

Exercícios – 13 Gabarito

Sequenciamento do DNA. Noções de Bioinformática. Projetos Genoma

1. O método de sequenciamento do DNA desenvolvido por Fred Sanger baseia-se na síntese enzimática de DNA *in vitro*. Neste método são utilizados didesoxinucleosídeos trifosfato (ddNTPs) e desoxinucleosídeos trifosfato (dNTPs), juntamente com outros reagentes.

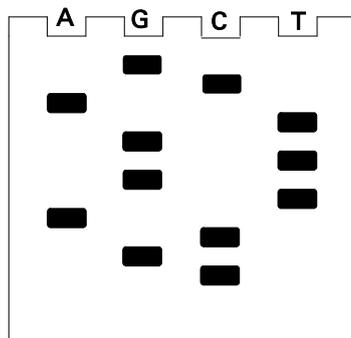
(a) Descreva as diferenças estruturais entre os ddNTPs e os dNTPs.

R: Diferentemente dos dNTPs, que possuem um grupo hidroxila (-OH) apenas no carbono 3', os ddNTPs não possuem um grupo hidroxila nem no carbono 3' e nem no carbono 2' do açúcar.

(b) Justifique por que quando um didesoxinucleotídeo (ddNMP) é adicionado à cadeia de DNA que está sendo sintetizada a replicação da fita é interrompida.

R: Por não possuírem o grupo OH no carbono 3', um ddNTP não permite o ataque nucleofílico ao próximo nucleotídeo para a formação da ligação fosfodiéster do DNA.

2. O diagrama abaixo representa uma região de um gel de sequenciamento de DNA. Em cada coluna constam os produtos da reação com um dos 4 didesoxinucleotídeos (A,G,C,T).



Dentre as alternativas abaixo, qual descreve a sequência da fita que está sendo sintetizada (**sentido 5' para 3'**)?

- (a) GCATGTGTACGC
- (b) CGTACACATGCG
- (c) GCGTACACATGC
- (d) CGCATGTGTACG
- (e) AAAGGGCCCCTT

R: Alternativa (d).

3. Acesse: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

Descubra a qual organismo e a qual gene ou proteína corresponde a sequência XP810645.

R: Enzima nitroreductase putativa do organismo Trypanosoma cruzi.

4. Genoma Humano

(a) Quantos pares de bases estima-se possua o Genoma Humano? Quantos genes codificadores de proteína? Que porcentagem do genoma os genes codificadores de proteína ocupam?

R: Cerca de 3 bilhões de pares de bases, com aproximadamente 19 mil genes codificadores de proteína. A porcentagem com relação ao genoma é de cerca 1%.

(b) O restante do genoma é ocupado por DNA não codificador de proteínas (noncoding DNA, ncDNA). Cite três classes de sequências de DNA não codificador, suas características e possível função (quando tiver sido definida).

R:

- Espécies de rRNA e tRNA
- Pseudogenes – cópias inativas de genes codificadores de proteínas
- Introns e regiões não traduzidas do mRNA (26%)
- Sequências de DNA regulatórias da expressão gênica
- Elementos móveis (transposons)
- Sequências de DNA repetitivo (50%) (Ex: microssatélites)

5. A hemocromatose hereditária é uma doença genética caracterizada pelo acúmulo excessivo de ferro em certos órgãos. A doença é caracterizado por uma mutação na região X no gene HFE, um regulador de homeostase de ferro.

A sequência da região X normal e da região X* mutada está disponível em bancos de dados.

Um indivíduo apresenta acúmulo de ferro no fígado. Proponha um teste molecular para diagnosticar se esse indivíduo apresenta hemocromatose hereditária.

Indique as etapas experimentais do teste proposto a partir do sangue desse indivíduo.

R: Extrair o DNA do sangue do paciente;

Desenhar primers flanqueando a região X do gene HFE;

Realizar a PCR para amplificar a região de interesse, usando os primers e o DNA do paciente como base;

Eletroforese em gel de agarose e isolamento do produto da PCR

Sequenciar o produto da PCR

Comparar a sequência obtida com a sequência depositada em Bancos de Dados.