Exercício 7 – Aula “Sequenciamento de DNA”

1) Descreva os reagentes necessários e os passos envolvidos no sequenciamento do fragmento de DNA abaixo utilizando o método dideoxi (método de Sanger). Faça um esquema para auxiliar a descrição.

Reagentes necessários:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | **Método radioativo** | **Método fluorescente** |
| **Molde** | DNA molde | |
| **Primer** | Primer radiotivo | Primer normal |
| **Substrato 1** | dNTP | |
| **Substrato 2** | ddNTP normal | ddNTP fluorescente |
| **Enzima** | DNA polimerase | |
| **Outros** | Tampão | |
| **Detecção** | Gel de acrilamida + filme autoradiográfico | Sistema de eletroforese capilar + detector de fluorescencia |

Passos envolvidos:

1. Obter DNA a ser sequenciado (DNA genômico, plasmídio, etc)
2. Realizar reação de PCR
3. Se a reação foi pelo método radiativo, deverá correr um gel e revelar em filme autorradiográfico
4. Se a reação foi com ddNTPs fluorescentes a amostra será injetada em um equipamento de eletroforese capilar acoplado com um detector de fluorescência.

Esquema dos produtos da PCR

5’ aacaagaggcggattctgggaaagggaccgtgtcc 3’

Invertendo a direção

3’ CCTGTGCCAGGGAAAGGGTCTTAGGCGGAGAACAA 5’

5` **GGACACG**GTCCCTTTCCCAGAATCCGCCTCTTGTT 3`

Primer: 5’ \***GGACAC** 3’

Produtos da PCR:

**\*GGACACG**GTCCCTTTCCCAGAATCCGCCTCTTGTT

**\*GGACACG**GTCCCTTTCCCAGAATCCGCCTCTTGT

**\*GGACACG**GTCCCTTTCCCAGAATCCGCCTCTTG

**\*GGACACG**GTCCCTTTCCCAGAATCCGCCTCTT

**\*GGACACG**GTCCCTTTCCCAGAATCCGCCTCT

**\*GGACACG**GTCCCTTTCCCAGAATCCGCCTC

**\*GGACACG**GTCCCTTTCCCAGAATCCGCCT

**\*GGACACG**GTCCCTTTCCCAGAATCCGCC

**\*GGACACG**GTCCCTTTCCCAGAATCCGC

**\*GGACACG**GTCCCTTTCCCAGAATCCG

**\*GGACACG**GTCCCTTTCCCAGAATCC

**\*GGACACG**GTCCCTTTCCCAGAATC

**\*GGACACG**GTCCCTTTCCCAGAAT

**\*GGACACG**GTCCCTTTCCCAGAA

**\*GGACACG**GTCCCTTTCCCAGA

**\*GGACACG**GTCCCTTTCCCAG

**\*GGACACG**GTCCCTTTCCCA

**\*GGACACG**GTCCCTTTCCC

**\*GGACACG**GTCCCTTTCC

**\*GGACACG**GTCCCTTTC

**\*GGACACG**GTCCCTTT

**\*GGACACG**GTCCCTT

**\*GGACACG**GTCCCT

**\*GGACACG**GTCCC

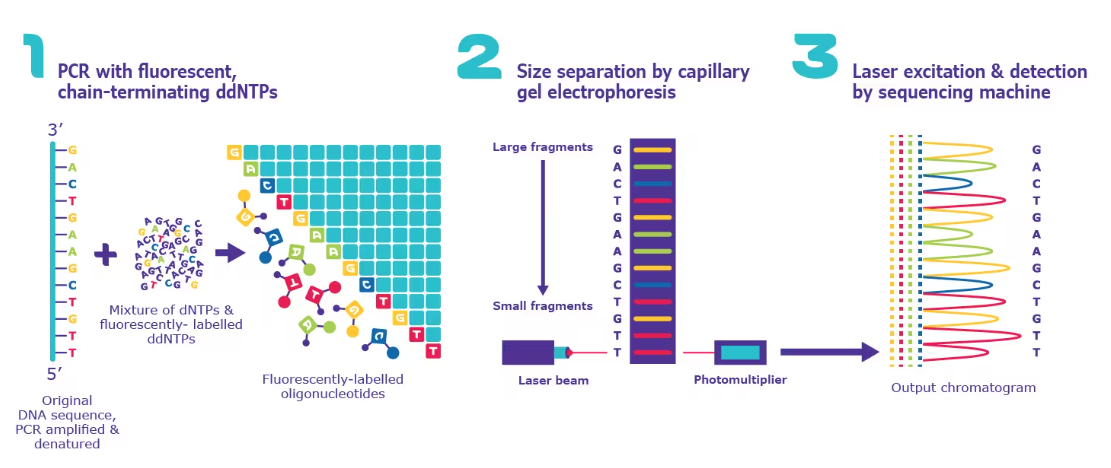
**\*GGACACG**GTCC

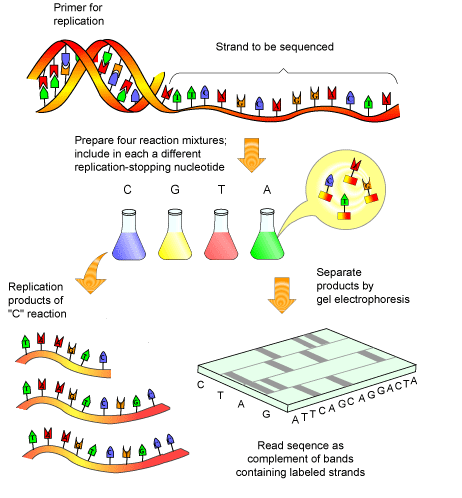
**\*GGACACG**GTC

**\*GGACACG**GT

**\*GGACACG**G

**\*GGACACG**





**2) Os genomas dos organismos eucariotos são grandes mas apenas uma pequena fração do DNA contem informação genética usada para a síntese de proteínas. Que estratégia utilizando sequenciamento de DNA de nova geração poderia ser utilizada para determinar quais são os genes ativos em um determinado tipo celular?**

Realizar o transcriptoma em vez do genoma.

Qualquer estratégia poderia ser utilizada, no caso por nanopore pode ser sequenciado diretamente, nos outros casos é necessário produzir o DNA complementar por transcriptase reversa.

