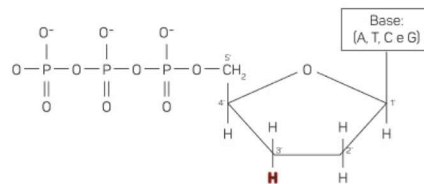


Exercícios – 14 - Gabarito

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) Apresente a estrutura **completa** de um **didesoxinucleosídeo** trifosfato. A base nitrogenada pode ser abreviada como BN.



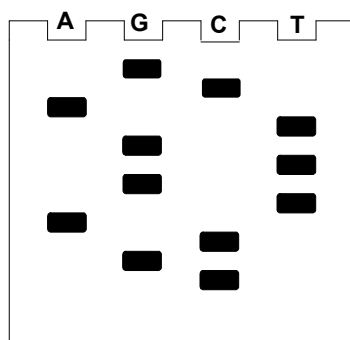
(b) Qual o efeito da estrutura modificada dos didesoxinucleosídeos trifosfato na reação de polimerização do DNA? **Justifique sua resposta.**

Os didesoxinucleosídeos trifosfato não possuem uma hidroxila livre no carbono 3' da desoxirribose. Quando incorporados a uma fita de DNA nascente, interrompem o prosseguimento da síntese de DNA pois impedem o ataque nucleofílico ao próximo nucleotídeo para a formação da ligação fosfodiéster do DNA.

(c) Por que é necessária a presença de um iniciador (“primer”) na reação de sequenciamento do DNA pelo método de Sanger?

A reação de sequenciamento por Sanger se baseia na amplificação prévia da sequência por uma DNA polimerase, a qual requer um iniciador que provê uma extremidade dupla fita com um C 3'-OH livre para a incorporação de novos nucleotídeos.

2. A figura 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

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

Busque as seguintes informações referentes à sequência **XP810645**.

(a) A qual organismo pertence? *Trypanosoma cruzi*

(b) Esta sequência corresponde a um gene ou a uma proteína? **Proteína**

(c) **Quantos** nucleotídeos ou resíduos de aminoácidos tem a sequência XP810645? **312 aa.**

(d) Qual nucleotídeo ou aminoácido ocupa a posição 1 da sequência XP810645? **Metionina.**

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?

Cerca de 3 bilhões de pares de bases, com aproximadamente 19 mil genes codificadores de proteína (cerca de 1% do genoma).

(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).

Genes que codificam para classes de RNA ribossômico e RNA transportador, envolvidos na síntese proteica; sequências de DNA repetitivos; íntrons e regiões não-traduzidas, cuja função ainda não é bem esclarecida.

5. A hemocromatose hereditária (HH) é uma doença genética caracterizada pelo acúmulo excessivo de ferro em certos órgãos. Alguns pacientes com HH apresentam a mutação Cys282Tyr na proteína HFE reguladora da homeostase de ferro.

Um indivíduo apresenta acúmulo de ferro no fígado. Proponha um teste molecular para diagnosticar se esse indivíduo apresenta a mutação Cys282Tyr.

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

Nota: **A sequência nucleotídica** da região onde se encontra a mutação Cys282Tyr está disponível em bancos de dados.

A partir da amostra de sangue, realiza-se a extração do DNA genômico.

A partir da sequência nucleotídica da região onde se encontra a mutação Cys282Tyr são desenhados primers para realizar a PCR desta região.

O produto da PCR é analisado em gel de agarose. Se possuir o tamanho esperado (ver controle positivo da PCR), este produto é sequenciado pelo método de Sanger.

A sequência obtida é comparada com a sequência da mesma região de indivíduo normal, que está depositada no banco de dados.