

TP 1 - Resolução de Problemas sobre a Manipulação de Ácidos Nucleicos e início dos Problemas de Clonagem

Semana 22-26 Fevereiro 2021

Problemas (PPoint tema 2 - Manipulação dos ácidos nucleicos)

1. Sequências palindrômicas são segmentos da molécula de DNA de cadeia dupla que:

- a) têm a mesma sequência na direcção 5'→3' e na direcção 3'→5' da mesma cadeia;
- b) têm a mesma sequência na direcção 5'→3' ou na direcção 3'→5' em cadeias complementares;
- c) apresentam frequentemente um eixo de simetria bilateral;
- d) são frequentemente locais de reconhecimento das endonucleases de restrição de tipo II;
- e) são alvos preferenciais de enzimas de tipo I e III.

2. Isoesquizómeros são enzimas de restrição que:

- a) clivam o DNA na mesma sequência de reconhecimento;
- b) produzem, em geral, o mesmo padrão de restrição;
- c) actuam como exonucleases de restrição;
- d) apresentam sempre diferente sensibilidade à metilação;
- e) podem clivar o DNA, diferentemente, na sequência de reconhecimento.

3. Porque é que um ácido nucleico com a seguinte percentagem de bases azotadas, A- 28%, C- 15%, G- 35% e T- 22%, não é clivado por endonucleases de restrição de tipo II?

4. As sequências 5'-GGCC-3' e 3'-GGCC-5', na molécula de DNA de cadeia dupla, podem ser clivadas pela mesma enzima de restrição?

5. As alíneas, a-e, indicam a 1ª metade das sequências palindrômicas e não-palindrômicas, reconhecidas por enzimas de restrição. Qual é a sequência completa, em cada caso?

- a. 5' AA-- 3' TT
- b. 5' ATG--- 3' CAT
- c. 5' GGN--- 3' NCC
- d. 5' GGN-- 3 CC
- e. 5' ATNN-- 3' AT

Nota: N, significa qualquer nucleótido.

6. Que diferenças apresentam as extremidades dos fragmentos de DNA produzidos pelas seguintes enzimas de restrição?

HaeIII (5'-GG/CC-3') Cegas/blunt

MaeI (5'-C/TAG-3')

CfoI (5'-GCG/C-3')



Nota: A barra indica o local de corte na sequência de reconhecimento.

7. A metilase Dam de *E. coli* metila os resíduos de adenina na sequência GATC impedindo a enzima *MboI* de clivar neste local. No entanto, dependendo da origem do DNA em estudo, esta enzima pode digerir o DNA. Indique em que condição a enzima *MboI* tem capacidade de restrição.

a) Quando os plasmídios são propagados em estirpes *dam*⁻ de *E. coli*.

b) No DNA genómico humano.

c) No DNA amplificado por PCR.

d) No DNA genómico de *Drosophila*.

e) Em todas as hipóteses acima mencionadas.

Extraíu-se DNA plasmídico de duas amostras de culturas bacterianas. Ressuspendeu-se em 30 μl de água. Procedeu-se ao doseamento por espectrofotometria a DO_{260} , e os dados que se obtiveram foram:

Amostra 1 = 0,42; Amostra 2 = 0,05

Qual a concentração de DNA em cada amostra?

$$\begin{array}{l} 1 - 50 \text{ mg/ml} \\ 0,42 - \text{e} \end{array} \quad \begin{array}{l} 1 - 21 \text{ mg/ml} \Rightarrow 21 \text{ mg/ml} \\ 2 - \end{array}$$

E qual a quantidade de DNA total na amostra A e na amostra B?

$$1 - [21 \text{ mg/ml}] \times 30 \text{ ml} = 630 \text{ mg}$$

2

Se se tratasse de RNA, qual a concentração em cada uma das amostras?

$$\begin{array}{l} 1 - 40 \text{ \mu g/ml} \\ 0,42 - \text{e} \end{array}$$

1. A escolha da percentagem do gel de agarose depende:

- a) do grau de digestão das moléculas de DNA;
- b) do tempo de migração do DNA;
- c) da concentração do DNA que se pretende visualizar;
- d) da dimensão dos fragmentos de DNA;
- e) do tampão de electroforese.

2. A maior ou menor resolução na separação das moléculas de DNA quando analisadas em electroforese em gel de agarose depende essencialmente:

- a) da carga eléctrica da molécula de DNA;
- b) da carga eléctrica e massa molecular da molécula de DNA;
- c) da massa molecular da molécula de DNA;
- d) do tipo de DNA (cromossómico ou plasmídico);
- e) da densidade da molécula de DNA.

3. Durante a migração em gel de agarose, o DNA pode ser visualizado devido ao:

- a) azul de bromofenol;
- b) brometo de etídio;
- c) tampão de electroforese;
- d) azul de cianol;
- e) nenhuma das alíneas anteriores.

Resolução de Problemas de Clonagem

Realizou uma clonagem molecular na qual o vetor plasmídico foi digerido com uma só enzima – XbaI, e o inserto com duas enzimas diferentes, XbaI e SpeI. É possível esta clonagem? Justifique. Represente a construção final.

XbaI – T/CTAGA

SpeI – A/CTAGT





Home > Tools & Resources > Selection Charts > Compatible Cohesive Ends and Generation of New Restriction Sites

Compatible Cohesive Ends and Generation of New Restriction Sites

New restriction sites can be generated by ligation of DNA fragments with compatible cohesive or blunt ends. These new restriction sites may be generated by:

1. Cleavage followed by fill-in of 5' overhangs to generate blunt ends.
2. Cleavage with two restriction endonucleases that produce blunt ends.
3. Cleavage with two restriction endonucleases that produce compatible overhangs.

Restriction endonucleases that produce compatible cohesive ends often produce recleavable ligation products. The combinations listed were identified by computer analysis, and although we have tried to ensure their accuracy, they have not necessarily been confirmed by experimentation.

Where isoschizomers exist, only one member of each set is listed. Only enzymes available from New England Biolabs have been listed.

Enzymes that have degenerate recognition sequences (i.e. recognize more than one sequence) are followed by a specific sequence in parentheses and are only listed if a non-degenerate equivalent does not exist. Be aware that these degenerate enzymes will cleave sequences in addition to the one listed.

A "--" denotes a ligation product that cannot be recleaved.

[A](#) | [B](#) | [C](#) | [D](#) | [E](#) | [H](#) | [K](#) | [M](#) | [N](#) | [P](#) | [R](#) | [S](#) | [T](#) | [X](#) | [single letter code](#)

Enzyme	Ligated To	Recleaved By
Acc65I (G/GTACC)	BanI (G/GTACC)	Acc65I, BanI, KpnI, NlaIV, RsaI
	BsiWI, BsrGI	RsaI
AccI (GT/CGAC)	AcII, AclI, BsaHI (GR/CGYC), HinP1I, HpaII, NarI	--
(GT/CGAC)	ClaI, BstBI, TaqI-v2	TaqI-v2

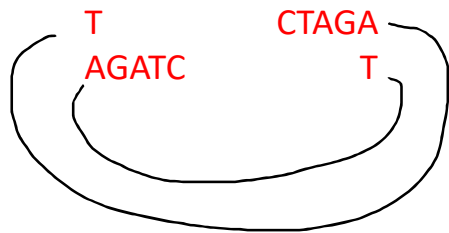
Enzyme	Ligated to	Recleaved by
SbfI * (CCTGCA/GG)	BsiHKAI, Bsp1286I (GTGCA/C)	BsgI
	NsiI	--
	PstI	PstI
Sfci (C/TGCAG)	ApaLI	BsgI
SgrAI (CR/CCGGYG)	See BsrFI	
SpeI * (A/CTAGT)	AvrII, NheI, StyI (C/CTAGG), XbaI	Bfal
SphI * (GCATG/C)	NlaIII, NspI	NlaIII, NspI

XbaI (T/CTAGA)	AvrII, NheI, SpeI, StyI (C/CTAGG)	Bfal
XbaI	BsrFI	XbaI, TthI

Realizou uma clonagem molecular na qual o vetor plasmídico foi digerido com uma só enzima – XbaI, e o inserto com duas enzimas diferentes, XbaI e SpeI. É possível esta clonagem? Justifique. Represente a construção final.

XbaI – T/CTAGA

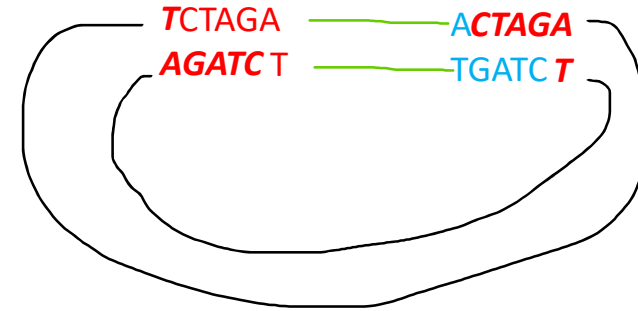
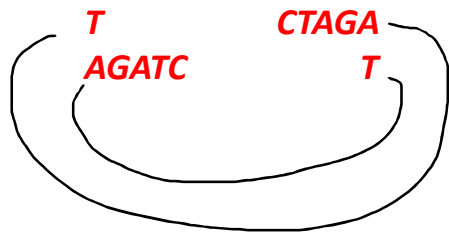
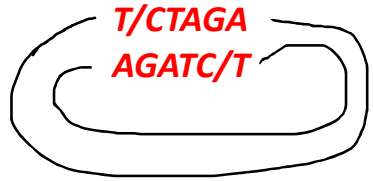
SpeI – A/CTAGT



Realizou uma clonagem molecular na qual o vetor plasmídico foi digerido com uma só enzima – XbaI, e o inserto com duas enzimas diferentes, XbaI e SpeI. É possível esta clonagem? Justifique. Represente a construção final.

XbaI – T/CTAGA

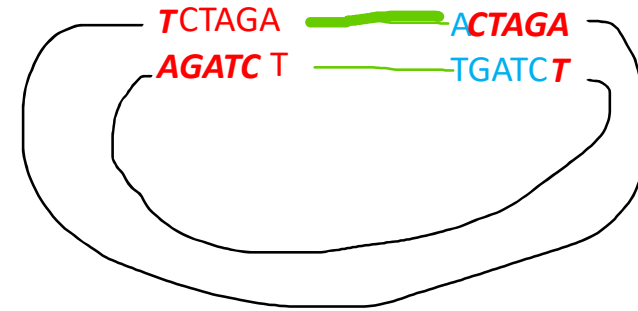
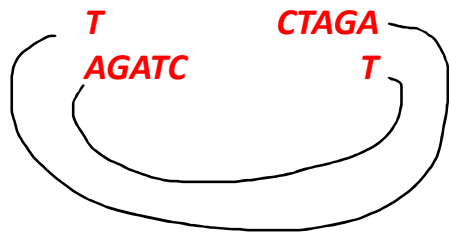
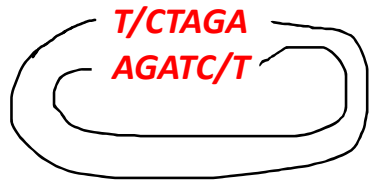
SpeI – A/CTAGT



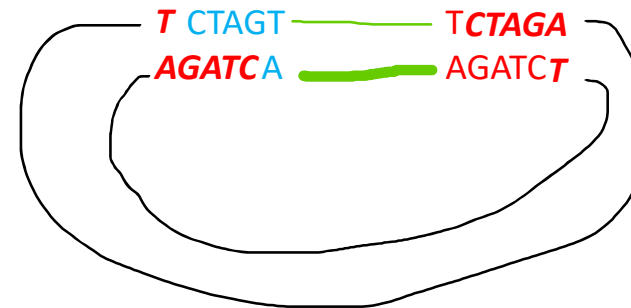
Realizou uma clonagem molecular na qual o vetor plasmídico foi digerido com uma só enzima – XbaI, e o inserto com duas enzimas diferentes, XbaI e SpeI. É possível esta clonagem? Justifique. Represente a construção final.

XbaI – T/CTAGA

SpeI – A/CTAGT



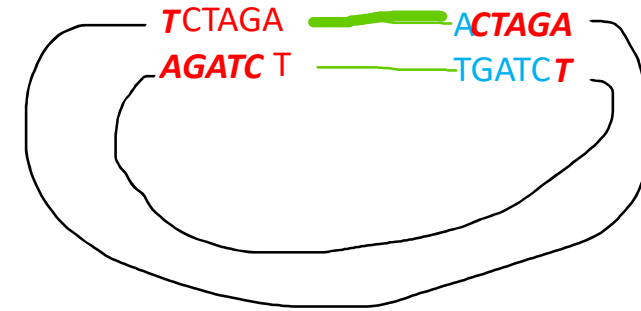
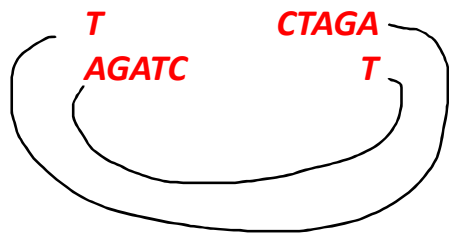
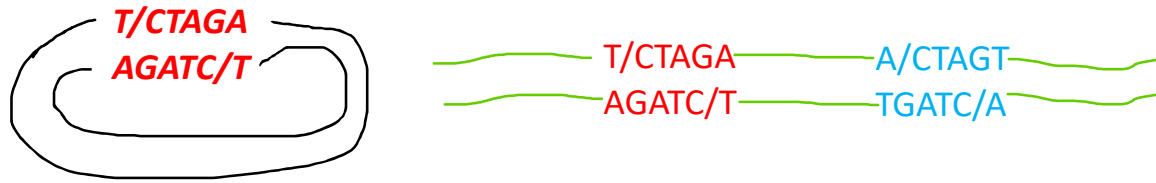
Fez uma clonagem dirigida ou não-dirigida?



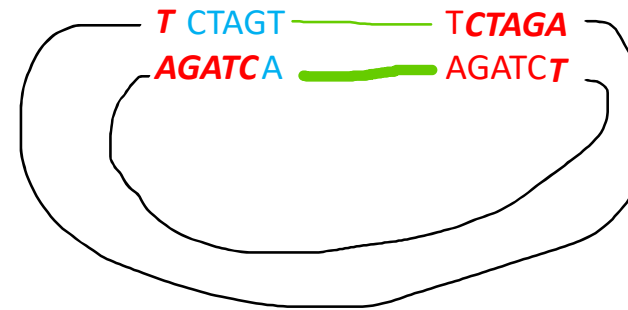
Realizou uma clonagem molecular na qual o vetor plasmídico foi digerido com uma só enzima – XbaI, e o inserto com duas enzimas diferentes, XbaI e SpeI. É possível esta clonagem? Justifique. Represente a construção final.

XbaI – T/CTAGA

SpeI – A/CTAGT



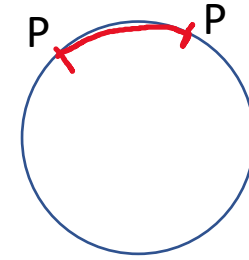
Fez uma clonagem dirigida ou não-dirigida?



Acha que deveria proceder a alguma manipulação adicional para aumentar número de clones recombinantes? Se sim, qual é essa manipulação e por qual razão?

Pensar para a próxima TP

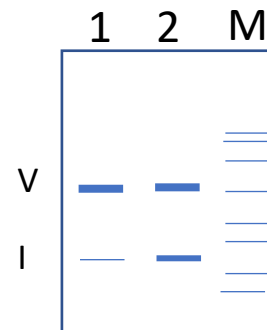
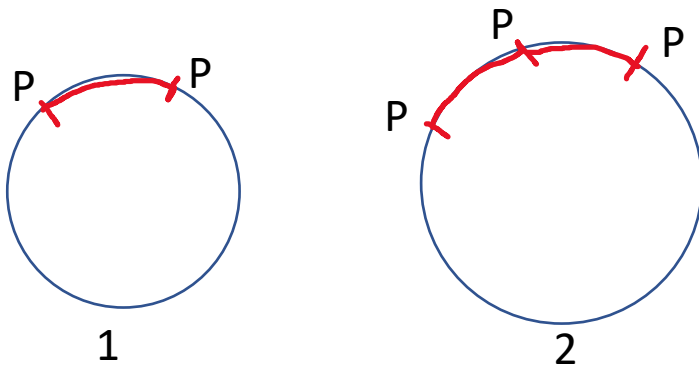
do Manual de Problemas - Clonagem Geral



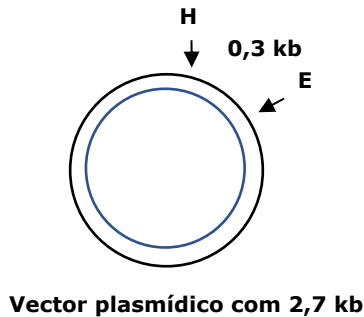
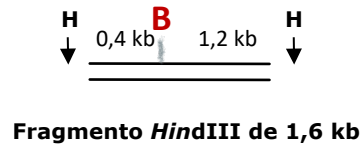
8. Um estudante clonou um fragmento *Pst*I de 1 kb no local *Pst*I de um vector plasmídico.

A digestão com *Pst*I de 12 clones selecionados permitiu concluir que apenas três dos clones continham o fragmento de 1 kb. Estes resultados, que traduzem uma baixa eficiência de clonagem, ocorreram porque:

- i. Os outros nove clones continham provavelmente dois fragmentos. Ainda que assim fosse, detectava-se fragmento clonado
- ii. Os outros nove clones eram formas relaxadas do plasmídio. Não eram clones recombinantes
- iii. Os outros nove clones continham o fragmento na orientação errada. Isso implicaria que o fragmento estava clonado
- iv. O fragmento continha um gene tóxico que era letal para a bactéria. As células não teriam sido selecionadas
- v. Os outros nove clones resultaram da auto-ligação do plasmídio sem fragmento.

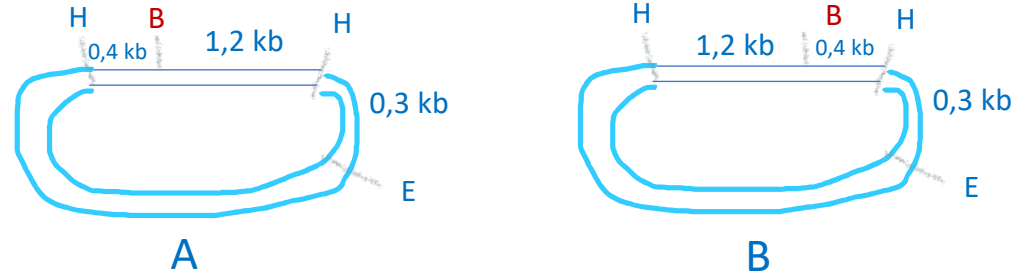


9. Considere o fragmento *Hind*III de 1,6 kb e o vector plasmídico hipotético de 2,7 kb abaixo representados. Quando se cliva este fragmento com a enzima *Bam*HI (**B**) originam-se dois novos fragmentos, de 1,2 kb e 0,4 kb. Admitindo que clonou o fragmento de 1,6 kb no local *Hind*III (H) do vector, que dista 0,3 kb do local *Eco*RI (E), responda às seguintes perguntas:



- Como procederia para determinar a orientação do fragmento nos clones recombinantes obtidos?
- Que estratégias de clonagem permitem obter clones recombinantes com o fragmento inserido em orientações opostas?
- Indique dois métodos de identificação de seqüências de DNA específicas numa biblioteca genómica.

1º Representação das duas construções passíveis de ser obtidas:



- Digestão clones recombinantes com *Bam*HI + *Eco*RI
 A – **1,5 kb** (1,2 + 0,3) + **2,8 kb** (2,4 + 0,4);
 B – **0,7 kb** (0,4 + 0,3) + **3,6 kb** (2,4 + 1,2);

b) Extremidades cegas

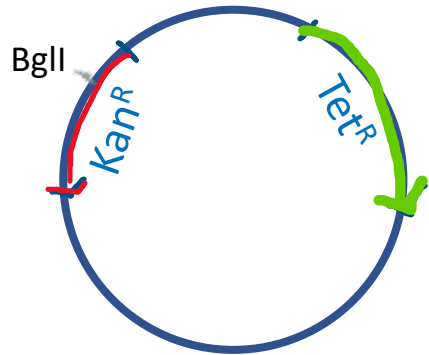
Extremidades coesivas compatíveis

Vectores com MCS invertidos/orientações opostas **Conceitos a falar mais adiante**

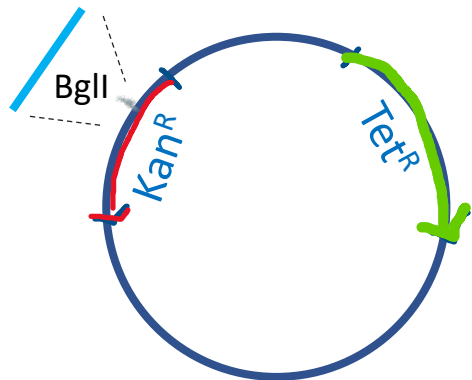
c) Amplificação de DNA por PCR com *primers* específicos. **Conceitos a falar mais adiante**

12. Um vector plasmídico contendo os genes kan^R tet^R foi digerido com a enzima *Bgl*I, que cliva no gene de resistência à canamicina (*kan*). O vector foi depois ligado a DNA de *Neurospora* clivado com a mesma enzima, e o DNA recombinante obtido foi propagado numa estirpe de *E. coli*.

- Que antibiótico colocaria no meio de cultura para assegurar que as colónias continham o plasmídeo?
- Que fenótipos de resistência a antibióticos apresentariam as colónias obtidas?
- Que fenótipo apresentariam as colónias contendo os insertos de DNA de *Neurospora*?

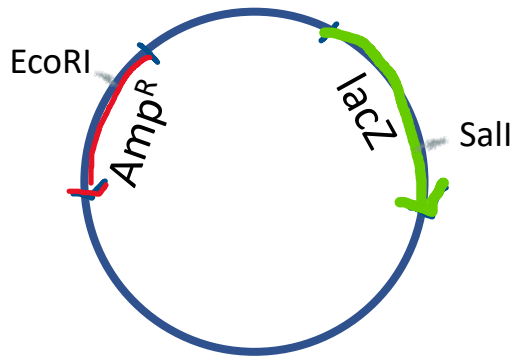


- Tetraciclina
- Tet^R Kan^S (recombinantes), Tet^R kan^R (não-recombinantes)
- Tet^R Kan^S - recombinantes



16. Suponha que o gene de resistência à ampicilina e o gene *lacZ* de um plasmídio contêm, respectivamente, os locais *EcoRI* e *Sall*.

- Como procederia à selecção dos plasmídios recombinantes após clonagem no local *Sall*? E no local *EcoRI*?
- Que vantagem apresenta um tipo de clonagem em relação ao outro?



Clonagem no local *Sall* de *LacZ* :

- inactiva o gene *lacZ*
- selecção em meio de cultura com Amp e X-gal
- colónias recombinantes **BRANCAS**

NOTA: a estirpe hospedeira, sobretudo quando se pretende inactivar *lacZ*, NÃO PODE PRODUIR *lacZ* ENDÓGENO

Clonagem no local *EcoRI* de *Amp^R* :

- Inactiva o gene *bla* (*Amp^R*)
- Selecção em meio de cultura sem Amp, mas com Xgal (terá de se diluir a cultura de transformação pois Xgal não elimina as que não foram transformadas e, ainda que brancas por não conterem o plasmídio, teremos um crescimento muito confluyente)
- Colónias transformantes azuis repicadas / *replica plating* para meio com Amp
- As que não crescerem em meio com Amp são as recombinantes que se irão recuperar na caixa de transformação original

Estratégia pouco prática e a utilizar só em último recurso

15. Um plasmídeo *lac*⁺ *tet*^R foi clivado por uma enzima de restrição no gene *lacZ*. O local reconhecido por esta enzima contém quatro bases e por clivagem gera uma extremidade 3' projectada, com duas bases em cadeia simples. Este local, no gene *lacZ*, corresponde ao 1º aminoácido da cadeia polipeptídica da β-galactosidase. Sabe-se, no entanto, que as alterações que afetam os primeiros 27 aminoácidos da β-galactosidase, raramente originam mutantes.

- Se pretendesse gerar extremidades cegas neste local, com vista a uma posterior clonagem, que enzima(s) utilizaria? Justifique a resposta.
- Se após a formação de extremidades cegas, religasse o plasmídeo com ligase de DNA e transformasse uma estirpe bacteriana *lac*⁻ *tet*^S, como procederia para seleccionar os transformantes? Qual seria o fenótipo Lac das colónias transformadas?
- Mencione três processos de tratamento de extremidades cegas, que permitem aumentar a sua eficiência de ligação numa experiência de clonagem molecular. Que enzima(s) utilizaria em cada processo?

a)  Actividade exonucleolítica 3' → 5':
DNA polimerase do fago T4, ou DNA polimerase Klenow ou DNA polimerase I de *E. coli*

b) - retirou-se 2 bases codão do 1º aa da *lacZ*.

- após ligação gera-se mutação frameshift no gene *lacZ*

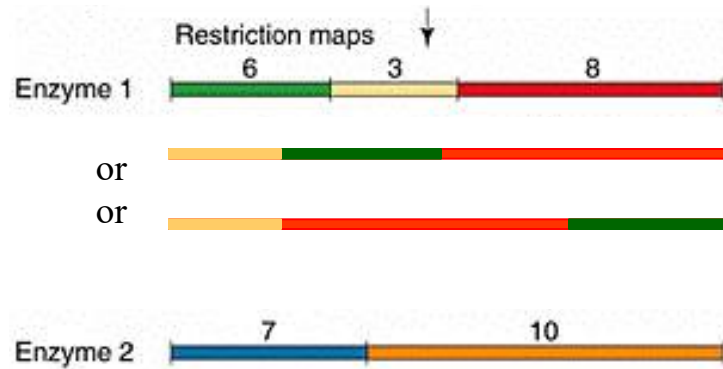
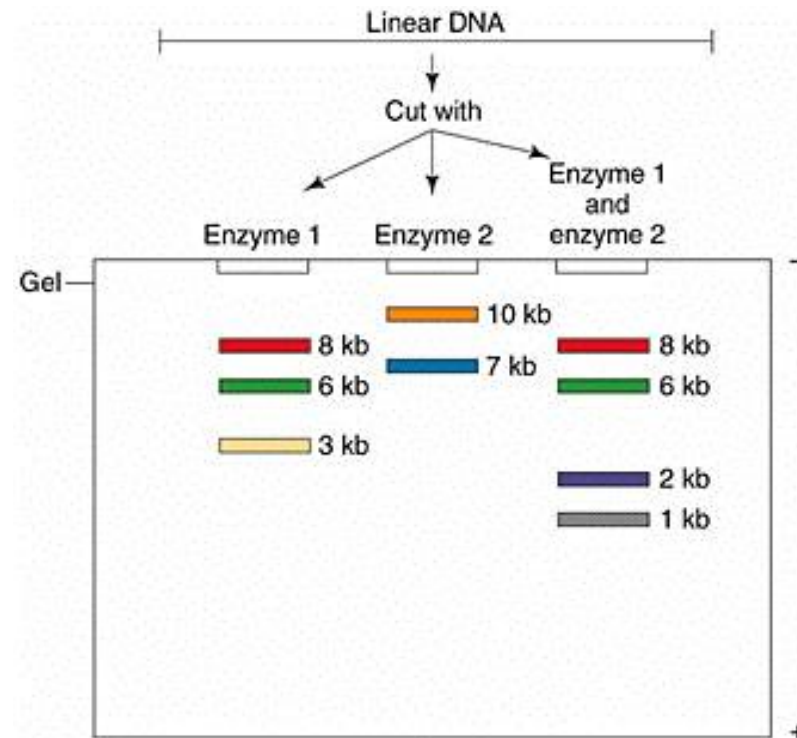
- seleccionava os transformantes com tetraciclina e as colónias seriam brancas

c) tratamento de extremidades cegas são:

- adição de *linkers*/adaptadores – metilase específica do local reconhecido pela enzima que cliva o *linker*; DNA ligase do fago T4

- adição de caudas de homopolímeros – transferase terminal. **Conceitos a falar mais adiante**

Restriction pattern analysis



Restriction map

