

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:

```
ATGGTTTCTCCCTTCTCGCTCTCGGCGCCTTGGTCGCCTCCGCCGTTGCTGCTCCCTCGATGCCCTTGCCAACTGTACTTTACCGATGCGGCCTCGGCCA
TCAAGGGCAAGAATAGTTGCCAAACCATCGTCCTCAAGGACATTGCCGTGCCCGCGGTACCACTCTTGACATGACGGGCCTCAAGTCCGGCACCCACGT
GCGTCTAAGCTTTGAGCCTCGAGCCAATCAACCGGTCTATCGAGCAGCTCCGCTGACTGACACGCGAGTATAGGTTACTTTTCAAGGCAATACCACTTTG
GCTACACACTGTGGACGGGCCCCCTCATCTCTTCTCCGGCTCCAACATCATCATTGACGGCACCAGCGACCACGTCATCGACTGCCAGGGCCAGCGCTGG
TGGGACGGCAAGGGGGGCAACGGCGGCAAGGTCAAGCCCAAGTTCTTCTCGGCCAGAGCCTCAAGAACTCCATCATCAGGGGCATCAACGTCCTGAAC
ACCCCGTCCAGGCCTTCTCTATCAACAGCGTCACCAACCTCAGCGTCTACGACGTACCCCTCGACAACCTCCCTCGGCGACCCAGGGCGGCCACAACAC
CGACGCGTTCGACGTCGGCTCTCCAACGGCGTCTACATCTCCGGCGCCGTCGTCAGAACCAGGACGACTGCCTCGCCATCAACTCGGGCACCAACATC
ACCTTCACGGCGGCGACTGCTCCGGCGGCCACGGCTCTCCATCGGCTCCGTCGGCGGCCACAGCAGCAACGTCGTCGACACCGTCTCTCTCCAATC
CAGGATCTCCAACCTCGGCAACGGCGTCCGCTCAAGACGGTCTACCGCGCCACCGGCTCCGTCCTCAACGTCAGTACAAGGACATCGCCCTGTCCAACA
TCGCCAACTACGGCATCGTTGTCGAGCAGGACTACGAGAACGGCAAGCCAACCGGTACCCACCGACGGCGTCCCATCACCACCTCACCTCAGCAA
CGTCACCGGCACCGTCGCCTCTCCGCCATCGACGTCTACATCTCTCGGCCACCGGCGCTGACGCGACTGGACGTGGACCAACGTCAGCGTCACTGGC
GGCATAAGCTACCCCAACTGCACCGGCATTCCCGAGGGCAGCGGCGCTGCTTGTGA
```

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 *Xho*I e *Hind*III. Os mapas do plasmídeo pSilent1 e pREDI estão representados abaixo, assim como o gel de agarose da digestão do plasmídeo com as enzimas *Xho*I e *Hind*III, em comparação com o plasmídeo íntegro corrido no mesmo gel.

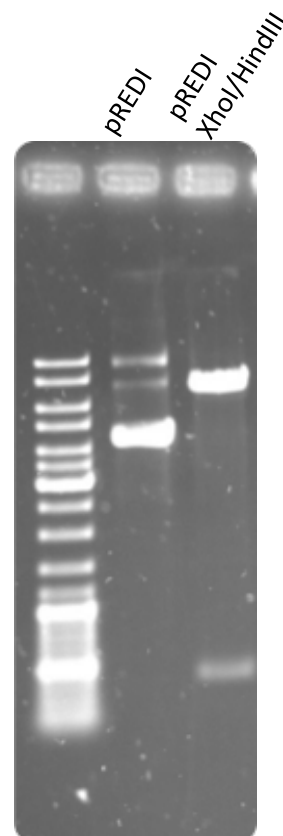
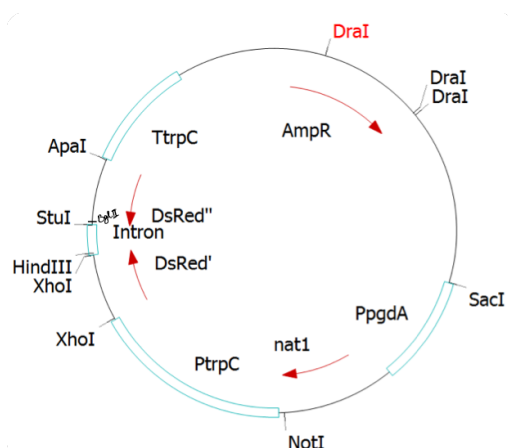
(TrpC Promoter)-----CAAGCATCGATACCGTCGACCTCGAGGTACGT
 ClaI SalI XbaI SnaBI

ACAAGCTTGCTCGAGGATACAGGTGAGC----- (Cutinase intron)---
HindIII*

---CACACAGCCAGGGAACGGCGAGATCTCGCATGCTAAGGCCGTGTGTACC
 BglII SpeI StuI KpnI

TGGGGCCCGGATCCAATT----- (TrpC Terminator)

 AatI* BamHI



- Por que nesse vetor os fragmentos de DNA idênticos devem ser ligados de forma invertida, e qual a finalidade do intron entre eles?
- Ao decidir “desmanchar” e remontar o plasmídeo pREDI com fragmentos de outro gene, quais os cuidados que devemos ter com relação às enzimas de restrição?
- O que são promotores fortes e por que devem ser utilizados?
- Considerando o vetor pSilent1, eu posso utilizá-lo para montar um cassete de RNAi para qualquer organismo, apenas ligando fragmentos invertidos do meu gene de interesse em sua região de ligação?
- No gel de agarose, o plasmídeo pREDI não digerido e o plasmídeo pREDI digerido com as enzimas *Xho*I e *Hind*III:
 - É possível neste gel atestar a qualidade do plasmídeo pREDI extraído? Justifique.
 - Por que o plasmídeo corrido em gel exibe 3 bandas mais visíveis? Qual delas representa o tamanho correto do plasmídeo?
 - Uma vez digerido o plasmídeo, pode-se purificar diretamente o produto da digestão e utilizar para a nova ligação? Explique.
 - Por que as enzimas *Hind*III e *Xho*I são perfeitamente compatíveis para uma digestão combinada em uma mesma reação?

3. Você está realizando um experimento, e uma das etapas consiste em clonar a região codificante do gene da resistência à Hygromicina (abaixo) em um vetor de clonagem. No teu laboratório existe o vetor de clonagem PUC19 e o gene de resistência com promotor está em outro vetor (pAN7.1). Como você precisa desse fragmento inteiro, você não pode retirar este fragmento do vetor pAN7.1 utilizando enzima de restrição e sim, precisa amplificar via PCR. Por outro lado, este fragmento precisa ser ligado no vetor PUC19 no sítio de múltipla clivagem (Polylinker). No teu laboratório existe a enzima de restrição *Xba*I. Portanto, você precisa desenhar primers com caudas (correspondentes ao sítio de clivagem da *Xba*I) para amplificar a região do gene da Hygromicina (seq abaixo) e então, ligar este fragmento no vetor PUC19.

- a) Desenhe tais primers e informe as sequencias aqui, destacando as bases que correspondem à cauda.
- b) Quais são as etapas que você precisa realizar após obtenção do fragmento via PCR para poder cloná-lo no vetor PUC19?

```

ATGAAAAAGCCTGAACTCACCGCGACGTCTGTGCGAGAAGTTTCTGATCGAAAAGTTCGACAGCGTCTCCG
ACCTGATGCAGCTCTCGGAGGGCGAAGAATCTCGTGCTTTTCAGCTTCGATGTAGGAGGGCGTGGATATGT
CCTGCGGGTAAATAGCTGCGCCGATGGTTTCTACAAAGATCGTTATGTTTATCGGCACTTTGCATCGGCC
GCGCTCCCGATTCCGGAAGTGCTTGACATTGGGGGAATTCAGCGAGAGCCTGACCTATTGCATCTCCCGCC
GTGCACAGGGTGTACGTTGCAAGACCTGCCTGAAACCGAACTGCCCGCTGTTCTGACAGCCGGTCGCGGA
GGCCATGGATGCGATCGCTGCGGCCGATCTTAGCCAGACGAGCGGGTTCGGCCCCATTTCGGACCGCAAGGA
ATCGGTCAATACACTACATGGCGTGATTTTCATATGCGCGATTGCTGATCCCCATGTGTATCACTGGCAAA
CTGTGATGGACGACACCGTCAGTGCGTCCGTCGCGCAGGCTCTCGATGAGCTGATGCTTTGGGCCGAGGA
CTGCCCCGAAGTCCGGCACCTCGTGCACGCGGATTTTCGGCTCCAACAATGTCCTGACGGACAATGGCCGC
ATAACAGCGGTCATTGACTGGAGCGAGGCGATGTTTCGGGGATTCCCAATACGAGGTCGCCAACATCTTCT
TCTGGAGGCCGTTGGTTGGCTTGTATGGAGCAGCAGACGCGCTACTTCGAGCGGAGGCATCCGGAGCTTGC
AGGATCGCCGCGGCTCCGGGCGTATATGCTCCGCATTGGTCTTGACCAACTCTATCAGAGCTTGGTTGAC
GGCAATTTTCGATGATGCAGCTTGGGCGCAGGGTCGATGCGACGCAATCGTCCGATCCGGAGCCGGGACTG
TCGGGCGTACACAAATCGCCCGCAGAAGCGCGGCCGTCTGGACCGATGGCTGTGTAGAAGTACTCGCCGA
TAGTGGAACCGACGCCCCAGCACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAG
  
```

