

Fundamentos de Biologia Molecular

1º Semestre, 2º Ano

Ano Letivo 2021/2022

Componente Teórico-Prática

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

Aula TP 1 – Exercícios: Bacterial restriction-modification systems

1) Introdução

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1978 was awarded jointly to Werner Arber, Daniel Nathans and Hamilton O. Smith "for the discovery of restriction enzymes and their application to problems of molecular genetics"



Werner Arber



Daniel Nathans



Hamilton O. Smith

2) Bibliografia

- Artigos/sites

Blumenthal RM and Cheng X (2002) Restriction-Modification Systems. In Modern Microbial Genetics, Second Edition. Edited by Uldis N. Streips, Ronald E. Yasbin, Wiley-Liss.

Loenen WAM, Dryden DTF, Raleigh EA, Wilson GG and Murray NE (2013) Highlights of the DNA cutters: a short history of the restriction enzymes. Nucleic Acid Res, NAR Breakthrough Art: 1

<https://www.idtdna.com/pages/docs/educational-resources/restriction-endonucleases.pdf?sfvrsn=4>

- Videos

1) 12 minutes- restriction enzymes:

<https://www.youtube.com/watch?v=tl2VaMY4q5A>

2) 7 minutes- restriction enzymes animated models:

[https://www.youtube.com/watch?v=\\$rhd_fBPyzSM](https://www.youtube.com/watch?v=$rhd_fBPyzSM)

Grupo 1. Modificação/Restrição de DNA

1.1. Classifique como verdadeiras ou falsas as seguintes afirmações:

- a) As metiltransferases (MTases) só se encontram em organismos procarióticos;
- b) A metilação nos organismos procarióticos está frequentemente associada a mecanismos de defesa dos organismos para proteger o DNA celular da clivagem com as respectivas enzimas de restrição;
- c) As endonucleases de restrição não podem ser utilizadas para distinguir amostras com diferentes padrões de metilação;
- d) A diferente sensibilidade à metilação por parte das enzimas de restrição permite a discriminação entre *loci*;

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

- a) Relativamente às endonucleases de restrição *DpnI* e *DpnII*:
 - i. reconhecem a sequência GATC;
 - ii. *DpnI* cliva na mesma sequência de reconhecimento mas só quando a adenina está metilada;
 - iii. *DpnII* cliva na mesma sequência de reconhecimento mas gera um outro tipo de extremidades (extremidades cegas);
 - iv. *DpnII* cliva na mesma sequência de reconhecimento mas só quando a adenina não está metilada;
 - v. podem ser úteis para discernir duas populações de células, baseando-se no padrão de metilação;
- b) Dos seguintes pares de enzimas de restrição, quais os que são relevantes nos protocolos de análise e estudo da metilação do DNA?
 - i. *BamHI/BglII*;
 - ii. *HpaII/MspI*;
 - iii. *McrA/McrBC*;
 - iv. *HsdR/HsdM*;
 - v. *DpnI/DpnII*;

1.3. Questões básicas (responda de forma sucinta)

- a) Qual a particularidade dos pares de enzimas de restrição utilizados nos protocolos de análise dos padrões de metilação?
- b) Pretende clivar um plasmídeo numa sequência de DNA reconhecida pela enzima *XbaI*. Sabendo que o plasmídeo foi amplificado numa estirpe *dcm⁻*, será isto possível? Justifique a resposta.
- c) Amplificou um plasmídeo numa estirpe de *E. coli dam⁻*, e pretende clivá-lo no local GATC. A sequência de reconhecimento das enzimas *DpnI*, *DpnII* ou *Sau3A1* é GATC. Qual das três enzimas utilizaria? Justifique a

resposta.

d) Que cuidado se deve ter quando se pretende digerir DNA genómico de mamíferos?

e) Pretende clonar DNA de *D. melanogaster* em *E. coli*. Poderia utilizar uma estirpe mrr^+ e $mcrAB^+$? Justifique a resposta.

f) Para clonar em *E. coli* DNA amplificado por PCR, poderia utilizar uma estirpe mrr^- e $mcrAB^-$? Justifique a resposta.

Grupo 2. Clivagem de DNA com enzimas de restrição

2.1. Escolha a(s) resposta(s) correta(s)

a) Sequências palindrómicas são segmentos da molécula de DNA de cadeia dupla que:

- i. têm a mesma sequência na direção $5' \rightarrow 3'$ e na direção $3' \rightarrow 5'$ da mesma cadeia;
- ii. têm a mesma sequência na direção $5' \rightarrow 3'$ ou na direção $3' \rightarrow 5'$, em cadeias complementares;
- iii. apresentam um eixo de simetria bilateral;
- iv. são frequentemente locais de reconhecimento das endonucleases de restrição de tipo II;

2.2. Questões básicas (responda de forma sucinta)

a) 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?

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

c) As alíneas, i-iv, indicam metade das sequências palindrómicas e não palindrómicas, reconhecidas por enzimas de restrição. Qual é a sequência completa, em cada caso?

- i. $5' AA-- 3'$
- ii. $5' ATG--- 3'$
- iii. $5' GGN--- 3'$
- iv. $5' ATNN--- 3'$

Nota: N, significa qualquer nucleótido.

d) Que diferenças apresentam as extremidades dos fragmentos de DNA produzidos pelas seguintes enzimas de restrição?

- i. *HaeIII* ($5'-GG/CC-3'$)
- ii. *MaeI* ($5'-C/TAG-3'$)

iii. *CfoI* (5'-GCG/C-3')

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

e) Considere a seguinte sequência de DNA:

5' -ACGTAGCTAG TAAAGTCTGT CCTTGATAGA AGCTTCGACT GACTAGTACT-3'

Este fragmento foi digerido pela endonuclease de restrição *HindIII* cuja sequência de reconhecimento é 5'-**AAGCTT**-3', cortando entre as duas adeninas. Quantos fragmentos de DNA resultarão da restrição com *HindIII*?