

Problemas de Engenharia Genética

2. Técnicas de análise dos genes e dos seus produtos

2.1 Técnica de PCR

1. Considere que pretende amplificar por PCR o fragmento de DNA a seguir indicado, para o qual possui os *primers* A, B, C e D.

Primer A
5' ACTGATACGATA

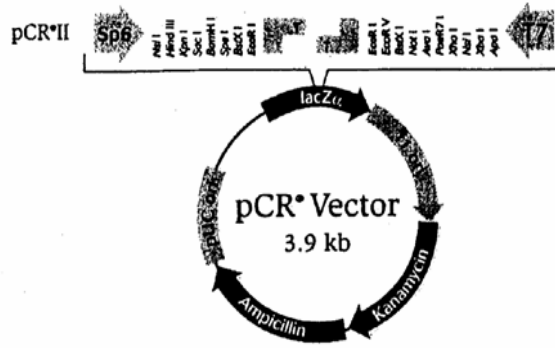
Primer C
CCGATCATGATG 3'

5' ACTGATACGATACGTCAGTACAGTACAGTCGATCAGATACCCAGTCCGATCATGATG 3'
3' TGA CTATGCTATGCAGTCATGTCATGTCAGCTAGTCTATGGGTCAGGCTAGTACTAC 5'

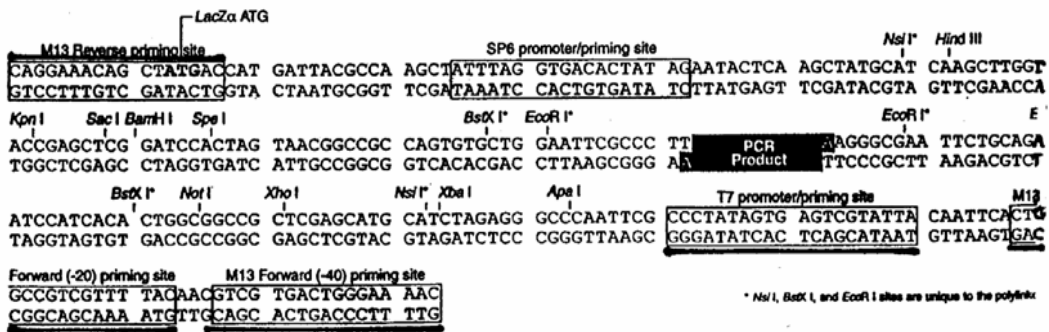
3' TGA CTATGCTAT
Primer B

GGCTAGTACTAC 5'
Primer D

- Que *primers* utilizaria para amplificar o referido fragmento de DNA? Justifique a resposta.
- O fragmento foi posteriormente clonado no *pCR Vector* (Figura 4). Se tivesse preparado DNA recombinante em cadeia simples, qual dos *primers* assinalados no *polylinker* do vector utilizaria para determinar o sentido da inserção do fragmento no vector? Justifique a resposta.
- Em função do *primer* que escolheu, escreva a ordem das bases (indique apenas 10 bases) que obteria em gel de sequenciação, a partir da incorporação do primeiro nucleótido marcado, ³⁵S-dATP.
- Refira-se à função de cada uma das marcas genéticas representadas no vector pCRII.



pCR*II/TOPO*



* Nsi I, BstX I, and EcoR I sites are unique to the polylinker.

R: a) Os *primers* A e D, porque é necessário utilizar *primers* com orientações opostas, complementares de ambas as cadeias que irão servir de molde à polimerização, que se inicia em cada um dos *primers* a partir das extremidades 3'.

b) Teria de ser o *primer* M13-20 ou M13-40 para que houvesse emparelhamento com a cadeia simples de DNA obtida (cadeia de cima). O *primer* M13 reverso não seria utilizado porque tem a mesma sequência dessa cadeia.

c) 5'AATTGTAATA3' (*primer* M13-20) ou 5'AAAACGACGG3' (*primer* M13-40) ou 5'AATTGGGCCC (*primer* T7)

d) Marcas genéticas	Funções
<i>lacZα</i>	Seleção de recombinantes por α-complementação
<i>f1 ori</i>	Origem de replicação do fago f1, para replicação em <i>E. coli</i> , que permite a síntese de DNA em cadeia simples quando se infecta a célula hospedeira contendo o vector recombinante, com o fago auxiliar
Kan	Gene que confere resistência à canamicina, para selecção de clones transformantes
Amp	Gene que confere resistência à ampicilina, para selecção de clones transformantes
pUC <i>ori</i>	Origem de replicação plasmídica para replicação em <i>E. coli</i>
SP6 e T7	Promotores reconhecidos pelas polimerases de RNA do fago SP6 e T7, respectivamente, para super-expressão induzida do fragmento clonado
<i>Polylinker</i>	Local múltiplo de clonagem com locais de restrição para clonagem, e para sub-clonar os produtos de PCR noutros vectores

T

Timinas desemparelhadas para ligação do produto de PCR com adeninas desemparelhadas

2. Qual a técnica mais sensível para detectar a produção de um determinado mRNA?

- i) Técnica da nuclease S1
- ii) RT-PCR
- iii) Técnica de *Northern blot*
- iv) Técnica de extensão do *primer*
- v) Determinação da semi-vida do mRNA

R: ii) RT-PCR

2.2 Técnicas de análise de DNA

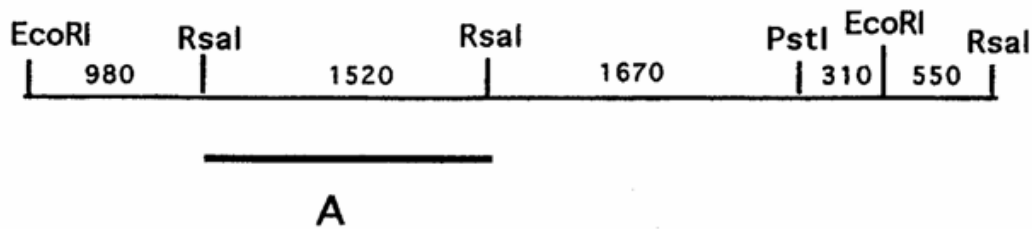
1. Considere que o gene que codifica a principal proteína dos flagelos de uma nova estirpe bacteriana já foi clonado. Nesta estirpe, a triagem de bactérias mutantes defectivas na proteína flagelar revelou uma frequência excepcionalmente elevada de mutantes (1 em 10^3 células bacterianas).

- a) Como se poderia determinar que os mutantes resultaram da inserção de um transposão no gene?
- b) Apresente uma estratégia geral de isolamento de promotores com uma função específica, nesta estirpe.

R: a) A determinação da presença do transposão nos mutantes seria feita por hibridação *Southern blot*. O gene clonado seria utilizado como sonda para hibridar com DNA da estirpe selvagem e das células mutantes. Se os mutantes resultaram da inserção de um transposão, a dimensão do fragmento que contém o gene interrompido será diferente da dos fragmentos com o gene normal.

b) A estratégia geral de isolamento de promotores com uma função específica consiste na preparação de uma biblioteca de fragmentos de DNA aleatórios, num vector *promoter-probe* (possui um gene repórter sem promotor), e na selecção dos clones que expressam o gene repórter nas condições escolhidas.

2. Considere a região de DNA, a seguir representada, em que os números indicam as distâncias relativas, em pares de bases (pb), entre os locais de restrição.



- a) A preparação do gel de agarose para a transferência de DNA pela técnica de *Southern blot*, requer geralmente um passo de despurinação (fragmentação), seguido de desnaturação. Qual a função de cada um dos tratamentos? Poderia suprimir o passo da despurinação? Justifique a resposta.
- b) Represente num diagrama o perfil de hibridação que observaria num filme de autoradiografia, entre os produtos de digestões duplas *EcoRI/PstI*, *EcoRI/RsaI* e *PstI/RsaI* e a sonda A (fragmento *RsaI/RsaI* de 1520 pb).
- c) Como é que prova que uma região de DNA procariótico, em estudo, corresponde a DNA codificante?

R: a) A despurinação consiste na introdução de quebras nas moléculas de DNA, por tratamento com ácido fraco ou com radiação ultravioleta, de forma a gerar fragmentos mais pequenos, facilmente transferíveis do gel para a membrana de nitrocelulose ou nylon; a desnaturação permite obter DNA de cadeia simples. Pode-se suprimir o passo da despurinação, quando os fragmentos a transferir são de pequenas dimensões. Não se pode suprimir a desnaturação porque impediria a hibridação do DNA com a sonda. b) Nos perfis de hibridação *EcoRI/PstI*, *EcoRI/RsaI* e *PstI/RsaI* e a sonda A, observaria uma banda em cada um dos casos, de 4170, 1520 e 1520 pb, respectivamente. c) A prova baseia-se na existência de uma grelha de leitura aberta na sequência de nucleótidos da região de DNA em estudo; na identificação de sequências correspondentes aos sinais de transcrição e de tradução na extremidade 5' da ORF (se o DNA pertencer a um operão, poderão ser detectadas apenas sequências responsáveis pelo início da tradução); e na avaliação da frequência de utilização de codões relativamente ao organismo donde provém o DNA.

3. Durante o seu trabalho de estágio pretende verificar se um gene já isolado e sequenciado, contém uma região reguladora relevante, porque suspeita da necessidade de uma proteína de ligação ao DNA para que se inicie a transcrição. Que processo(s) lhe permitiria(m) confirmar esta hipótese, e posteriormente identificar de forma mais precisa a sequência reguladora?

R: A técnica de retardação em gel ou a técnica de *footprinting* de DNA, identificando por mutagénesse *in vitro* sítio-específica a região envolvida na interação com a proteína de ligação ao DNA.

2.3 Técnicas de análise de RNA

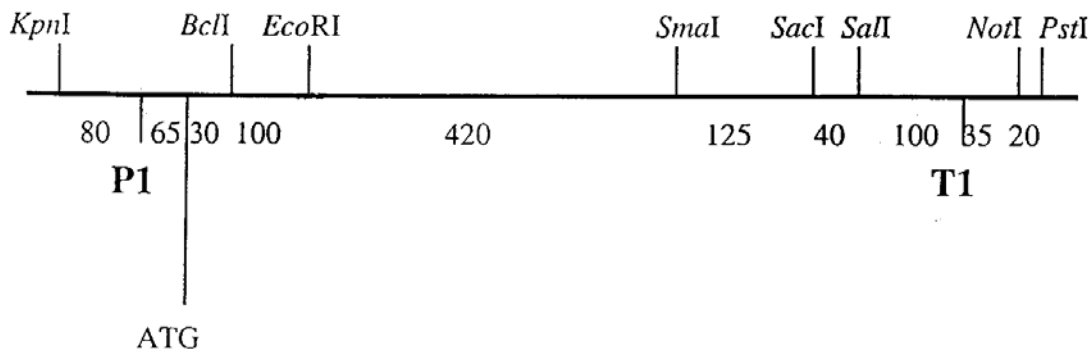
1. A expressão de três genes adjacentes *Gal1*, *Gal7* e *Gal10* é regulada por um único estimulador, mas os genes não são co-transcritos. Como se pode demonstrar experimentalmente que cada gene é transcrito de modo independente?

R: A demonstração experimental de que cada gene é transcrito de modo independente é feita por hibridação *Northern blot*. Utilizando sondas de cada um dos três genes, separadamente, seriam observadas diferentes bandas correspondentes a transcritos diferentes.

2. Descreva uma experiência hipotética que permita avaliar a transcrição de genes virais em dois estádios diferentes de infecção das células hospedeiras pelo vírus.

R: A experiência envolve primeiramente extração de RNA das células de cada um dos estádios de infecção viral e isolamento do mRNA poliadenilado por cromatografia de afinidade em coluna de celulose-oligo dT. O mRNA é depois convertido em cDNA marcado com fluorocromos diferentes em cada um dos casos. Paralelamente, é preparado um *chip* de fragmentos de DNA genómico, produtos de PCR ou oligonucleótidos sintéticos do DNA viral. Os cDNAs são hibridados com o *chip* e os resultados analisados. Sinais de fluorescência mais intensos significam genes mais activos, e menos intensos, genes menos activos. Os genes activos num dos estádios e não no outro têm a fluorescência aumentada, enquanto que os genes activos em ambos os estádios têm uma fluorescência híbrida.

3. Considere a seguinte região do DNA de *E. coli*, da qual se conhece apenas a sequência nucleotídica.



- Como procederia para mapear o terminador putativo indicado na Figura? Descreva as etapas necessárias, referindo o processo que utilizaria na construção da sonda.
- Com base na sonda seleccionada, indique o resultado que iria obter na auto-radiografia, após electroforese em gel de poliacrilamida. Como poderia avaliar com mais precisão esse resultado?

R: a) Utilizaria como sonda o fragmento de restrição *SalI/PstI*, porque permite uma marcação diferencial das extremidades. Assim, é possível marcar apenas a extremidade 3' recuada *SalI*, da cadeia de DNA complementar do mRNA. Para marcar radioactivamente a extremidade 3' utiliza-se a polimerase Klenow e dNTPs complementares da cadeia de DNA molde, o primeiro dos quais marcado, $\alpha^{32}\text{P}$ -dTTP. A sonda é depois desnaturada e hibridada com o mRNA de *E. coli*. As moléculas híbridas são tratadas com nuclease S1 e analisadas em gel de poliacrilamida desnaturante. A dimensão do fragmento híbrido resistente à degradação pela nuclease S1 indica a localização do terminador. b) Iria obter uma banda de 100 nucleótidos. Nesta análise também se utiliza DNA correspondente à sonda e, por isso, também se observaria uma banda de 155 nucleótidos. Para efectuar uma avaliação mais precisa do resultado deveria incluir no gel de poliacrilamida as quatro reacções de sequenciação pelo método de Sanger do fragmento utilizado como sonda.

4. Considere que clonou um gene de petúnia e pretende saber qual é o tecido (folhas, caule, raízes, flores ou sementes) que transcreve o gene em maior extensão. Indique por ordem quais dos seguintes processos utilizaria nesta análise. (**Atenção:** Nem todos os processos são aplicáveis e eventualmente pode não estar indicado algum processo relacionado com as técnicas a realizar nesta análise.)

- a) Electroforese em gel de agarose
- b) Transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose
- c) Hibridação com uma sonda heteróloga de uma espécie próxima da petúnia
- d) Extracção do mRNA total de cada um dos tecidos
- e) Isolamento de DNA cromossómico de cada um dos tecidos
- f) Construção de uma sonda homóloga
- g) Auto-radiografia
- h) Determinação da sequência N-terminal

R: d, a, transferência dos mRNAs para uma membrana de nitrocelulose ou nylon, f, reacção de hibridação, g

5. Escolha a(s) afirmação(ões) correcta(s):

DNA de cadeia simples sintetizado quimicamente pode ser utilizado:

- i. Como *primer* para a técnica de PCR
- ii. Para a determinação do local de início da transcrição
- iii. Como sonda para a técnica de *Southern blot*
- iv. Para produzir DNA de cadeia dupla com sequências específicas para clonagem
- v. Como sonda na triagem de uma biblioteca genómica.

R: i., ii., iii., iv., v.

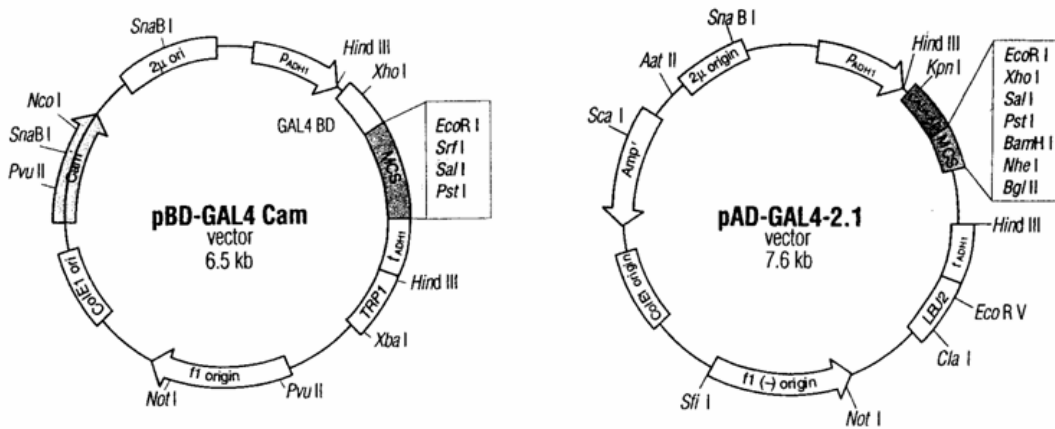
2.4 Técnicas de análise de proteínas

1. Compare e estabeleça as diferenças entre SDS-PAGE e electroforese bidimensional (2-DE) de proteínas. Indique qual das técnicas se utiliza no estudo do proteoma, justificando a resposta.

R: A técnica de SDS-PAGE consiste na separação unidimensional das proteínas com base na massa molecular. Na técnica de electroforese bidimensional, as proteínas são separadas numa primeira dimensão por isoelectrofocagem com base na carga eléctrica, ou seja, de acordo com o ponto isoeléctrico das proteínas (valor de pH, em que as proteínas não têm carga positiva ou negativa). A separação numa segunda dimensão por SDS-PAGE é baseada nas diferenças de massa molecular das proteínas.

No estudo do proteoma é utilizada a electroforese bidimensional porque permite analisar maior número de proteínas, uma vez que a resolução é maior.

2. A **Figura 2** representa dois vectores de clonagem.



- Caracterize estes vectores.
- Refira a função e importância e/ou finalidade de cada uma das marcas genéticas/características assinaladas.
- Como explica a presença nestes vectores de marcas genéticas diferentes, LEU2 e TRP1?
- Explique o fundamento genético do sistema de expressão baseado nestes vectores.
- Refira algumas das aplicações deste sistema.

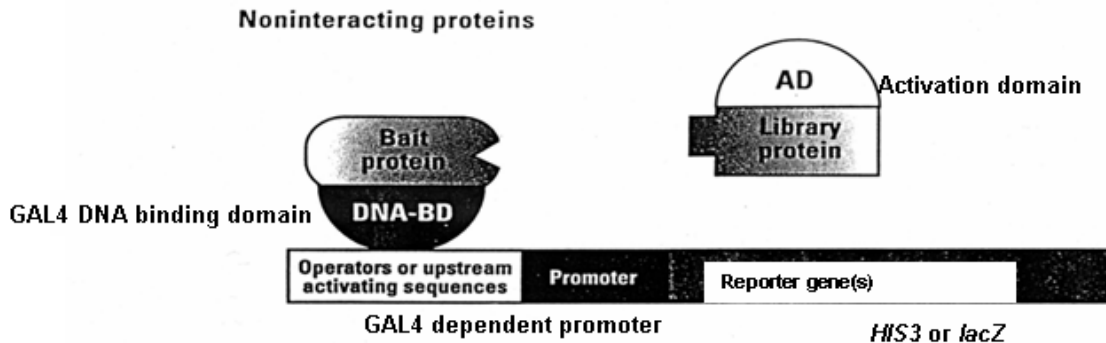
R: a) São vectores do sistema de dois híbridos em levedura para fusão traducional. Também são vectores *shuttle* e fagemídios.

b) As marcas genéticas/características dos vectores e respectivas funções são as seguintes:

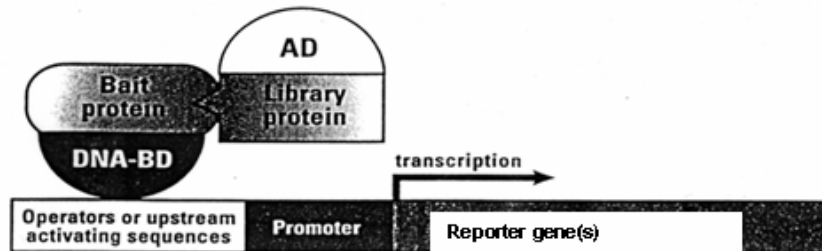
Marcas genéticas/ Características	Funções
Cam	Gene de resistência ao cloranfenicol; marca genética de selecção procariótica
2 μ ori	Origem de replicação em levedura
P _{ADH1}	Promotor eucariótico de expressão em levedura
GAL4 BD	Domínio de ligação ao DNA do activador de transcrição GAL4
MCS	Local múltiplo de clonagem
t _{ADH1}	Terminador da transcrição
TRP1	Gene que codifica uma enzima envolvida na síntese de triptofano; marca genética de selecção em levedura
Origem f1	Origem de replicação do fago filamentoso f1 para replicação em <i>E. coli</i> F', que permite obter partículas fágicas com a cadeia codificante do gene clonado, após infecção das células transformadas com o fago auxiliar
Origem ColE1	Origem de replicação procariótica para replicação em <i>E. coli</i>
Amp ^r	Gene de resistência à ampicilina; marca genética de selecção procariótica
GAL4 AD	Domínio de activação da transcrição do activador de transcrição GAL4
LEU2	Gene que codifica uma enzima envolvida na síntese de leucina; marca genética de selecção em levedura
Origem f1 (-)	Origem de replicação do fago filamentoso f1 para replicação em <i>E. coli</i> F', que permite obter partículas fágicas com a cadeia não codificante do gene clonado, após infecção das células transformadas com o fago auxiliar

c) As duas marcas genéticas, LEU2 e TRP1, permitem a selecção de leveduras transfectadas com os dois tipos de vectores.

d) O sistema é baseado na restauração funcional do activador transcricional de levedura, GAL4.



Interacting proteins activate transcription of reporter



O gene conhecido (gene X) é clonado em fusão com o domínio de ligação ao DNA do factor de activação da transcrição GAL4. O gene em estudo (gene Y) é clonado em fusão com o domínio de activação do factor de activação da transcrição GAL4. Os plasmídios recombinantes são cotransfectados em leveduras com os genes repórter HIS 3 ou *lacZ* sob o controlo de uma sequência promotora específica. Se as proteínas codificadas pelos genes X e Y apresentarem interacção haverá expressão do gene repórter. A selecção das colónias positivas é feita em meio de cultura sem histidina ou com X-Gal, respectivamente.

e) Este sistema permite: detectar interacções proteína-proteína *in vivo*; identificar novas proteínas e isolar genes que codificam proteínas envolvidas nas interacções; e identificar aminoácidos ou domínios proteicos envolvidos nas interacções proteína-proteína (mutagénese *in vitro* e avaliação do efeito das mutações na interacção proteica).

3. Que técnica utilizaria para saber se uma proteína é sintetizada num estágio particular de desenvolvimento?

R: A técnica de *Western blot*.

4. Indique quais dos seguintes procedimentos permitem identificar e isolar uma proteína a partir de um complexo proteico:

Imunoprecipitação
DNA footprinting
Purificação do fragmento de DNA a utilizar como sonda
Produção do anticorpo específico
Sistema de dois híbridos em levedura
Purificação da proteína
Técnica de *phage display*

R: Os procedimentos são os seguintes: imunoprecipitação, produção do anticorpo específico, sistema de dois híbridos em levedura, purificação da proteína e técnica de *phage-display*.

5. Indique pela ordem correcta as etapas que realizaria para identificar os genes de *E. coli* que codificam proteínas que se ligam directamente à proteína A.

- a) Aplicar o extracto de células numa coluna de cromatografia de afinidade
- b) Digerir com uma protease específica
- c) Fazer uma fusão entre a região codificante da proteína A e um *tag* adequado
- d) Comparar o perfil de massas moleculares com a massa molecular prevista pelos dados do genoma
- e) Hibridar as sondas de DNA com uma biblioteca genómica
- f) Utilizar espectrometria de massa para obter as massas moleculares
- g) Realizar SDS-PAGE ou electroforese bidimensional
- h) Construir sondas de DNA
- i) Sequenciar os clones positivos
- j) Expressar as proteínas que interagem com a proteína A

R: c, a, g, b, f, d, h, e, i, j