

Atividades de fixação – Aulas sobre PCR e Clonagem

1. Um pesquisador precisava avaliar a expressão do gene GH1 abaixo, cujo intron predito está marcado em vermelho:

```
ATGGTTTCTTCCCTTCTCGCTCTCGGCGCCTTGGTCGCCTCCGCCGTTGCTGCTCCCTCGATGCCCTTGCCAACTGTACTTTACCGATGCGGCCTCGGCCA
TCAAGGGCAAGAATAGTTGCCAAACCATCGTCCTCAAGGACATTGCCGTGCCCGCGGTACCACTCTTGACATGACGGGCCTCAAGTCCGGCACCCACGT
GCGTCTAAGCTTTGAGCCTCGAGCCAATCAACCGGTCTATCGAGCAGCTCCGCTGACTGACACGCGAGTATAGGTTACTTTCCAAGGCAATACCACTTTG
GCTACACACTGTGGACGGGCCCCCTCATCTCTTCTCCGGCTCCAACATCATCATTGACGGCACCAGCGACCACGTCATCGACTGCCAGGGCCAGCGCTGG
TGGGACGGCAAGGGGGGCAACGGCGGCAAGGTCAAGCCCAAGTTCTTCTCGGCCAGAGCCTCAAGAACTCCATCATCAGGGGCATCAACGTCCTGAAC
ACCCCGTCCAGGCCTTCTCTATCAACAGCGTCACCAACCTCAGCGTCTACGACGTACCCCTCGACAACCTCCCTCGGCGACACCCAGGGCGGCCACAACAC
CGACGCGTTCGACGTCGGCTCCTCAACGGCGTCTACATCTCCGGCGCGTCTGTCGAAGAACAGGACGACTGCCTCGCCATCAACTCGGGCACCAACATC
ACCTTCACGGCGGCGACTGCTCCGGCGGCCACGGCTCTCCATCGGCTCCGTCCGGCGGCCACAGCAGCAACGTCGTCGACACCGTCTCATCTCCAATC
CAGGATCTCCAACCTCGGCAACGGCGTCCGCTCAAGACGGTCTACCGCGCCACCGGCTCCGTCTCCAACGTCAGTACAAGGACATCGCCTGTCCAACA
TCGCCAATACGGCATCGTTGTCGAGCAGGACTACGAGAACGGCAAGCCAACCGGTACCCACCGACGGCGTCCCATCACCAACCTCACCTCAGCAA
CGTCACCGGCACCGTCGCCTCTCCGCATCGACGTCTACATCTCTGCGCCACCGGCGCTGCGACGACTGGACGTGGACCAACGTCAGCGTCACTGGC
GGCATAAGCTACCCCAACTGCACCGGCATTCCCGAGGGCAGCGCGCTGCTTGCTGA
```

Para realizar a RTqPCR, desenhou o seguinte par de primers:

GH1qRT-Fw (5'-GCCCAAACCATCGTCCTCAAG-3')

GH1qRT-Rv (5'-GTAGCCAAAGGTGGTATTGC-3').

Antes de correr uma placa de qPCR para avaliar a eficiência dos primers decidiu realizar uma PCR end-point com as 6 amostras de RNA em estudo, uma amostra de gDNA e um controle branco (nessa ordem) no termociclador comum porém utilizando os reagentes de qPCR, na tentativa de fazer um teste prévio de especificidade dos primers. O gel de agarose abaixo representa o resultado dessas reações:

Com base nas informações disponíveis, responda as questões abaixo:



- Ao analisar esse par de primers *in silico*, você os consideraria viáveis? Explique apontando os critérios.
- Este gel utilizou um pente com 1mm de espessura e 1% de agarose. Para que as bandas ficassem mais finas e nítidas você aumentaria ou diminuiria a concentração do gel?
- Se o objetivo é apenas testar se os primers funcionam, por que não utilizar um kit de PCR comum ao invés de rodar uma reação end-point com reagentes para qPCR?
- O resultado dessa PCR garante que o RNA utilizado esteja íntegro e em alta qualidade?
- Monte a sequência do gene acima no Serial Cloner e avalie o tamanho do fragmento esperado e se as bandas amplificadas correspondem ao esperado.

2. Um pesquisador precisava do vetor pSilent1 para construir um cassete de RNA de interferência. Este vetor contém dois pontos de ligação de fragmentos de DNA separados por um espaçador (intron), região que é flanqueada por promotor e terminador “fortes” para uso em fungos. Na ausência do vetor original ele encontrou um vetor de RNAi já montado chamado pREDI, que já tem em sua região de ligação dois fragmentos do gene DsRed ligados de forma invertida. Ele decidiu então, em duas etapas, remover os dois fragmentos de DsRed e ligar em seu lugar os fragmentos do seu gene de interesse, sendo que para a remoção do primeiro fragmento ele digeriu o plasmídeo com as enzimas de restrição XhoI e HindIII. Os mapas do plasmídeo pSilent1 e pREDI estão representados abaixo, assim como o gel de agarose da digestão do plasmídeo com as enzimas XhoI e HindIII, em comparação com o plasmídeo íntegro corrido no mesmo gel.

