**Questões de Biotecnologia 1- Menck**

**Questões a serem discutidas em grupos de no máximo 4 alunos.**

1. Após a obtenção de células animais expressando uma determinada proteína, você verifica que diferentes clones apresentam diferenças de expressão gênica, sendo que alguns têm altos níveis da proteínas e outros praticamente não expressam o transgene. Dê razões para que isso ocorra.
2. Você transfecta cerca de um milhão de células humanas com dois plasmídeos (um micrograma de cada), um para expressão do gene *NEO* (que dá resistência a geneticina) e outro para expressão da gene repórter EGFP. Ao realizar a transfecção dos plasmídeos digeridos com uma enzima de restrição que lineariza os plasmídeos, e seleciona para geneticina, verifica que estes formam mais clones (cerca de 100 clones) do que se forem usados plasmídeos não digeridos (cerca de 10 clones). Pergunta-se: a) qual a eficiência de transfecção de plasmídeos digeridos e para plasmídeos não digeridos? Explique porque há essa diferença entre plasmídeos digeridos ou não com a enzima de restrição.
3. Ainda em relação ao exercício anterior, apesar dos genes *NEO* e *EGFP* estarem em plasmídeos distintos, você verifica que seus clones também expressam, na sua maioria, o gene *EGFP*. Sendo a eficiência é tão baixa, como você explica esse resultado?
4. Você tem células tronco totipotentes de camundongos em cultura em seu laboratório, expressando uma proteína de seu interesse. Como você pode obter um animal com essas células?
5. Explique como funciona o sistema de seleção genética positiva-negativa e qual a necessidade desse tipo de seleção para obtenção de animais nocautes.
6. Descreva o que significa reprogramação nuclear e como pode ser obtida?
7. O que são células pluripotentes induzidas?
8. Ao fazer uma transfecção de mRNA em células humanas você verifica que cerca de 80% das células expressam sua proteína 48 horas depois. Ao fazer o mesmo experimento com um plasmídeo vetor para o mesmo gene, apenas 10% das células apresentam a expressão da proteína. Qual a principal diferença entre as duas metodologias que podem explicar a diferença de resultados?

Links para vídeos relacionados a esta aula:

Vetores Tet- on Tet off

https://www.youtube.com/watch?v=42FPB2joEHE