

Fundamentos de Biologia Molecular

1º Semestre, 2º Ano

Ano Letivo 2021/2022

Componente Teórico-Prática

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

Aula TP 3 – Sequenciação Sanger: Exercícios

Grupo 1. Sequenciação

1.1. Classifique como verdadeira ou falsa a seguinte afirmação:

a) Os terminadores didesoxi são nucleótidos que não possuem o grupo 2'-OH da molécula de desoxirribose e, como tal, não podem formar ligações fosfodiéster com o grupo 5'-P do nucleótido a inserir na cadeia de DNA.

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

a) Se estivesse a analisar a sequência nucleotídica do genoma de uma bactéria recentemente isolada, faria a pesquisa, com a ajuda de *software* apropriado, de grelhas abertas de leitura. Isto significa que:

- i. analisaria apenas a sequência de uma das cadeias;
- ii. pesquisaria uma grelha de leitura em cada uma das cadeias;
- iii. procuraria sequências dos genes de rRNA;
- iv. procuraria potenciais regiões codificantes;
- v. analisaria a sequência, pesquisando todos os codões ATG

b) A leitura da sequência de nucleótidos obtida pela técnica dos terminadores de cadeia é feita:

- i. dos fragmentos de maiores dimensões para os de menores dimensões;
- ii. dos fragmentos de menores dimensões para os de maiores dimensões;
- iii. de baixo para cima, isto é, no sentido 5'→3',
- iv. de baixo para cima, isto é, no sentido 3'→5';
- v. de cima para baixo, isto é, no sentido 5'→3'.

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

I. Quais são as características das DNA polimerases, necessárias nas reações que envolvem terminadores de cadeia? Justifique a resposta.

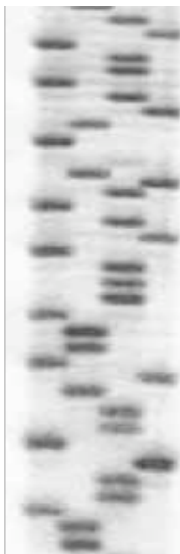
II. Que característica garante que a incorporação de um didesoxirribonucleótido termina o alongamento?

III. Enumere as principais etapas envolvidas na técnica dos terminadores de cadeia.

IV. Sequenciou ambas as cadeias de uma molécula de DNA. Para avaliar potenciais aminoácidos codificados por esta molécula de seguida transcreve conceptualmente o mRNA numa cadeia polipeptídica. Quantas grelhas de leitura terá de examinar e porquê?

V. Uma pequena molécula de DNA foi utilizada como *primer* no processo de sequenciação de uma molécula de DNA, com base na técnica dos terminadores de cadeia. Estão a seguir representados os resultados da autorradiografia. As letras indicam os didesoxirribonucleótidos presentes em cada reação de síntese.

A C G T



a) Escreva a sequência de DNA correspondente às bandas no gel, no sentido 5'→3'.

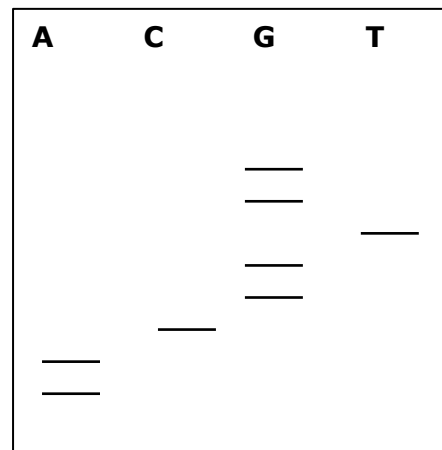
b) Será esta a sequência da molécula de DNA estendida ou a sequência da cadeia de DNA molde?

Grupo II

1. Esta auto-radiografia corresponde a um gel de sequenciação manual, cujas reações foram realizadas segundo o método de Sanger.

a) A sequência obtida corresponde a:

- i. 5' AACGGTGG 3'
- ii. 3' AACGGTGG 5'
- iii. 5' TTGCCACC 3'
- iv. 3' CCACCGTT 5'
- v. 5' GGTGGCAA 3'





b) A sequência da cadeia molde corresponde a:

- i. 5' AACGGTGG 3'
- ii. 3' AACGGTGG 5'
- iii. 5' TTGCCACC 3'
- iv. 5' CCACCGTT 3'
- v. 3' GGTGGCAA 5'