

**Genética Humana**

**RCG0117 Ano 2017**

**Prática Genoma Humano II**

Wilson A. Silva Jr

1. Identifique as posições das mutações C178X, IVS6 +6 T🡪C, g.18130\_18134delCGAGC, g.18130\_18131insG e IVS6 -2 A🡪C no gene F9 da coagulação e desenhe um par de *primers* para amplificar a região da posição da mutação (tamanho do produto de amplificação de aproximadamente 350pb) para validá-la por sequenciamento numa população de 100 hemofílicos. Para tanto responda as seguintes questões:
2. Para cada primer, informe a percentagem de [CG], temperatura de *melting* (Tm), temperatura de anelamento (T.an.);
3. Qual a tamanho exato do produto de PCR?;
4. Considerando as três temperaturas que são aplicadas na reação de PCR, indique a temperatura de denaturação, extensão (polimerização) e a de anelamento do PCR em questão?;
5. Com relação as mutações descritas no enunciado, descreva o tipo de cada mutação;
6. Tomando como base a resposta anterior, quais delas podem ser consideradas absolutamente patogênica? Por que?

**Parâmetros para desenho de primers**

1. **Tamanho de cada *primer*:** cerca de 20 nucleotídeos;
2. **Concentração de [GC]**: cerca de 50%;
3. **Temperatura de melting de cada primer**: T.m. = [G+C]4 + [C+G]2;
4. **Temperatura de anelamento de cada primer**: T.m. – 4oC;
5. **Temperatura de anelamento do PCR**: média da temperatura de cada primer;
6. **Primer F (Forward) ou p1**: sequência igual a da referência do gene;
7. **Primer R (reverse) ou p2**: sequência complementar a da referência do gene;
8. **Tamanho do produto do PCR**: número total de nucleotídeos delimitado pelos primers 1 e 2.

Gene F9



       1 aaagacaagctacaggctggagacaatatatttaatccacctatctatgaaaggactcat
      61 atctagaatatataaacaaccttaagaatctgacagtaaaaaaaaaaaatcagactaact
     121 ggaccactcatacattgctgatggaaatgtaaagtggtacagccattttggtaaacatca
     181 **ttgctcgctgacgaagatacggcgggtccgactgaggaaccgtgcggccacggtaaacgt** 241 **agcgactcggccgatctcgattcggaagacgcgtcccttcccgtttccgacccaaatcgg** 301 **ccgcggtggcagaagcccacgaaat**cagaggtgaaatttaataatgaccactgcccattc
     361 tcttcacttgtcccaagaggccattggaaatagtccaaagacccattgagggagatggac
     421 attatttcccagaagtaaatacagctcagcttgtactttggtacaactaatccaccttac
       1                     M  Q  R  V  N  M  I  M  A  E  S  P  G  L
     481 cactttcacaatctgctagcATGCAGCGCGTGAACATGATCATGGCAGAATCACCAGGCC
      15   I  T  I  C  L  L  G  Y  L  L  S  A  E  C  T  V
     541 TCATCACCATCTGCCTTTTAGGATATCTACTCAGTGCTGAATGTACAGgtttgtttcctt
     601 ttttaaaatacattgagtatgcttgccttttagatatagaaatatctgatgctgtcttct
     661 tcactaaattttgattacatgatttgacagcaatattgaagagtctaacagccagcacgc
//   721 aggttggtaagtactggttctttgttagctaggttttcttcttcttcatttttaaaacta//  6541 actaaaagtaaaattgaattttaattcctaaatctccatgtgtatacagtactgtgggaa
    6601 catcacagattttggctccatgccctaaagagaaattggctttcagattatttggattaa
    6661 aaacaaagactttcttaagagatgtaaaattttcatgatgttttcttttttgctaaaact
      31                            F  L  D  H  E  N  A  N  K  I  L
    6721 aaagaattattcttttacatttcagTTTTTCTTGATCATGAAAACGCCAACAAAATTCTG
      42 N  R  P  K  R  Y  N  S  G  K  L  E  E  F  V  Q  G  N  L  E
    6781 AATCGGCCAAAGAGGTATAATTCAGGTAAATTGGAAGAGTTTGTTCAAGGGAACCTTGAG
      62 R  E  C  M  E  E  K  C  S  F  E  E  A  R  E  V  F  E  N  T
    6841 AGAGAATGTATGGAAGAAAAGTGTAGTTTTGAAGAAGCACGAGAAGTTTTTGAAAACACT
      82 E  R  T
    6901 GAAAGAACAgtgagtatttccacataatacccttcagatgcagagcatagaatagaaaat
    6961 ctttaaaaagacacttctctttaaaattttaaagcatccatatatatttatgtatgttaa
    7021 atgttataaaagataggaaatcaataccaaaacactttagatattaccgttaatttgtct
      85                  T  E  F  W  K  Q  Y  V  D
    7081 tcttttattctttatagACTGAATTTTGGAAGCAGTATGTTGgtaagcaattcattttat
    7141 cctctagctaatatatgaaacatatgagaattatgtgggttttttctctgcataaataga
    7201 taatatattaaactttgtcaaaaggactcagaaagatcagtccaaccctctaacccatat
//  7261 tgaatggtgatatactacagggttatgccagtgtgggaactatcgctggtaaataagttt// 10561 tgcataaactatgtacatgccttcctcagggcacttttctaggacagtgtcagcctaagg
   10621 atctttgtttgggtggcttttagaaactcaggaagacaggagcatcatatgcctataggc
   10681 agctggcttccaggtcagtagttttgctctgaccctaaaatcagactcccatcccaatga
   10741 gtatctacaggggaggaccgggcattctaagcagtttacgtgccaattcaatttcttaac
      94              G  D  Q  C  E  S  N  P  C  L  N  G  G  S  C  K
   10801 ctatctcaaagATGGAGATCAGTGTGAGTCCAATCCATGTTTAAATGGCGGCAGTTGCAA
     110  D  D  I  N  S  Y  E  C  W  C  P  F  G  F  E  G  K  N  C  E
   10861 GGATGACATTAATTCCTATGAATGTTGGTGTCCCTTTGGATTTGAAGGAAAGAACTGTGA
     130  L  D
   10921 ATTAGgtaagtaactattttttgaatactcatggttcaaagtttccctctgaaacaagtt
   10981 gaaactggaaaatgcaatattggtgtatcataatttttcttaaaaacatacctttgatgc
   11041 ttataaacatttcatttgtagtgatagttttcaggatatgagttcaagaagctacattaa
// 11101 aatcaataacaatatttggtaactaatattaagtaataatgatgttccactcacttatta// 17881 tatagtgctaccatcatttttatgcattattgagaagtttattttacctttctttccact
   17941 cttatttcaaggctccaaaatttctctccccaacgtatattgggggcaacatgaatgccc
   18001 ccaatgtatatttgacccatacatgagtcagtagttccatgtactttttagaaatgcatg
     132                                         V  T  C  N  I  K  N
   18061 ttaaatgatgctgttactgtctattttgcttcttttagATGTAACATGTAACATTAAGAA
     139  G  R  C  E  Q  F  C  K  N  S  A  D  N  K  V  V  C  S  C  T
   18121 TGGCAGATGCGAGCAGTTTTGTAAAAATAGTGCTGATAACAAGGTGGTTTGCTCCTGTAC
     159  E  G  Y  R  L  A  E  N  Q  K  S  C  E  P  A  V
   18181 TGAGGGATATCGACTTGCAGAAAACCAGAAGTCCTGTGAACCAGCAGgtcataatctgaa
   18241 taagattttttaaagaaaatctgtatctgaaacttcagcattttaacaaacctacataat
   18301 tttaattcctacttgaatctgcttccttttgaaatcatagaaaatatcagtagcttgaat
// 18361 tagaccaattaattttctagattgcatcatattttaaatataaactatgtaatcatctac// 20581 caaatgttcttttcatgaaggatttgaaaactgtccatgaaaataacgcaatcaaccttt
   20641 tagcttgagactctattcactgattagatttttttaaatactgatgggcctgcttctcag
   20701 aagtgacaaggatgggcctcaatctcaatttttgtaatacatgttccatttgccaatgag
     175                                        P  F  P  C  G  R  V
   20761 aaatatcaggttactaatttttcttctatttttctagTGCCATTTCCATGTGGAAGAGTT
     182 S  V  S  Q  T  S  K  L  T  R  A  E  T  V  F  P  D  V  D  Y
   20821 TCTGTTTCACAAACTTCTAAGCTCACCCGTGCTGAGACTGTTTTTCCTGATGTGGACTAT
     202 V  N  S  T  E  A  E  T  I  L  D  N  I  T  Q  S  T  Q  S  F
   20881 GTAAATTCTACTGAAGCTGAAACCATTTTGGATAACATCACTCAAAGCACCCAATCATTT
     222 N  D  F  T  R  V  V  G  G  E  D  A  K  P  G  Q  F  P  W  Q
   20941 AATGACTTCACTCGGGTTGTTGGTGGAGAAGATGCCAAACCAGGTCAATTCCCTTGGCAG
   21001 gtactttatactgatggtgtgtcaaaactggagctcagctggcaagacacaggccaggtg
// 21061 ggagactgaggctattttactagacagacctattgggatgtgagaagtatttaggcaagt// 30241 gcttaagcttccctgtctctcattgtgtgttgctttcaatgcagttacataaatggcttt
   30301 tttgtttatgcaccaaaaacactaattcatctgcaaagctcacatttccagaaacattcc
   30361 atttctgccagcacctagaagccaatattttgcctattcctgtaaccagcacacatattt
     242                                                         V  V
   30421 atttttttctagatcaaatgtattatgcagtaagagtcttaattttgttttcacagGTTG
     244   L  N  G  K  V  D  A  F  C  G  G  S  I  V  N  E  K  W  I  V
   30481 TTTTGAATGGTAAAGTTGATGCATTCTGTGGAGGCTCTATCGTTAATGAAAAATGGATTG
     264   T  A  A  H  C  V  E  T  G  V  K  I  T  V  V  A  G
   30541 TAACTGCTGCCCACTGTGTTGAAACTGGTGTTAAAATTACAGTTGTCGCAGgtaaataca
   30601 cagaaagaataataatctgcagcaccactagctctttaatatgattggtacaccatattt
   30661 tactaaggtctaataaaattgttgttgaataaattgggctaaaggcagaagggtcataat
   30721 ttcagaacccacgtcgcaccgtcctccaagcatccatagttcttttgatatacccctatt
   30781 atcactcatttcagtgaggtacaattagttcttgatgtagccatttccataccagaaggc
   30841 cttcccaaaaatcagtgtcatgtcaccgatccttttatctctggtgcttggcacaacctg
   30901 tagcaggtcctcagaaaacaaacatttgaattaatggccaaatgagtttgtgctcaaaaa
   30961 aggggtgaggatacttgaaatttggaaaatctaggataattcatgactagtggattcatt
   31021 atcaccaatgaaaggcttataacagcatgagtgaacagaaccatctctatgatagtcctg
   31081 aatggctttttggtctgaaaaatatgcattggctctcattacatttaaccaaaattatca
   31141 caatataagaatgagatctttaacattgccaattaggtcagtggtcccaagtagtcactt
     281
   31201 agaaaatctgtgtatgtgaaatactgtttgtgacttaaaatgaaatttatttttaatagG
     281  E  H  N  I  E  E  T  E  H  T  E  Q  K  R  N  V  I  R  I  I
   31261 TGAACATAATATTGAGGAGACAGAACATACAGAGCAAAAGCGAAATGTGATTCGAATTAT
     301  P  H  H  N  Y  N  A  A  I  N  K  Y  N  H  D  I  A  L  L  E
   31321 TCCTCACCACAACTACAATGCAGCTATTAATAAGTACAACCATGACATTGCCCTTCTGGA
     321  L  D  E  P  L  V  L  N  S  Y  V  T  P  I  C  I  A  D  K  E
   31381 ACTGGACGAACCCTTAGTGCTAAACAGCTACGTTACACCTATTTGCATTGCTGACAAGGA
     341  Y  T  N  I  F  L  K  F  G  S  G  Y  V  S  G  W  G  R  V  F
   31441 ATACACGAACATCTTCCTCAAATTTGGATCTGGCTATGTAAGTGGCTGGGGAAGAGTCTT
     361  H  K  G  R  S  A  L  V  L  Q  Y  L  R  V  P  L  V  D  R  A
   31501 CCACAAAGGGAGATCAGCTTTAGTTCTTCAGTACCTTAGAGTTCCACTTGTTGACCGAGC
     381  T  C  L  R  S  T  K  F  T  I  Y  N  N  M  F  C  A  G  F  H
   31561 CACATGTCTTCGATCTACAAAGTTCACCATCTATAACAACATGTTCTGTGCTGGCTTCCA
     401  E  G  G  R  D  S  C  Q  G  D  S  G  G  P  H  V  T  E  V  E
   31621 TGAAGGAGGTAGAGATTCATGTCAAGGAGATAGTGGGGGACCCCATGTTACTGAAGTGGA
     421  G  T  S  F  L  T  G  I  I  S  W  G  E  E  C  A  M  K  G  K
   31681 AGGGACCAGTTTCTTAACTGGAATTATTAGCTGGGGTGAAGAGTGTGCAATGAAAGGCAA
     441  Y  G  I  Y  T  K  V  S  R  Y  V  N  W  I  K  E  K  T  K  L
   31741 ATATGGAATATATACCAAGGTATCCCGGTATGTCAACTGGATTAAGGAAAAAACAAAGCT
     461  T  \*
   31801 CACTTAAaccttggctttttgtggattccattgatgtgaatcagtcaccctgtatttgat
   31861 gatgcatgggactactgacaaaatcactctgaccccgccaagctgctgccttctcctgcc
   31921 ccaacctcacccccagccaggcctcactcttgctagttcctttagttcttttagtcaata
   31981 tatttttgtcttcgcatataagtataaataaacatatttttaaatttcttggctgggccc
   32041 agtggctcacgcctataatcccagcacttctggaggccaaggtgggcggatcacctgagg



