

Exercícios 4

- 1) Apresente um esquema de um plasmídeo contendo uma ordem plausível de elementos de sequência necessários para expressão de um gene de interesse contendo um Flag tag C-terminal em células humanas.

- 2) O sistema de seleção azul/branco reporta a presença ou não de um gene LacZ funcional no vetor de clonagem. Esse sistema funcionaria em qualquer bactéria *E. coli*? Que modificação ou modificações essa bactéria precisaria ter para que o sistema de seleção funcione?

- 3) Você desenhou um esquema de clonagem de um gene de interesse em dois vetores diferentes, um de clonagem e outro de expressão. Para isso você desenhou dois pares de primers de PCR diferentes (um para cada clonagem) e encomendou a síntese dos primers de uma empresa. Por um descuido seu, a sequência que você encomendou da empresa teve um erro. Os dois primers forward continham um A adicional imediatamente antes do ATG (códon iniciador) do seu gene de interesse. Descreva os efeitos desse erro no processo de clonagem do seu gene nos dois vetores e na posterior utilização desse dois vetores.

- 4) Suponha que você está trabalhando com uma proteína ainda não caracterizada. Primeiro você gostaria de expressar essa proteína em bactérias e purificá-la por técnicas cromatográficas. Posteriormente, você pretende expressar essa proteína em células humanas e descobrir qual a localização intracelular dessa proteína.
 - A) Escolha dois tags que seriam adequados para facilitar a purificação da sua proteína de interesse e descreva genericamente como a presença desses tags poderia ser explorado em uma técnica de purificação da sua proteína de interesse.
 - B) Quais tags seriam mais adequadas para visualizar a localização intracelular da sua proteína?