

### Exercícios 3

- 1) Para uma clonagem tradicional utilizando enzima de restrição e DNA ligase, o produto da etapa de amplificação por PCR deve ter extremidades coesivas, cegas ou podem ser de qualquer tipo? Por quê?
- 2) Na aula, vimos diversos métodos de ligação/inserção da sequência de interesse ao vetor, algumas com protocolos consideravelmente diversos das outras. Discuta diferenças nos componentes presentes em cada tipo de reação e como a manipulação da temperatura da reação afeta o funcionamento dessas técnicas de clonagem.

#### **“Clonagem virtual” usando SnapGene**

Fazer o download do programa SnapGene viewer:

<https://www.snapgene.com/snapgene-viewer>

Acessar <https://www.addgene.org/vector-database/2565/> e fazer o download da sequência do plasmídeo pET-28a. Caminho: analyze sequence> sequence> FASTA > selecionar sequência completa e copiar (Ctrl + C)

Abrir o SnapGene, selecionar “New DNA or RNA file” e colar a sequência do vetor na caixa de texto (ignorar a propaganda).

Criar um DNA circular com o nome “pET-28 vazio”. Deixar a caixa “detect common features” marcada.

- 3) Quais elementos de sequência detectados no vetor você reconhece e qual a localização deles (vamos falar dos desconhecidos em outra aula)?

Para trocar entre o mapa do vetor e a sequência do vetor, clicar nas abas “Map” ou “Sequence” na parte inferior da tela.

Na aba “Sequence”, clicar em “Asn, Arg, Ala” no lado esquerdo da janela.

Navegar pela sequência do vetor com o botão “Asn, Arg, Ala” apertado ou não.

- 4) Que efeito esse botão tem e qual a sequência de aminoácidos do tag “6xHIS”?

Clicar em “Enzymes” e “Choose Enzymes”, depois em “remove all”.

Marcar a caixa “Choose from” e trocar de “all comercial” para “unique 6+ cutters”

- 5) Analisando o mapa do vetor, os elementos de sequência que ele apresenta e a densidade de sítios de enzima de restrição indique a região do vetor (em pb) em que você deve clonar seu gene de interesse nesse vetor (conhecido como multiple cloning site – MCS).

Usando as sequências do gene Rrp47 obtidas na aula passada, gerar uma nova molécula de DNA, em que o gene Rrp47 está clonado na região correta do vetor. Lembrar que o gene será amplificado do genoma da levedura por PCR usando os primers apresentados na aula passada. Para realizar essa tarefa, será necessário manipular as sequências em um editor de texto (word ou equivalente) e depois gerar uma nova molécula de DNA do snapgene, colando a sequência

nova na caixa de texto, uma vez que essa versão do snapgene é gratuita e não permite que sejam coladas sequências de DNA diretamente no arquivo já gerado.

- 6) Faça prints de tela do snapgene, mostrando na aba “sequence” as regiões iniciais e finais do gene Rrp47 clonados corretamente no vetor pET-28a.
- 7) Qual o tamanho final desse vetor e quais os primeiros 10 aminoácidos da proteína (começando pelo N-terminal) que será expressa na bactéria a partir dele?

### **Análise de sequências e alinhamento**

Copiar a sequência de DNA a seguir

```
atggaggaggagacgcatactgacgcaaaaatccgtgctgaaaatggaacaggggtccagccctcggg
gtcctggctgcagcctccggcactttgctgacgaacagaaacctgctgctgcggccagatggctctgc
ttccttcctgcaagggtgacacctctgtcctggcgggtgtgtacgggcccggccgaggtgaagggtcagc
aaagagattttcaacaaggccacactcgaagtgatcctgaggccgaagattgggctgctgggtgttg
cagagaagagccgggagcggctgatcaggaacacgtgacgagggcgggtgggtgctgggcacgttgaccc
ccgcacctccatcacctggtgctgcagggtgtcagcgatgccggctctctcctggcctggtgtctg
aatgccgcctgcatggcattggtggatgcagggtgtgcccatgccgggctctctctctgtggggctgct
gcgccctggactctgatgggaccctcgtgctggatcctacatccaagcaagaaaaggaggcccgggc
agtcctgacctttgccctggacagcgtggaacggaagctgctgatgtccagcaccaaggggctctac
tcagacactgagctccagcagtgctggctgcccaggccgcttcgcaacacgtctctccgtttct
accgggaatcgctgcagaggcgttactccaagagctga
```

Acessar BLAST (basic local alignment search tool – NCBI)

Selecionar “nucleotide BLAST”

Colar a sequência acima na caixa de texto

Clicar em BLAST (porção inferior da página) e aguardar o resultado

- 8) De qual organismo e de qual gene essa sequência deriva?

Repetir a procura, alterando a caixa “organism” para “Saccharomyces (taxid:4930)”

Acessar <https://web.expasy.org/translate/> e postar a sequência acima na caixa

Clicar em “translate”

Copiar a sequência de aminoácidos da proteína (deve começar com MEEETHHT...)

Acessar o BLAST novamente e entrar em ProteinBLAST

Colar a sequência de aminoácidos e procurar no banco de dados geral

Repetir a procura selecionando “organism” como “Saccharomyces (taxid:4930)” como acima

- 9) Por que a procura com a sequência de DNA não encontrou uma sequência em leveduras, mas a procura com a sequência de aminoácidos funcionou?

Criar um arquivo de texto no bloco de notas

Na primeira linha escrever “>RRP46humano” (sem aspas e sem espaços)

Na linha seguinte, colar a sequência de aminoácidos (MEEETH....)

Posteriormente, numa nova linha (sem linhas vazias entre as sequências), escrever

">RRP46levedura" (sem aspas e sem espaços)

Acessar o Saccharomyces genome database (aula passada) e procurar pelo gene Rrp46 (não é Rrp47!). Baixar a sequência da proteína (>sequence>download>protein), e colar a sequência de aminoácidos no bloco de notas, na linha seguinte ao item anterior

Acessar Uniprot.org e procurar por Rrp46 drosophila

Selecionar o ID Q9VGZ2

Rolar até a parte inferior da página, na parte "Sequence"

Clicar em "Download"

Selecionar a sequência de aminoácidos e colar no bloco de notas, com identificador ">RRP46mosca" como acima

Voltar ao Uniprot e procurar por "Rrp46 Zebrafish"

(ID correto é A0A8M1NAS6)

Copiar a sequência para o bloco de notas com ID ">RRP46peixe"

Acessar Clustal Omega (Multiple sequence alignment)

Postar todas as informações contidas no bloco de notas (incluindo os identificadores) na caixa de texto.

Clicar em "Submit"

Em caso de uma mensagem de erro, verificar que os IDs de cada uma das quatro sequências começa com >, que não há espaços no nome dos IDs e que não há linhas em branco.

- 10) Analise o alinhamento entre as quatro proteínas. O que significa um ponto (.) e o que significa um asterisco (\*) abaixo das sequências? Comente sobre a conservação dessa proteína nessas quatro espécies.