

CCM0121 – Biologia II – Biomol – 2025
EXERCÍCIOS - Sequenciamento de DNA

1. O método de sequenciamento de DNA inventado por Fred Sanger está baseado na síntese enzimática de DNA *in vitro*. Desenhe a estrutura dos dideoxirribonucleotídeos (ddNTP) utilizados na síntese do DNA neste método e aponte a diferença com os dNTPs.
2. Quais são os substratos necessários na reação de sequenciamento de DNA pelo método de Sanger?
3. A eletroforese utilizada para separar os fragmentos de DNA sintetizados na reação de sequenciamento pelo método de Sanger tem resolução para distinguir fragmentos de DNA que tem qual diferença de tamanho (em nucleotídeos)?
4. O gel de sequenciamento no método de Sanger “clássico” é lido de baixo para cima ou de cima para baixo? De 5' → 3' ou de 3' → 5'?
5. Que tipo de modificação adicional tem os ddNTPs utilizados no sequenciamento automatizado pelo método de Sanger?
6. O fragmento de DNA abaixo foi sequenciado pelo método de Sanger. O asterisco indica um marcador radiativo. A reação de sequenciamento deste fragmento de DNA foi realizada com cada uma das 4 misturas de nucleotídeos (em tampão apropriado e DNA polimerase) listadas a seguir. O DNA resultante da reação foi separado por eletroforese, e o gel foi exposto ao filme de Raios-X. O padrão de bandas resultante da mistura de nucleotídeos #1 está mostrado. Supondo que as reações com as demais misturas foram separadas no mesmo gel, qual seria a aparência das canaletas 2, 3 e 4?

*5' ——— 3'-OH
3' ——— ATTACGCAAGGACATTAGAC---5'

#1. dATP, dTTP, dCTP, dGTP, ddTTP

#2. dATP, dTTP, dCTP, dGTP, ddGTP

#3. dATP, dCTP, dGTP, ddTTP

#4. dATP, dTTP, dCTP, dGTP



7. Determine a sequência do DNA que foi utilizado na reação de sequenciamento cujo autorradiograma do gel está mostrado na figura abaixo (pares de base da posição 50 a 116).

Canaletas 1:ddG; 2:ddA; 3:ddT e 4: ddC



8. Os eletroferogramas abaixo mostram o resultado do sequenciamento automatizado (método de Sanger) de um produto de PCR obtido a partir da amplificação do DNA genômico humano de 3 indivíduos. A seta aponta um SNP (polimorfismo de único nucleotídeo). Note que a posição indicada pela seta apresenta um pico único ou dois picos superpostos, dependendo do indivíduo. Discuta este resultado.

