

Fundamentos de Biologia Molecular

1º Semestre, 2º Ano

Ano Letivo 2021/2022

Componente Teórico-Prática

Docente: Andreia Figueiredo (aafigueiredo@fc.ul.pt)

Aula TP 2 – PCR: Exercícios

Grupo 1.

1.1. Classifique como verdadeiras ou falsas as seguintes afirmações:

- a) Na técnica de PCR, a etapa de emparelhamento é essencialmente uma hibridação.
- b) Em geral, as experiências de PCR, requerem um único *primer*.
- c) A técnica de PCR é constituída por diversas etapas que se repetem por 3 ciclos.
- d) Na reação de PCR, durante o processo de polimerização, o DNA neo-sintetizado pode sofrer mutações.
- e) Existem diferentes tipos de DNAs polimerases termoestáveis, que podem ser utilizadas indiscriminadamente nas reações de PCR.

1.2. Escolha a(s) resposta(s) correta(s):

- a) Qual das seguintes alíneas é falsa relativamente aos requisitos da reação de PCR?
 - i. o PCR é uma reação de polimerização em cadeia;
 - ii. o PCR utiliza curtos *primers* sintéticos;
 - iii. o PCR usa uma DNA polimerase para sintetizar o DNA;
 - iv. o PCR pode ser utilizado para obter grandes quantidades de uma sequência particular de DNA;
 - v. o PCR não requer conhecimento das sequências de DNA nas regiões que ladeiam a sequência a ser amplificada.
- b) As DNAs polimerases utilizadas no PCR:
 - i. apresentam todas a mesma processividade;
 - ii. funcionam todas a temperaturas elevadas;
 - iii. todas apresentam revisão de provas;

- iv. têm todas atividade polimerásica 3'-5';
- v. só algumas são termoestáveis

c) Relativamente ao PCR:

- i. é composto unicamente pelas etapas de desnaturação e polimerização;
- ii. permite amplificar regiões do DNA, mas implica que se conheça a sequência de nucleótidos que será amplificada
- iii. apresenta 3 etapas principais que se repetem diversas vezes, uma dessas etapas denomina-se por transcrição reversa
- iv. permite amplificar regiões do DNA desde que se conheça minimamente a sequência de nucleótidos que ladeiam a referida sequência
- v. Requer a atividade de uma polimerase termoestável

1.3. Questões básicas (responda de forma objetiva e curta)

a) Pretende amplificar por PCR a região reguladora de um gene de *B. subtilis*, contida na sequência abaixo indicada:

5' ACTGATGCTAGTGACACCCAG ... (150 pb) ... ACTTACATTAGGAAATTCAAA 3'

Que *primers* permitem amplificar a referida região?

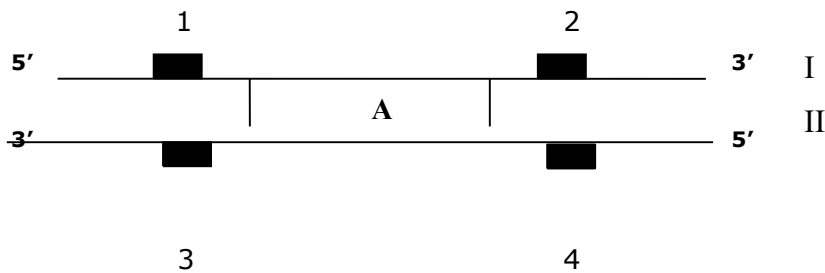
- i. 5' ACTGATGCTAGTGAC 3' e 5' ATTAGGAAATTCAAA 3'
- ii. 5' TGACTACGATCACTG 3' e 5' TAATCCTTTAAGTTT 3'
- iii. 5' ACTGATGCTAGTGAC 3' e 5' TTTGAATTCCTAAT 3'
- iv. 5' GTCACTAGCATCAGT 3' e 5' TAATCCTTTAAGTTT 3'
- v. 5' GTCACTAGCATCAGT 3' e 5' ATTAGGAAATTCAAA 3'

b) Que dimensão teria o produto de PCR?

- i. 150 pb;
- ii. 180 pb;
- iii. 192 pb;
- iv. 150 pb e 30 pb;
- v. 15 pb e 150 pb.

c) Descreva as etapas principais da amplificação génica por PCR. Em que medida é que as bactérias termófilas simplificaram a técnica de PCR?

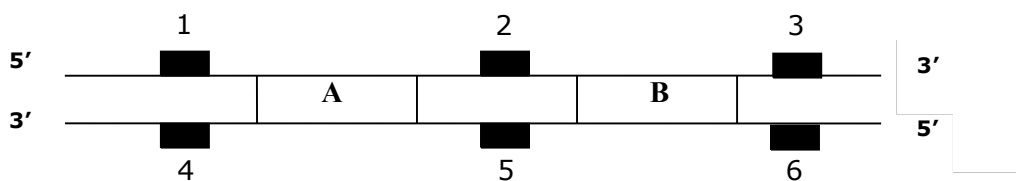
d) Considere a figura a seguir representada que contém a região A de DNA genómico:



Que *primers* (1, 2, 3, 4) utilizaria para amplificar a região A? Assuma que a sequência dos *primers* é **complementar da cadeia de DNA onde estão assentes**. Represente num esquema qual a cadeia (I, II) que seria complementar dos *primers* escolhidos e qual o sentido da extensão de cada um dos *primers*.

e) Nesta figura estão representados duas regiões A e B, de DNA genómico. Assuma que a sequência dos *primers* (1, 2, 3, 4, 5 e 6) é idêntica à da cadeia de DNA onde estão assentes. Se realizar uma reacção de PCR em que utiliza os *primers* 2 e 4, que região do DNA será amplificada?

E com os *primers* 2 e 6?



Represente num esquema qual a cadeia (I, II) que seria complementar dos *primers* utilizados nesta última situação e qual o sentido da extensão de cada um dos *primers*.



f) Considere que pretende amplificar por PCR um fragmento de DNA genómico humano de 2700 pb e que taxa de processamento da DNA polimerase é de 1000 nucleótidos por minuto. Estabeleça a ordem das diferentes etapas abaixo indicadas, referentes ao processo de PCR, e preencha os tempos em falta. Identifique as diferentes etapas e indique o número de ciclos de PCR.

94°C _____
4°C _____
65°C 2 minutos
94°C 5 – 10 minutos
72°C _____
72°C 7 – 10 minutos