

QBQ0317N 2020

Lista de Exercícios 10

PCR

1. A técnica de PCR (*polymerase chain reaction* ou reação da polimerase em cadeia) é utilizada para obter grandes quantidades de DNA a partir de amostras contendo quantidades ínfimas de DNA. Detalhe os princípios desta reação, informando a enzima utilizada, os componentes/substratos da reação, etapas da reação e como o produto da reação (amplicon) pode ser analisado.
2. Um pesquisador interessado em amplificar o segmento de DNA esquematizado abaixo utilizou os pares de primers indicados em reações de PCR (reação A, par de primers A; reação B, par de primers B; reação C, par de primers C; reação D, par de primers D). Qual será o resultado que ele obteve em cada uma das reações? Explique.



Par de primers A: GACCTGTGGAAGC e CATACGGGATTGA

Par de primers B: GACCTGTGGAAGC e TCAATCCCGTATG

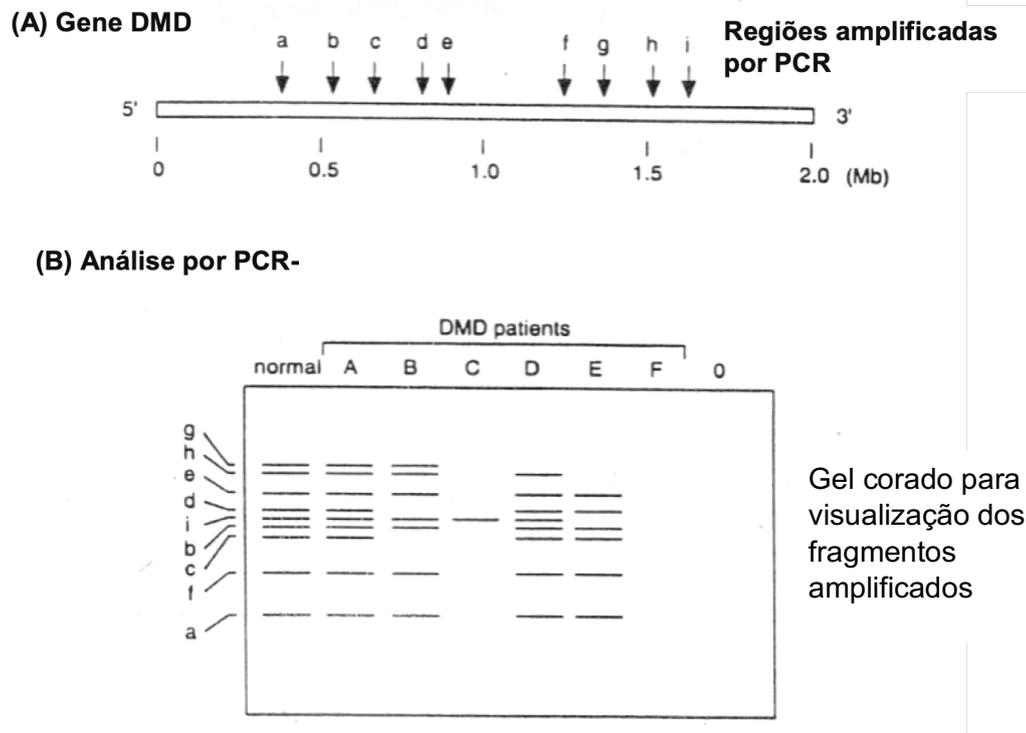
Par de primers C: CTGGACACCTTCG e TCAATCCCGTATG

Par de primers D: CTGTGGAAGC e ATCCCGTATG

Assinale a alternativa correta relativa à amplificação do segmento de DNA esquematizado acima.

- a) Primers: 5'-GACCTGTGGAAGC-3' e 5'-CATACGGGATTGA- 3' Amplicon: 226 pb
 - b) Primers: 5'-GACCTGTGGAAGC-3' e 5'-TCAATCCCGTATG-3' Amplicon: 226 pb
 - c) Primers: 5'-GACCTGTGGAAGC-3' e 5'-CATACGGGATTGA- 3' Amplicon: 200 pb
 - d) Primers: 5'-GACCTGTGGAAGC-3' e 5'-TCAATCCCGTATG-3' Amplicon: 200 pb
 - e) Primers: 5'-CTGGACACCTTCG -3' e 5'-TCAATCCCGTATG-3' Amplicon: 226 pb
3. Aponte diferenças entre o ensaio de PCR convencional e o ensaio de qPCR (PCR quantitativo).
 4. A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é uma das doenças genéticas mais comuns. O gene da DMD localiza-se no cromossomo X, possui mais de 2×10^6 pares de base e contém pelo menos 70 exons. 60% dos casos são devidos à ocorrência de deleções grandes concentradas em duas regiões do gene. 1/3 dos novos casos são devidos a novas mutações no gene. A técnica de PCR- multiplex é um método rápido e eficiente no diagnóstico da DMD e pode detectar aproximadamente 80% de todas as deleções já conhecidas. Nesta técnica são utilizados múltiplos pares de primers que podem amplificar, em uma reação, 9 segmentos (de tamanhos diferentes) do gene nas regiões onde as deleções ocorrem mais frequentemente. Um exemplo de análise por PCR-multiplex é apresentado abaixo. Descreva as deleções, se houverem, em cada um dos seis pacientes de DMD analisados. Que controle adicional você sugere para

confirmar o diagnóstico do paciente F? As setas apontam os nove sítios amplificados pela PCR. Normal equivale a um indivíduo do sexo masculino não portador da DMD e Q é um controle negativo onde não foi adicionado DNA à mistura de reação.



- O que são STRs (*Short Tandem Repeats*) e qual sua utilidade na determinação da impressão digital de DNA humano?
- Você gostaria de analisar os níveis expressão do oncogene Her2 em biópsias de tecido normal e de tecido tumoral. Que metodologia você poderia utilizar? Atente que se trata da análise da expressão de um único gene.

Tecnologia do DNA recombinante

- Quais são as características importantes que devem estar presentes num plasmídeo para a clonagem de um fragmento de DNA, se o objetivo da clonagem for também a obtenção da proteína codificada pelo DNA inserido?
- Um estagiário de iniciação científica isolou um segmento de DNA que codifica para uma proteína que é um potente estimulador do sistema imunológico. Ela agora deseja clonar este DNA em um vetor de expressão para produzir grande quantidade desta proteína em bactéria (*E. coli*). Entretanto, suspeita que a proteína recombinante interfere com o crescimento das bactérias. Como ele poderia contornar este problema?

9. Explique como a presença de íntrons em genes eucarióticos complica a produção de produtos proteicos que eles codificam quando a expressão é feita em bactéria. Como este problema pode ser resolvido?
10. O antígeno que é utilizado na vacina recombinante contra a Hepatite B é uma glicoproteína. Como esta proteína recombinante poderia ser obtida, considerando que bactérias são incapazes de glicosilar proteínas?