

UC: Fundamentos de Biologia
Componente Teórico-Prática

Aula TP 3 – 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. _____ F

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

R: iv

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

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

R: ii, iii

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

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

R. Elevada fidelidade e capacidade de incorporação dos didesoxirribonucleótidos.

- 2.** Que característica da replicação de DNA garante que a incorporação de um didesoxirribonucleótido termina o alongamento?

R. Os didesoxirribonucleótidos possuem um átomo de hidrogénio e não o grupo hidroxilo ligado ao carbono 3' da pentose (grupo 3'-OH), indispensável ao estabelecimento da ligação fosfodiéster que liga os diferentes nucleótidos durante a síntese das cadeias de DNA. Assim, a incorporação de um didesoxirribonucleótido conduz à terminação da reação de alongamento.

- 3.** Enumere as principais etapas envolvidas na técnica dos terminadores de cadeia.

R. 1- Hibridação do *primer* ao DNA molde (*annealing*);

2- Extensão do *primer* (polimerização e marcação);

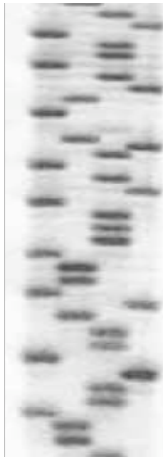
3- terminação da reacção (incorporação de ddNTPs).

4. 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?

R. Seis grelhas de leitura, pois cada cadeia da dupla hélice de DNA contém três possíveis grelhas de leitura.

5. 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 reacção de síntese.

A C G T



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

R. 5' CCAGGTAGGCTACCAGGGATGAGTC?ACTGAGGATG 3'

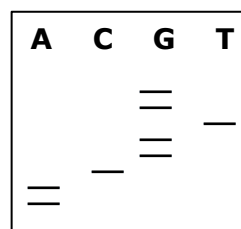
b) Será esta a sequência da molécula de DNA estendida ou a sequência da cadeia de DNA molde?

R. A sequência da cadeia de DNA estendida (e complementar ao molde)

c) A sequência correspondente às bandas observadas no gel, inclui a sequência do *primer*?

R. Não

7. Esta auto-radiografia corresponde a um gel de sequenciação manual, cujas reacções 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'

R. i

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'

R. iv

8. Considere que sequenciou pelo método de Sanger o seguinte fragmento de DNA de cadeia simples, utilizando o primer 5' CTAGG 3'. Represente o padrão de bandas que esperaria observar na autoradiografia do gel de sequenciação. Assuma que todos os dNTPs estavam marcados.
 5' CCGGATATGCATCTGAACCTAG 3'

8.

DNA molde: 5' CCGGATATGCATCTGAACCTAG 3'

Primer: 5' CTAGG 3'

5' CCGGATATGCATCTGAACCTAG 3'

← 3' GGATC 5'

3' GGCCTATACGTAGACTT 5'

a sequência seria:

5' TTCAGATGCATATCCGG 3'

A C G T

