QBQ1354 – Biologia Molecular 01/06/23

# Exercícios – 10

# Gabarito PCR e suas aplicações

1. Justifique as afirmações.

(a) Para aplicar a técnica da PCR é necessário ter conhecimento prévio da **sequência nucleotídica** do “alvo” que se deseja amplificar.

R: A partir da sequência nucleotídica do alvo, o/a pesquisador/a “desenha” **um PAR** de iniciadores **complementares** às extremidades 3’ da sequência de DNA **DUPLA FITA** que se deseja amplificar.

(b) Para executar a PCR é necessário utilizar **dois iniciadores** (primers).

R: É necessário utilizar dois iniciadores, CADA UM complementar à extremidade 3’ de CADA FITA DO DNA “ALVO”, para ter como produto da PCR um DNA dupla fita. Os iniciadores delimitam o início e término da região a ser amplificada.

(c) Nas reações de PCR utiliza-se a enzima **Taq DNA polimerase**.

R: Na PCR utiliza-se a Taq DNA polimerase que é uma enzima termoestável e não desnatura em temperaturas elevadas (~95 oC). A temperatura ótima da enzima para a catálise é de 72 oC.

2. Um ciclo de PCR envolve três faixas temperaturas de reação.

Explique o que ocorre nas temperaturas: 93 ºC - 95 ºC; 50 ºC - 65 ºC; e 72 ºC.

R: 93° - 95 °C: Desnaturação da dupla fita de DNA (separação das fitas);

50° - 65°C: Pareamento dos primers nas extremidades 3’ das fitas molde;

72°C: Síntese de DNA (síntese de novas fitas de DNA pela Taq polimerase).

3. (a) Quais componentes devem estar presentes na amostra denominada **Controle Negativo** da PCR?

R: No controle negativo devem estar presentes os 4 desoxinucleosídieos trifosfato, a Taq DNA polimerase, Mg2+, o par de primers e tampão adequado. A amostra NÃO DEVE CONTER DNA.

(b) Qual a **função** do Controle Negativo na reação de PCR?

R: O controle negativo é utilizado para saber se não há contaminação de DNA nos reagentes utilizados. Caso houver amplificação de algum produto nesta reação, o resultado da PCR das amostras não deve ser considerado e o experimento deve ser refeito com novos reagentes.

4. (a) Escreva a reação catalisada pela Transcriptase reversa viral.

R:

RNA + dNTPs + Primer (de DNA) cDNA (fita simples) + PPi

cDNA (fita simples) + dNTPs cDNA (dupla fita) + PPi

(b) Por que a descoberta do mecanismo de ação desta enzima modificou o Dogma da Biologia Molecular?

R: O Dogma original propõe que o fluxo de informação gênica é linear e segue o sentido DNA → RNA → Proteínas.

A descoberta do mecanismo de ação da transcriptase reversa mostrou que o DNA pode ser sintetizado a partir de RNA, num processo que seria o caminho inverso da transcrição. RNA → DNA.

5. Pesquise

(a) Quantos aminoácidos possui a proteína Spike (espícula) do vírus SARS-CoV-2? Indique a Referência consultada.

R: A proteína S (Spike) do SARS-CoV-2 é composta por 1273 resíduos de aminoácidos.

Referência ................

(b) Quantos nucleotídeos do vírus codificam a proteína Spike?

R: Considerando que cada aminoácido é codificado por uma trinca de nucleotídeos, seriam necessários 3819 nucleotídeos.

(c) Qual a função/papel da proteína Spike do vírus SARS-CoV-2?

R: A proteína Spike está situada na superfície do envelope viral. Ela atua no reconhecimento e ligação do vírus a um receptor localizado na superfície da célula hospedeira, promovendo a entrada do RNA viral na célula.

(Complementação Optativa. A proteína S interage com o receptor ACE2 - Angiotensin-converting enzyme 2 - presente na superfície da quase totalidade das humanas).

(d) Justifique a origem das mutações da proteína Spike nas variantes do vírus
SARS-CoV-2.

R: O SARS-CoV-2 é um vírus de RNA que se replica pela enzima RNA replicase (uma RNA polimerase dependente de RNA). Esta enzima comete um erro a cada 104 nucleotídeos adicionados. Erros ocorrem aleatoriamente e podem ocorrer no trecho do RNA que codifica a proteína Spike.