

Questão 01

O potencial de repouso da membrana plasmática é estabelecido pela distribuição desigual de cargas elétricas através da membrana. Isto se dá por meio da presença de diferentes concentrações de íons Na^+ , K^+ e Cl^- dentro e fora da célula no estado de equilíbrio eletroquímico entre o meio intracelular e extracelular.

Fatores que o determina: (1) ATPase Na^+/K^+ (ou Bomba de Na^+/K^+); (2) Presença de canais iônicos seletivos para os íons Na^+ , K^+ e Cl^- com diferentes permeabilidades para cada um dos três íons; (3) Diferentes concentrações de Na^+ , K^+ e Cl^- no meio intra e extracelular.

Questão 02

1. Etapa de Desnaturação: é a etapa onde ocorre a desnaturação do DNA, (isto é, a abertura da fita dupla do DNA) por efeito do aumento de temperatura em torno de 95°C . Sua duração é de 20 a 30 segundos.
 2. Etapa de Anelamento: é a etapa onde ocorre a hibridação dos primers diretos e reversos presentes na reação, com as sequências complementares da extremidade da região do DNA a ser amplificada. Isto se dá por uma redução da temperatura da reação até 50°C a 65°C por 20 a 40 segundos.
 3. Etapa de Extensão: é a etapa onde ocorre a síntese de cada uma das fitas complementares do DNA a partir dos primers presentes na reação, da enzima Taq polimerase, de íons Mg^{2+} e dos desoxi-nucleotídeos trifosfato (ATP, CTP, GTP e TTP). Esta etapa ocorre a uma temperatura em torno de 72°C durante aproximadamente 60 segundos.
-

Questão 03

(quaisquer **cinco** das respostas listadas abaixo)

1. Bloqueio da atividade de peroxidase ou fosfatase endógena com o uso de peróxido de hidrogênio ou levamisol. Esta etapa tem como objetivo reduzir coloração inespecífica devido à atividade das enzimas peroxidase ou fosfatase alcalina endógenas presentes no tecido.
 2. Bloqueio antigênico: uso de leite desnatado ou albumina para bloquear sítios antigênicos presentes no tecido. Esta etapa tem como objetivo reduzir a marcação inespecífica do anticorpo primário no tecido.
 3. Recuperação antigênica: Tratamento do tecido com enzimas proteolíticas ou aquecimento do tecido em solução tamponada com o objetivo expor os sítios antigênicos de interesse inacessíveis ao anticorpo primário.
 4. Incubação com anticorpo primário: ligação do anticorpo primário nos locais do tecido onde o antígeno de interesse se encontra.
 5. Incubação com anticorpo secundário: ligação do anticorpo secundário biotinilado ou do anticorpo secundário conjugado a enzimas (peroxidase ou fosfatase) ao anticorpo primário utilizado na etapa anterior.
 6. Incubação com o Complexo Avidina-Biotina: ligação da proteína avidina com a biotina presente no anticorpo secundário e com a enzima a ser utilizada na etapa de revelação.
 7. Revelação: detecção da localização indireta do antígeno através da atividade enzimática (peroxidase ou fosfatase) catalisada na reação com um cromógeno (p.ex. DAB).
-

Questão 04

(quaisquer **duas** das respostas listadas abaixo)

1. Isolamento do gene de interesse (insulina): obtenção do fragmento de DNA correspondente ao gene que se pretende clonar. Pode ser feito através de diferentes procedimentos como por exemplo: PCR ou biblioteca de cDNA.
2. Clonagem do gene em sítio de restrição: digestão do plasmídio e do fragmento de DNA a ser clonado com a mesma enzima de restrição; incubação do plasmídio linearizado com o fragmento contendo as extremidades digeridas; reação com a enzima DNA ligase para ligação das extremidades.
3. Transformação bacteriana: Introdução do plasmídio contendo o gene de interesse dentro da bactéria para a sua replicação. Incubação deste plasmídio com bactérias previamente tornadas competentes. Incubação com CaCl_2 ; choque térmico ou eletroporação; plaqueamento das bactérias em meio sólido para verificação da transformação.
4. Ligação do fragmento clonado: Incubação do plasmídio digerido por enzima de restrição (plasmídio linearizado) com o fragmento do gene de interesse, seguido da reação com a enzima DNA ligase para ligação das extremidades das fitas de DNA.
5. Crescimento bacteriano: Procedimento de multiplicação das bactérias em meio líquido a 37°C por 12h para a expressão da proteína de interesse ou replicação dos plasmídios.