

Exercícios sobre Técnicas de Biologia Molecular

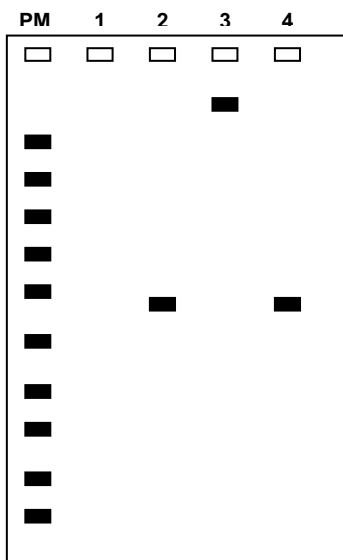
- 1) Qual a função do sal na extração de DNA?
- 2) Como isolar o DNA da solução onde ele se encontra depois da remoção dos restos celulares?
- 3) Quais são as fases da reação em cadeia da polimerase?
- 4) Quais são todos os reagentes necessários para a realização da PCR?
- 5) O que anda mais longe no gel, um fragmento de DNA menor ou maior? Por que?
- 6) Abaixo está representada a sequência de um gene hipotético (as duas fitas do DNA estão representadas). Considere que você deseja realizar um PCR de parte desse gene a partir dos *primers* cujas sequências estão descritas abaixo.
 - a) Marque o sítio de anelamento dos *primers*. Trace uma linha abaixo da abaixo dos nucleotídeos.
 - b) Qual o tamanho do fragmento gerado? (Os *primers* participam da contagem! Para facilitar a contagem, cada linha tem 60 nucleotídeos)

Primer direto: 5'CTGCGCGGTAGCAT3'
Primer reverso: 3'CGGGAGACTAGTAG5'

```
1 5'TACGACCCGCCGCGCGCCTGCGCGGTAGCATCGCGGAGTCGGTGCTTTAGTACGCCGCT
   3'ATGCTGGGCGGCGCCGCGCACGCGCCATCGTAGCGCCTCAGCCACGAAATCATGCGGCGA
61 GGCACCTT TACTCTCGCCGGCCGCGCGAACCCGTTT GAGCTCGGTATCCTAGTGCACACG
   CCGTGGAATGAGAGCGGCCGCGCGCTTGGGCAAACCTCGAGCCATAGGATCACGTGTGC
121 CTTTGCAAGCGACGGCGCCATGAGTCTGACTTCCAGTTCCAGCGTACGAGTTGAATGGAT
   GGAACGTTTCGCTGCCGCGGTACTCAGACTGAAGGTCAAGGTGCGATGCTCAACTTACCTA
181 CGCAGCAGATATCATTGCTGCTGGGACAGCTGCATTT GGTTATCTAGCTTACAATTGATT
   GCGTCGTCTATAGTAACGACGACCCTGTGACGTAAACCAATAGATCGAATGTTAACCTAA
241 TTATGTTAAAGATCATCGAATTTAAAGCTATGATAAACCTTCACATCCAGAAAGACAACC
   AATACAATTTCTAGTAGCTTAAATTTGATACTATTTGGAAGTGTAGGTCTTTCTGTTGG
301 CAAGATAGTACATGCTTTTGACATGGAGGATTTGGGAGATAAAGCTGTGTACTGCCGTTG
   GTTCTATCATGTACGAAAACCTGTACCTCC TAAACCCTCTA TTTCGACACATGACGGCAAC
361 TTGGAGGTCCTGCAGGTTCCCATTTCTGTGATGGGGCTCACACCCGGGATAACGAAGAGAC
   AACCTCCAGGACGTCCAAGGGTAAGACACTACCCGAGTGTGGGCCCTATTGCTTCTCTG
421 TGGAGACAATGTGGGCCCTCTGATCATCAAGTAATTCGAAACTTAAATGGACACTTTTGA3'
   ACCTCTGTT ACACCCGGGAGACTAGTAGTTCATTAAGCTTTGAATTTACCTGTGAAAACCT5'
```
- 7) Você tem um tubo com a mistura de 5 fragmentos de tamanhos diferentes de DNA, com os seguintes comprimentos: 98 pb, 146 pb, 35 pb, 187 pb e 69 pb. Agora você fará uma eletroforese em gel de agarose para separar estes fragmentos.
 - a) A partir de qual dos pólos, positivo ou negativo, iniciará a corrida?

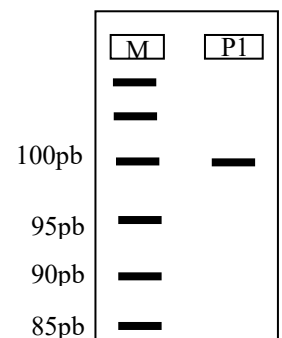
b) Faça um esquema do gel de agarose com o resultado dessa eletroforese.

8) Um laboratório de análises clínicas recebeu duas amostras de sangue para diagnóstico de uma infecção viral. A metodologia escolhida pelo laboratório foi a PCR. Inicialmente foi feita uma extração de DNA das amostras. Os DNAs foram utilizados como moldes para as reações. Na PCR foram empregados *primers* específicos para um gene viral, que não ocorre em humanos. Após, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose. A imagem abaixo é um esquema do gel de agarose gerado. Com base nestas informações e no esquema abaixo, quais foram os resultados dos testes? Os pacientes estão infectados pelo vírus ou não? O que significa o controle negativo e o não aparecimento de banda neste poço? Se houvesse uma banda no controle negativo, o que o laboratório deveria fazer?



PM = marcador de peso molecular de 100 pb, 1 = controle negativo, 2 = controle positivo, 3 = paciente A, 4 = paciente B

9) Fibrose Cística (HAR) é um distúrbio no gene CFTR. Uma das mutações mais comuns envolvidas é uma deleção de 3nt no códon que codifica fenilalanina na posição 508 ($\Delta F508$). Esta deleção pode ser identificada pela amplificação (PCR) do segmento gênico que flanqueia a mutação. O alelo normal tem 98pb. Analise o resultado do PCR no gel de eletroforese ao lado e dê o diagnóstico do paciente. Represente num gel de eletroforese o resultado de um exame molecular, de uma família com pais normais, 2 filhos afetados e uma filha normal homozigota. Use um marcador de peso molecular de 5p



10) A infecção por citomegalovírus é especialmente problemática em pacientes imunocomprometidos, onde causa distúrbios severos como pneumonites, retinites, etc. O diagnóstico por PCR, pela amplificação específica de segmentos gênicos do agente infeccioso, tem sido um fator importante na decisão terapêutica destes pacientes. O diagnóstico molecular é feito por análise direta do resultado do PCR, onde amplifica-se um segmento do gene viral *MIE* de 305pb. Represente esquematicamente num gel de eletroforese os resultados para: um controle negativo, um paciente infectado, um paciente infectado com uma carga viral bastante alta, um paciente não-infectado, um marcador de peso molecular, e um controle positivo gerado a partir de DNA viral isolado.