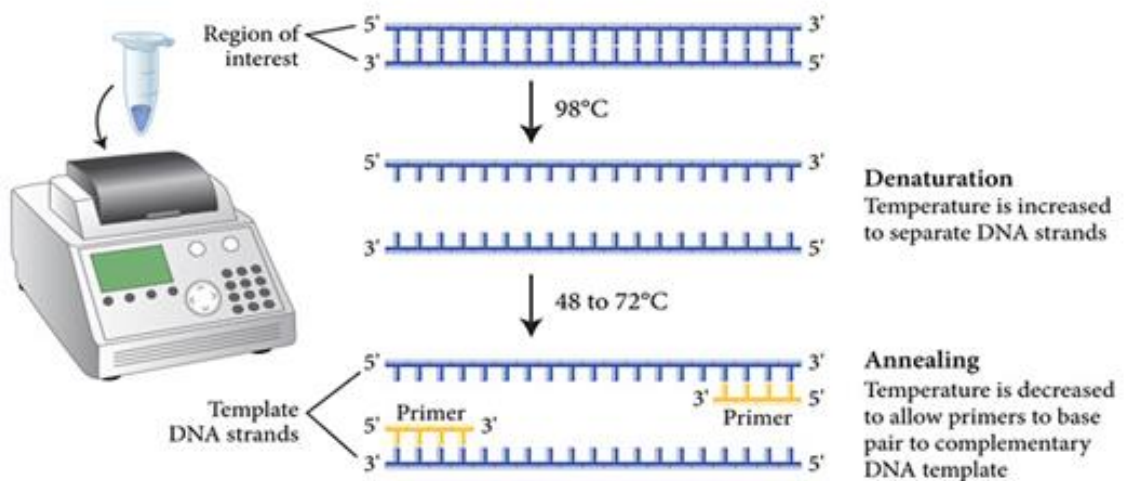
Figura 5: Bioinformática, técnicas e programas. **Fonte:** (Próprio autor).

Nesta figura está contida vários programas que estão voltados para a manipulação de genes, os softwares utilizam algoritmos desenvolvidos ao longo do tempo, como por exemplo, a FASTA, BLAST, úteis também na pesquisa de DNA, sequências e proteínas. (PEARSON; LIPMAN, 1988, ALTSCHUL et al., 1990). E a bioinformática como base para a realização destes estudos e processos.

3.4 PCR E PCR *IN SILICO* E FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA

Inventada por Kary Mullis no ano de 1993, a PCR (A reação em cadeia da polimerase) revolucionou a área da biologia molecular, acelerando o progresso de estudos dos genes e genomas.(DORAK, 2007). Pois viabilizou a detecção e produção de grande uma quantidade de DNA, e impulsionou vários estudos, como o PGH (Projeto Genoma Humano). Esta técnica é bastante utilizada por médicos e pesquisadores, para diagnosticar doenças, clonar, sequenciar genes, promover estudos sofisticados e quantitativos na área da genômica de forma rápida e precisa segundo MULLIS, 1990.

Com apenas uma única molécula do DNA ou seja do material genético de um organismo, a PCR pode gerar até 100 bilhões de moléculas semelhantes em um curto período. A PCR é fácil de executar, requer um tubo de ensaio, alguns reagentes simples e uma fonte de calor. A amostra de DNA que se deseja copiar pode ser pura ou pode ser uma pequena parte de material biológico.(MULLIS, 1990).



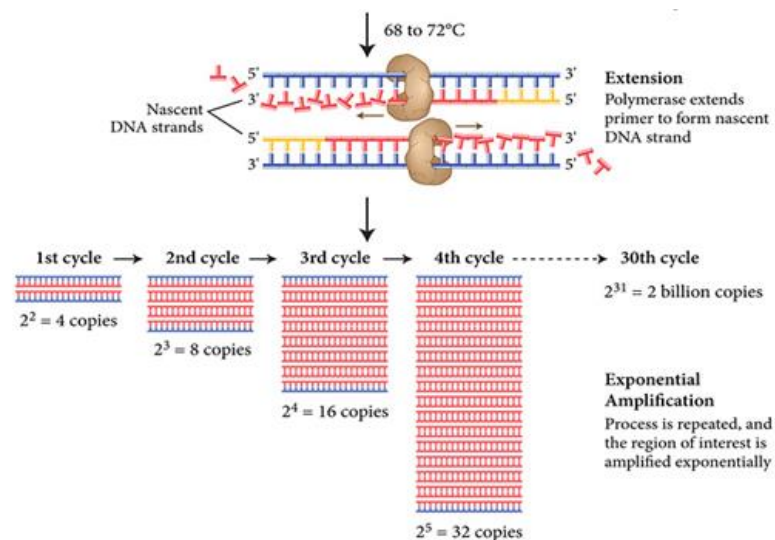


Figura 6: Técnica de PCR ilustrada.

Fonte: (<https://monitoriadenetica.files.wordpress.com/2014/09/pcr.jpg>)

Nesta imagem mostra a reação da Polimerase, e para que ela exerça sua função, é necessária a presença de oligo nucleotídeos, denominados primers, que se ligam ao DNA alvo, indicando a região do genoma a ser amplificada (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) consiste em três etapas, dependentes de temperaturas específicas: a desnaturação, onde há conversão de moléculas de cadeia dupla de DNA em cadeias simples; a hibridização, onde ocorre o anelamento dos primers, um ou ambos marcados por fluorescência, em cada fita de DNA; e a extensão, onde oligonucleotídeos são sintetizados pela DNA polimerase, ligando-os às bases complementares do DNA, de ambos os lados (BORAH, 2011).

A PCR *in silico* ou PCR virtual auxilia na seleção de primers recém-projetados, para identificar incompatibilidades nos locais de ligação do primer devido a SNPs conhecidos e evitar a amplificação de amplicons indesejados para que possíveis problemas possam ser evitados antes de qualquer experimento de "bancada úmida". (LIU, et al., 2011). Os programas mais utilizados para o desenho de primers e validação.

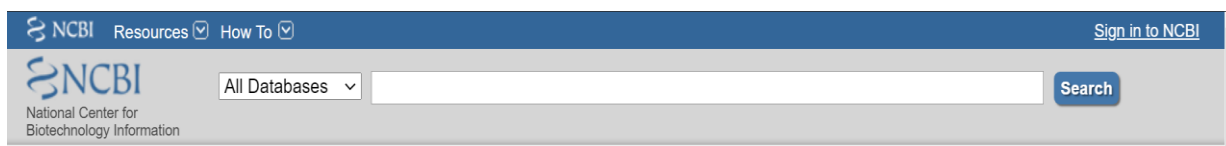


Figura 7: NCBI(Centro Nacional para Informação Biotecnológica)Fonte: (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

A função do NCBI é criar tecnologias de informação, voltadas para a compreensão de processos moleculares e genéticos fundamentais, para controlar a saúde e as doenças. Ou seja, a plataforma utiliza sistemas automatizados para armazenar e analisar conhecimentos sobre biologia molecular, bioquímica e genética, com o intuito de facilitar o uso de bancos de dados e programas, pela comunidade médica e científica. Reunindo informações sobre biotecnologia tanto nacional quanto internacional, e realizando pesquisas com métodos avançados de processamento de informações baseados métodos computacionais voltados para análise de estrutura e função de moléculas biologicamente importantes.

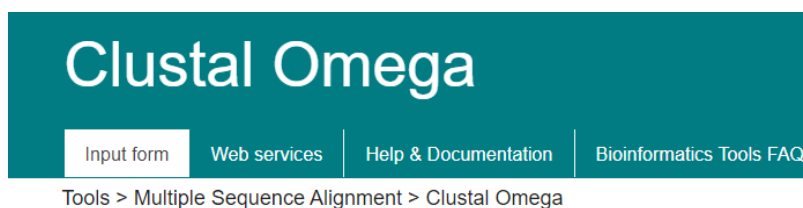


Figura 8: Clustal Omega Fonte:(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

Clustal Omega é programa de alinhamento de sequência múltipla que usa árvores-guia semeadas. Este programa faz parte do Laboratório Europeu de Biologia Molecular (EMBL).

O Clustal Omega utiliza, um alinhamento de sequência múltipla que usa árvores-guia semeadas e técnicas de perfil-perfil HMM para gerar alinhamentos entre três ou mais sequências. (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Devido ao uso do algoritmo mBED para o cálculo de árvores-guia. Este algoritmo permite que dificuldades de alinhamentos muito grandes sejam resolvidos rapidamente, mesmo em computadores pessoais. O programa atualmente é usado na linha de comando ou pode ser executado on-line. (SIEVERS & HIGGINS, 2014).

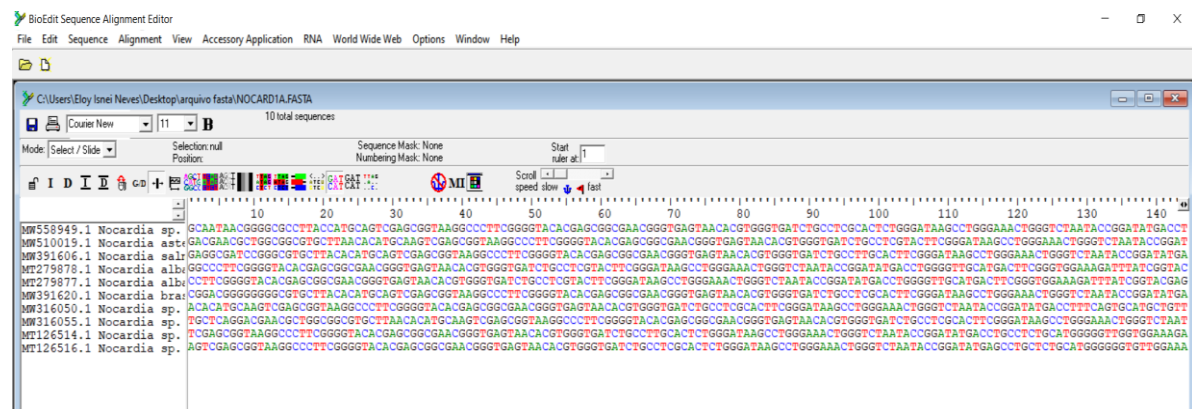


Figura 9: Bioedit Fonte: (BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.2.6.1 Hall, 1999).

Nesta imagem mostra a interface do BioEdit é um dos programas mais comuns usados em estudos de biologia molecular. Ele criado inicialmente como um editor de alinhamento de sequência biológica escrito apenas para Windows. Este programa contém muitos recursos para alinhamento de sequências seu uso é de fácil manuseio, e com uma visualização de janela dividida, cor definida pelo usuário, sombreado baseado em informações e adição de outros programas de bioinformática, como ClustalW e Blast. Além de integrar muitos outros recursos e funções e ferramentas moleculares úteis para biólogos moleculares, como vários modos de alinhamento manual, desenho e anotação de plasmídeo, mapeamento de restrição. Tornou-se um dos programas amplamente utilizados em biologia molecular, com suas ferramentas polivalentes em biologia molecular. (ALZOHAIKY, AHMED, 2011).

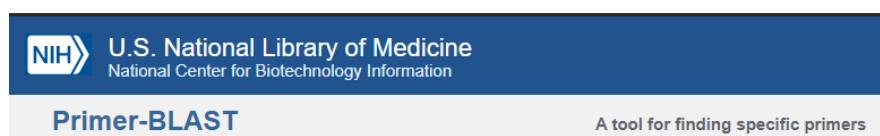


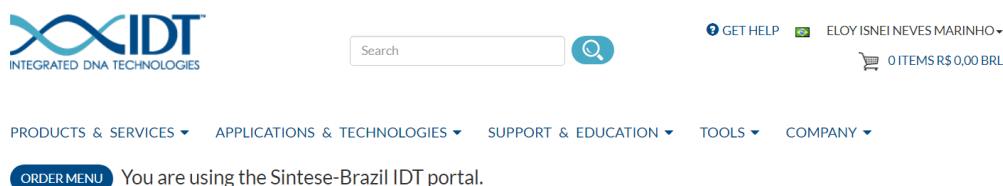
Figura 10: Primer-BLAST Fonte: (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

O Primer-BLAST permite que os usuários projetem novos primers específicos para o alvo em uma única etapa, bem como verifique a e especificidade dos primers pré-existentes. O Primer-BLAST também suporta a colocação de iniciadores com base nas localizações.(YE et al., 2012).



Figura 11: Primer3Plus, uma ferramenta para desenho de primers. **Fonte:** (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>).

Este programa seleciona os pares de primer para detectar a sequência de modelo fornecida. E possui a opção, dos destinos de regiões incluídas / excluídas podem ser especificadas.



OligoAnalyzer

Figura 12: IDT oligo analyzer **Fonte:** (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>).

Nesta imagem mostra a plataforma do IDT, juntamente com área de ferramentas virtuais (SciTools). O OligoAnalyzer, é uma calculadora que fornece várias informações sobre uma sequência de primers, que podem ser previstas no próprio software, através de cálculos termodinâmicos. É possível fazer sete análises diferentes através deste programa, avaliação das propriedades físicas do oligonucleotídeo, a sequência complementar, o comprimento do primer, conteúdo de bases nitrogenadas G e C, temperatura de melting, coeficiente de extinção em 260 nm. Na segunda etapa apresentará ao usuário o formulário de entrada para prever estruturas secundárias (hairpin ou grampos) de oligonucleotídeos. Esta ferramenta usa o algoritmo mFold. As opções Self-Dimer e Hetero-Dimer permitem ao usuário examinar possíveis duplicações quando os oligonucleotídeos se anelam em si mesmo ou com outra sequência alvo, exibindo as estruturas calculadas partindo do pressuposto da mais estável para a menos estável. A análises de hibridização cruzada são importantes para o ensaio da PCR em que as interações primer-primer. Seção do NCBI BLAST, manda a sequência para o site do oficial do National Center for Biotechnology Information (NCBI), para procurar em vários bancos de dados usando o método de correspondências curtas, em locais de emparelhamento previstos do primer dentro de um genoma ou outro grupo de sequências candidatas. (OWCZARZY, RICHARD et al. 2008).



Sequence Manipulation Suite: PCR Products

Figura 13: Sequence Manipulation(SMS) **Fonte:**(<https://www.bioinformatics.org/sms2/pcrproducts.html>).

O Sequence Manipulation Suite foi escrito por Paul Stothard membro da University of Alberta, Canadá, o programa utiliza o JavaScript 1.5, que é uma linguagem de script bem leve é orientada por uma multiplataforma, é padronizado pela ECMA (European Computer Manufacturers Association). A primeira versão do padrão ECMA está documentada na especificação ECMA-262. O padrão ECMA-262 também é aprovado pela ISO (International Organization for Standards) como ISO-16262. JavaScript 1.5 é totalmente compatível com ECMA-262, edição 3. No processo funcional do programa as sequências são enviadas para o SMS (Sequence Manipulation Suite) e não saem do computador, o navegador manuseia utilizando a própria internet para executar o JavaScript. aceita um ou mais modelos de sequência de DNA e duas sequências de primer. O programa procura locais de reconhecimento de primer, correspondentes que possam gerar um produto de PCR. Todos os produtos resultantes são classificados por tamanho e recebem um título especificando seu comprimento, sua posição na sequência original e os primers que os produziram. Pode-se usar as moléculas lineares ou circulares como modelo, os produtos da PCR são usados para determinar os tamanhos de produtos e assim prever antes de realizar a PCR no laboratório. (STOTHARD P, 2000).

4 METODOLOGIA

A seleção de dados foi feita com base no estudo do gene 16S rRNA, com a seleção de dois grandes grupos de bactérias, Gram positivas e Gram Negativas. foram utilizados programas e banco de dados de bioinformática, NCBI, BioEdit, CLUSTAL Omega, Primer-Blast, Primer3plus, SMS e IDT. Neste trabalho, foram utilizadas cem sequências de genomas bacterianos, cinquenta sequências para o gênero de bactérias Gram positivas e cinquenta para gênero Gram negativas, em cinco grupos de dez bactérias separadas por gênero e espécie. Os dados foram colhidos no NCBI, e avaliados pelo Clustal Omega, onde foi feita uma seleção de alinhamentos, logo após, com o uso do Bioedit, as sequências passaram por quatro processos de manipulação, alinhamento múltiplo, a retirada das regiões indesejadas, marcação de sequências na região de interesse **V3**, utilizando a tabela dos primers universais do gene 16S rRNA, foi delimitada a com o auxílio de três marcadores moleculares universais, **E334F**, **E786F** e **E917F**. Os marcadores universais tiveram o papel de delimitar as regiões próximas a área de interesse (V3), ajudando na identificação. Ao concluir esta etapa, foram criadas cinco sequências consensos em cada grupo bacteriano, de ambos os gêneros, o alinhamento das sequências consensos foi feito de forma manual, gerando duas sequências gerais de ambos os gêneros, que sequenciadas formando a sequência total de ambos os gêneros, possibilitando o desenho de primer, o Primer3Plus e Primer-BLAST participaram da criação dos primers, foram feitos on-line no Primer3Plus (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), determinando alguns parâmetros como critérios de inclusão ou exclusão. A região escolhida deveria apresentar nucleotídeos entre 20-22 pb e, com distribuição de GC máxima em 60%, para evitar a elevação da temperatura de anelamento e dissociação. As regiões com muitas A,T também foram evitadas, para não haver a redução da Temperatura de melting, que possibilitasse o auto anelamento, sendo recomendado valores inferiores a 60°C.

A Temperatura de Melting foi calculada, estimando-se valores entre cada par de primers mais próximos, visando estabelecer uma média na padronização da PCR. A validação final foi feita com uso da ferramenta online OligoAnalyzer (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>). Foi verificada a possível formação de self dímeros, heterodímeros e hairpin. Na análise de dímeros, os primers não poderiam apresentar energia livre de Gibbs abaixo de $-9 \text{ kcal/mole}^{-1}$, ou muitas bases complementares. A análise de Hairpin, além dos valores de Delta G, foi verificada a temperatura de melting, que possibilitasse o auto anelamento, sendo recomendado valores inferiores a 60° C e, taxa de validação mínima de 80%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observando os resultados, em análise geral, na tabela 5, pode ser ressaltado que os valores obtidos na avaliação dos parâmetros estão em concordância com os estudos já realizados. A presença das estruturas secundárias no primer é produzida por interações intermoleculares ou intramoleculares, que podem levar a uma redução no rendimento do produto final. Podem afetar diretamente na reação do primer e, portanto, a amplificação. Portanto as estruturas secundárias reduzem muito a disponibilidade de primers para uma boa reação final.

PRIMERS	TM (°C)	%CG	HD (°C / G) Kcal.mole ⁻¹	SD Kcal.mole ⁻¹	HD Kcal.mole ⁻¹
ELY-F1 AGACACKGYCCAGACTYCTACG	59.2 °C	56.8%	-1 / 0,93	-7.07	- 7.51
ELY-F2 ACTGAGACACGGYCCAGACTC	59,7 °C	59.5%	36.8 / 1.1	-7.63	- 6.62
ELY-F3 ACACTGGRACTGAGACACGG	57,9 °C	57.5%	15.9 / 0.61	-6.0	- 4.95

Tabela 1: Primers desenhados CG = Citosina e Guanina; HD = Harpin Dimer; SD = Self Dimer; HD = Hetero Dimer.

Um bom desenho de primer deve ser priorizado no diagnóstico molecular, pois é imprescindível que estes sejam específicos na detecção do gene ou região de importância, excluindo a possibilidade de amplificação de regiões inespecíficas, e a formação de estruturas indesejadas como também a não detecção de alguma cepa mutante. Para avaliar a qualidade e a eficiência do primer, utilizou-se o programa IDT, os parâmetros analisados, de acordo com a quantidade de nucleotídeos, que variou de 20 a 22, a porcentagem de Guanina/Citosina, Temperatura de Melting 57,4° C a 59,7°C, Formação de estruturas secundárias como o Self-dimer (SD), Heterodímeros (HD) e o harpin (H).

É importante ressaltar que os *primers* desses autores já foram utilizados *in vitro*, e obtiveram ótimos resultados (EDUARD et al., 2021, LIU et al., 2020, SUN et al., 2014, MUNYAKA et al., 2015 e TYX et al., 2016). O primeiro parâmetro descritivo observado, foi quanto aos valores da concentração de GC dos *primers*, que se mantiveram abaixo de 60%, conforme recomendado. Observando o primer ELY-F1, foi possível observar a influência da sua concentração de GC, que foi de 56,8%, no aumento da temperatura de *melting* que é de 59,2°C, uma correlação já apresentada na literatura pela estável ligação de bases GC (LEHNINGER; NELSON; COX, 2000). A respeito da temperatura de *melting* variou entre 57,4°C e 59,7°C, sendo a maior temperatura correspondente ao *primer* ELY-F2, e o de menor valor, correspondente ao *primer* ELY-R1. Os intervalos das temperaturas entre os pares de *primers* não ultrapassaram os 5°C, facilitando a escolha de uma média para a etapa de anelamento da PCR. Quanto ao comprimento, os tamanhos variam de 20 a 22 nucleotídeos. *Primers* que apresentam uma sequência muito extensa, devem ser evitados, pois favorecem a formação de estruturas secundárias (WANG; SEED, 2003). Os valores observados na análise de especificidade pelo BLAST foram equivalentes, sendo que todos apresentaram alta especificidade onde a maioria atingiu valores entre 95% a 100%, e o restante com resultados de 81%. O primer ELY-F1 atingiu 95% de identidade.

No primer reverso ELY-R1, já apresenta 4 bases degeneradas, o que permite uma abrangência maior na identificação de gêneros e espécies de procariotos. Ao comparar os 4 primers, os valores isolados do Delta G (ΔG) na análise de self-dímeros, pode-se verificar uma variação de -0,96 a -7,07 kcal.mole⁻¹. Durante a realização na avaliação de grampos, foi encontrado valores positivos nos primers ELY-F1 (Fig. 17) e ELY-F3. Porém, observou-se valores negativos nos primers ELY-R1 e ELY-F2, entretanto, nenhum menor que -9 kcal.mole⁻¹ como era previsto.

Structures						
structure	Image	ΔG (kcal.mole ⁻¹)	T_m (°C)	ΔH (kcal.mole ⁻¹)	ΔS (cal.K ⁻¹ mole ⁻¹)	Output
1		1.75	-45.1	-5.7	-25	Ct Det
2		2.06	-11.2	-14.9	-56.88	Ct Det
3		2.06	-20	-11.6	-45.82	Ct Det

Figura 14: Análise das formações de Hairpin do primer **ELY-F1**, resultados fornecidos pelo IDT, evidenciando os valores de cada Hairpin

A combinação dos primers ELY-F1x ELY-R1 (Tabela 6), apresentou valores de Delta G, que variaram de -1,34 a -7,51 Kcal/mole. Os valores de energia observados, estão dentro dos padrões consideráveis. Isso foi verificado nas outras combinações de primers (**ELY-F2 X ELY-R1 e ELY-F3 X ELY-R1**). A análise revelou a formação de *hairpins*, todavia, não influenciou nos resultados posteriores. Os valores obtidos confirmam a qualidade dos primers nesta avaliação, pois valores menores que -9,5 kcal.mole⁻¹, favoreceria a formação de um self-dímero. Os mesmos valores foram obtidos, o *Delta G* correspondente à formação de *hairpin* também se manteve acima de -9 Kcal.mol, com alguns valores positivos (Fig. 17), o que minimiza a probabilidade de uma possível formação de *hairpin* (Tabela 5).

PARES DE PRIMERS	AMPLICON (PB)	ΔG (kcal/mole) Heterodímero	GÊNEROS
ELY-F1 X ELY-R1	177-207	Delta G: -7.51 kcal/mole Base Pairs: 5 <pre> 5' AGACACKGYCCAGACTYCTACG 3' GATTKAKRCACGGTCGTCGG </pre> Delta G: -1.34 kcal/mole Base Pairs: 2 <pre> 5' AGACACKGYCCAGACTYCTACG : 3' GATTKAKRCACGGTCGTCGG </pre>	<i>Klebsiella sp.</i> - <i>Escherichia sp.</i> - <i>Enterobacter sp.</i> - <i>Kosakonia sp.</i> - <i>Aeromonas sp.</i> - <i>Pseudomonas sp.</i> - <i>Staphylococcus sp.</i> + <i>Christensenella sp.</i> + <i>Delftia sp.</i> - <i>Alkalihalobacillus sp.</i> + <i>Acinetobacter sp.</i> - 3 GRAM Positivas. 8 GRAM Negativas
ELY-F2 X ELY-R1	181-211	Delta G: -6.62 kcal/mole Base Pairs: 4 <pre> 5' ACTGAGACACGGYCCAGACTC : : : : : 3' GATTKAKRCACGGTCGTCGG </pre> Delta G: -1.34 kcal/mole Base Pairs: 2 <pre> 5' ACTGAGACACGGYCCAGACTC : : 3' GATTKAKRCACGGTCGTCGG </pre>	<i>Bacillus sp.</i> + <i>Brevibacterium sp.</i> + <i>Enterococcus sp.</i> + <i>Pelomonas sp.</i> - <i>Lysinibacillus sp.</i> + <i>Fictibacillus sp.</i> + <i>Exiguobacterium sp.</i> + <i>Solibacillus sp.</i> + <i>Sporosarcina sp.</i> - <i>Chromobacterium sp.</i> - <i>Agromyces sp.</i> + <i>Frondihabitans sp.</i> +
ELY-F3 X ELY-R1	189-219	Delta G: -4.95 kcal/mole Base Pairs: 3 <pre> 5' ACACTGGRACGTGAGACACGG : : 3' GATTKAKRCACGGTCGTCGG </pre> Delta G: -1.34 kcal/mole Base Pairs: 2 <pre> 5' ACACTGGRACGTGAGACACGG 3' GATTKAKRCACGGTCGTCGG </pre>	<i>Paenarthrobacter sp.</i> + <i>Streptomyces sp.</i> + <i>Microbacterium sp.</i> (+/-) <i>Janibacter sp.</i> + <i>Clavibacter sp.</i> + <i>Curtobacterium sp.</i> + <i>Pseudarthrobacter sp.</i> - <i>Amycolatopsis sp.</i> + <i>Cellulomonas sp.</i> - <i>Sphingomonas sp.</i> -

Tabela 2: Informações geradas pelo SMS produto da PCR in silico.

6 CONCLUSÃO

O desenvolvimento *in silico* de primers, é um importante aliado na biologia molecular, e vem sendo muito utilizado na construção de oligonucleotídeos para PCR. A validação destes primers em programas computacionais, permite a redução da probabilidade de erros, que possam interferir na PCR. O emprego da PCR *in silico* representa economia de tempo e de recursos em testes laboratoriais, e concede autonomia ao pesquisador na escolha das regiões que se pretende estudar, com o auxílio de uma gama de dados disponíveis em banco de dados. Os valores obtidos na validação dos primers confirmam para um bom desempenho *in silico*, disponibilizado então para uso potencial no anelamento da região V3 do gene 16S rRNA, em procariotos. Com os resultados obtidos, foi possível obtida uma referência que pode ser utilizada em futuras pesquisas científicas, principalmente para fins de filogenia molecular. Assim, o estudo por meio de ferramentas de bioinformática, mostra-se como uma importante solução, que visa facilitar a busca e disseminação científica para análise de DNA, em programas computacionais disponíveis. As ferramentas de bioinformática empregadas neste estudo se mostraram suficientes, permitindo a análise do genoma bacteriano e da verificação dos parâmetros que podem levar a formação de estruturas capazes de interferir na eficiência do *primer*, permitindo assim minimizar erros posteriores, durante a reação de PCR.

REFERÊNCIAS

- ARBEX, W.; COSTA, V.S.; SILVA, M.V.G. Bioinformática como ferramenta nas pesquisas atuais. **Anais do III Encontro de Genética e Melhoramento**, Viçosa, UFV, 2006
- ALZOHAIY, A. BioEdit: An important software for molecular biology. **GERF Bulletin of Biosciences**. 2. 60-61,2011.
- BANAGANAPALLI *et al.*, Essentials of Bioinformatics, Volume I. **Editora Springer Nature** Switzerland, AG, 2019.
- BORÉM.A; SANTOS F.R Biotecnologia Simplificada. **Editora Suprema**. Viçosa, MG. 2001.
- BORAH, P. Primer designing for PCR. **Science Vision**, v. 3, n. 11, p. 134-136, jul. 2011.
- CAVALCANTI, M.P.C. *et al.* avanços biotecnológicos para o diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias. **Revista de patologia tropical**, v. 37, n. 1, p. 01-14, 2008
- CANHOS, V.P. *et al.* Diversidade no domínio bactéria. In: CANHOS, V.P. *et al.* **Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX**. São Paulo: FAPESP, 1997. p.1-13.
- COX, M. M.; DOUDNA, J. A.; O'DONNELL, M. Biologia Molecular: **Princípios e Técnicas**. Porto Alegre: Artmed, 2012.
- CD GENOMICS (2018) The genomics services company, 45-1 Ramsey Road, Shirley, NY 11967, USA. Disponível em:<<https://www.cd-genomics.com/16S-18S-ITS-Amplicon-Sequencing.html?fbclid=IwAR3yNy0rWGAzYEVjs2NCTrrZPai1RA4VRiITNktw3JaI3w5jbXmKa9gXeqU>>.
- DALE, G.; CHAPARRO, J. Integration of molecular markers into tree breeding and improvement programs. In: **UFRO Conference on Silviculture and improvement of eucalypts, Salvador, 1997**. Proceedings. Colombo: EMBRAPA / CNPF, 1997. v.2, p.80.
- DORAK, M. T. Real-time PCR. Taylor & Francis, 2007.
- EDUARD, F.; *et al.* Comparison of Two 16S rRNA Primers (V3–V4 and V4–V5) for Studies of Arctic Microbial Communities. **Frontiers in Microbiology**. V.12. p.283. 2021.
- GARRITY,G.M; WINTERS, M.; SEARLES, D.B. Taxonomic outline of prokaryotic genera **Bergey's Manual R of systematic bacteriology. 2 ed. NewYork: SpringerVerlag**, NewYork,Inc, 2002.

GRATTAPAGLIA, D. Opportunities and challenges for the incorporation of genomic analysis in Eucalyptus breeding. IUFRO, **Conference on Silviculture and improvement of eucalypts, Salvador, 1997**. Proceedings. Colombo: EMBRAPA / CNPF, 1997. v.2, p.129-136.

GORAB, E. Evolução de genes nucleares de RNA ribossômico. **Biologia Molecular e Evolução**. Cap. 6, p. 64-69, 2001.

INUI, R. N. *et al.* phosphorus solubilizing and iaa production activities in plant growth promoting rhizobacteria from brazilian soils under sugarcane cultivation. **arpn journal of engineering and Applied sciences**. vol. 7, no. 11, november 2012.

LANE, DAVID J. *et al.* Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 82, n. 20, p. 6955-6959, 1985.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica. *Sarvier*, p.839, São Paulo, 2000.

LIU, P. *et al.* Evaluation of Compatibility of 16S rRNA V3V4 and V4 Amplicon Libraries for Clinical Microbiome Profiling.
doi: <https://doi.org/10.1101/2020.08.18.256818>.
<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.08.18.256818v1>. 2020

MULLIS, K. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American**, v. 262, n. 4, p. 56-65, 1990.

MÜHLING, M. *et al.* Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities. **The ISME journal**, v. 2, n. 4, p. 379-392, 2008.

MUNYAKA, P.M. *et al.* Antepartum antibiotic treatment increases offspring susceptibility to experimental colitis: a role of the gut microbiota. **PLoS ONE**. 2015;10(11):e0142536. doi: 10.1371/journal.pone.0142536. 2015.

MORAIS, R.C.S. Ensaios de multiplex PCR em tempo real (TaqMan probe) para identificação de Leishmania spp. relacionadas com a etiologia da leishmaniose tegumentar Americana. 2019. 129f. Tese (Doutorado) – **Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, CPQAM**, Recife, 2019.

NEEFS, J.-M. *et al.* Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 2237- 2317,1990.

NOLLER, H.F. (2005) RNA structure: reading the ribosome. *Science* 309: 1508–1514.

OWCZARZY, Richard *et al.* IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic acids research*, v. 36, n. suppl_2, p. W163-W169, 2008.

PEARSON, W.R.; LIPMAN, D.J. Improved tools for biological sequence comparison. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 8, p. 2444-2448, 1988.

PEVSNER, J. Bioinformatics and Functional Genomics. 2nd. New Jersey: John Wiley & Sons, 2009.

PIGATO, S.M.P.C.; LOPES, C.R. Avaliação da variabilidade genética em quatro gerações de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake por meio do marcador molecular RAPD. **Scientia Forestalis/Forest Sciences**, n. 60, p. 119-133, 2001.
Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/66721>>.

QUEIROZ, J. A. S. *et al.* Desenho e validação de primers in silico para detecção do vírus sincicial respiratório humano. **Rev. FIMCA**, v. 4, n. 1, p. 17-30, 2017.

RIBEIRO, V. J.; BERTOLUCCI, F. L.; GRATTAPAGLIA, D. RAPD marker-guided mating in a reciprocal recurrent selection program of *Eucalyptus*. IUFRO **Conference on Silviculture and improvement of eucalypts, Salvador, 1997**. Proceedings. Colombo: EMBRAPA / CNPF, 1997. v.2, p.156-160.

ROSSELLO-MORA, R; AMANN. R. (2001). The species concept for prokaryotes. **FEMS PERSMicrobiol Revista**; 25:39-67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)].

SIEVERS, F.; HIGGINS, D. G. Clustal omega. Current protocols in bioinformatics, [S.l.], v.48, n.1, p.3–13, 2014.

SALES, L.A.T. *et al.* Evaluation of bacterial universal primers in PCR in sílico. **Rev. Investig, Bioméd.** São Luís, 9(2): 98-104, 2017.

STRALIS-PAVESE, N. *et al.* 16S rRNA based T-RFLP analysis of methane oxidising bacteria - Assessment, critical evaluation of methodology performance and application for landfill site cover soils. **Applied Soil Ecology**, v. 31, p. 251-266, 13 mai. 2005.

STOTHARD. P. The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques* 28:1102-1104.

SHAH, N. *et al.* Comparing Bacterial Communities Inferred From 16S rRNA Gene Sequencing and Shotgun Metagenomics. Pacific Symposium on Biocomputing, v. 16, p.165-176, 2011.

SUN, Z.; LI, G.; WANG, C.; JING, Y.; ZHU, Y.; ZHANG, S.; LIU, Y. Community dynamics of prokaryotic and eukaryotic microbes in an estuary reservoir. **Sci Rep.** 2014;4:696

TINDALL, B. J. *et al.* (2010). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. **Int J Syst Evol Microbiol.** 60: 249266. [[CrossRef](#)] [PubMed](#)].

TYX, R.E.; STANFILL, S.B.; KEONG, L.M.; RIVERA, A.J.; SATTEN, G.A.; WATSON, C.H. Characterization of Bacterial Communities in Selected Smokeless Tobacco Products Using 16S rDNA Analysis. **PLoS One**. 2016;11(1):e0146939. Published 2016 Jan 19. doi:10.1371/journal.pone.0146939.

WANG, Y.; QIAN, P. Y. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PLOS one*, 2009. Doi: 10.1371/journal.pone.00074016. doi: 10.1038/srep06966. 2014.

WANG, Y.; QIAN, P. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. **Public Library of Science**, v. 4, n. 10, e7401, 2009.

WEISENBURG W.G.; BARNS S.M.; PELLETIER D.A.; LANE D.J.; 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **J. of Bacteriol.** 173: 697-703. 1991.

WOESE, C. R., and OLSEN, G. J. (1986) Archaeobacterial phylogeny: perspectives on the urkingdoms. **Sys. Appl. Microbiol.** 7, 161-177.

XIONG, J. Essential Bioinformatics. **New York: Cambridge University Press**, 2006.

ZHANG, L. et al. Functional genetic selection of the decoding center in E. coli 16S rRNA. In: Nucleic acids symposium series. **Oxford University Press**, p. 319-320, 2003.

ANEXOS

GRAM POSITIVAS	GRAM NEGATIVAS
<i>Streptococcus</i> (10 sequências) >MW548664.1 >MW548715.1 >MW548729.1 >MW548733.1 >MW548734.1 >MW555223.1 >MW555225.1 >MW555226.1 >MW555309.1 >MW555318.1	<i>Chlamydia</i> (10 sequências) >NR_036834.1 >NR_036835.1 >NR_027576.1 >NR_036864.2 >KX603688.1 >KX603687.1 >GQ398031.1 >GQ398029.1 >KF366255.1 >KF366256.1
<i>Enterococcus</i> (10 sequências) >MW425354.1 >MW418178.1 >MW418179.1 >MW419928.1 >MW419958.1 >MW375496.1 >MW375497.1 >MH048988.1 >MT597910.1 >MW407033.1	<i>Neisseria</i> (10 sequências) >MF480363.1 >MF480362.1 >MF480370.1 >MF480371.1 >MF480368.1 >MF480373.1 >MF480389.1 >MF480388.1 >MF480387.1 >MF480379.1
<i>Lactobacillus</i> (10 sequências) >MW504953.1 >MW486675.1 >MW486672.1 >MW527155.1 >MW527156.1 >MW527158.1 >MW527197.1 >MW504833.1 >MW558118.1 >MW558120.1	<i>Klebsiella</i> (10 sequências) >MT734392.1 >MT734391.1 >MN874176.1 >MW521132.1 >MW524112.1 >MW493112.1 >MW471633.1 >MW435549.1 >MW426392.1 >MW426395.1

<i>Mycoplasma</i> (10 sequências) >MT735156.1 >MT735157.1 >MT735158.1 >MT735161.1 >MT735162.1 >MT735164.1 >MT735165.1 >MT735166.1 >MT735167.1 >MT735168.1	<i>Salmonella</i> (10 sequências) >MW508864.1 >MW383798.1 >MW383799.1 >MN317312.1 >MW020245.1 >MW508865.1 >MW508868.1 >MW508872.1 >MW508878.1 >MW508877.1
<i>Staphylococcus</i> (10 sequências) >MH900188.1 >MW527395.1 >MW521138.1 >MN907478.1 >MW524838.1 >MW453041.1 >MW453040.1 >MW453039.1 >MW453038.1 >MW453045.1	<i>Pseudomonas</i> (10 sequências) >MW548984.1 >MW548605.1 >MT967917.1 >MW440692.1 >MW442949.1 >LC548099.1 >MW186662.1 >MW527125.1 >MW527123.1 >MW527133.1

Tabela 4: Gêneros bacterianos destacados, em verde Gram positivos, em vermelho Gram negativos, todas as espécies, separadas em colunas, juntamente com os seus respectivos números de identificação do NCBI.

Primer [Ref]	Primer sequence 5'-3'	Position	Coverage rate
E334F [14]	CCAGACTCCTACGGGAGGCAGC	334–356	74.2%
E786F [14]	GATTAGATACCCTGGTAG	786–803	95.2%
E917F [20]	GAATTGACGGGRCCC	917–932	92.5%

Tabela 5: Primers Universais utilizados e evidenciados pela marcação. **Fonte:** (YONG WANG PEI, YUAN QIAN, 2009).

Ambiguity Codes

N = A or C or G or T (any)

B = C or G or T (not A)

D = A or G or T (not C)

H = A or C or T (not G)

V = A or C or G (not T)

W = A or T (weak)

S = C or G (strong)

R = A or G (purine)

Y = C or T (pyrimidine)

M = A or C (amino)

K = G or T (keto)

Tabela 6: Códigos de ambiguidade, usados para compreensão de bases degeneradas formadas.

Fonte: (<https://enzymefinder.neb.com/#!/#nebheader>).