



UC: Fundamentos de Biologia

Componente Teórico-Prática

Aula TP 1 – Exercícios - Bacterial restriction-modification systems

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. F
- 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. V
- c) As endonucleases de restrição não podem ser utilizadas para distinguir amostras com diferentes padrões de metilação. F
- d) A diferente sensibilidade à metilação por parte das enzimas de restrição permite a discriminação entre *loci*. V

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 no mesmo local mas só quando a adenina está metilada;
 - iii. *DpnII* cliva no mesmo local mas gera um outro tipo de extremidades (extremidades cegas)
 - iv. *DpnII* cliva no mesmo local mas só quando a adenina não está metilada;
 - v. podem ser úteis para discernir duas populações de células baseando-se no padrão de metilação.

R: A, b, d, e

- 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*.

R: B, e

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 restrição?



R. Reconhecem a mesma sequência de corte mas têm diferente sensibilidade à 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.

R. Sim, porque a ação da enzima *XbaI* não é bloqueada pela metilação *Dcm*.

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.

R. Poderia utilizar duas das três enzimas. *DpnII*, porque cliva sequências GATC quando não metiladas na adenina; *Sau3A1* porque cliva sequências GATC não metiladas (sendo também insensível à metilação *Dam*, i.e., cliva sequências metiladas na adenina). Não poderia utilizar *DpnI* porque cliva apenas quando a sequência GATC está metilada na adenina.

d) Pretende clivar um plasmídeo numa sequência de DNA reconhecida pela enzima *XbaI*. Sabendo que o plasmídeo foi amplificado numa estirpe *dam⁺*, será isto possível? Justifique a resposta. De que depende a clivagem?

R. Sim, apesar de a enzima *XbaI* ser sensível à metilação. Assim, apenas quando a sequência de reconhecimento *XbaI* (TCTAGA) for seguida de TC, é que a ação da enzima *XbaI* é bloqueada pela metilação *Dam* (G*ATC), pois a sequência será: TCTAG*ATC. Se o plasmídeo recombinante tivesse sido amplificado numa estirpe *Dam⁻*, não existiria qualquer METILAÇÃO e o clivagem ocorreria mais frequentemente.

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

R. Considerando a elevada percentagem de citosinas metiladas no DNA genómico e o grande número de enzimas de restrição cuja atividade é bloqueada pela metilação, deve-se utilizar enzimas de restrição cujas sequências de reconhecimento não contenham CG.

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

R. Sim, porque ainda não foi referida a existência de metilação no DNA genómico de *Drosophila*, e estes sistemas restringem DNA metilado.

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

R. Sim, o DNA amplificado por PCR não é metilado. Estas estirpes não clivam DNA metilado, neste caso seria indiferente a estirpe também poderia ser *mrr⁺* e *mcrAB⁺*. O DNA amplificado por PCR não sendo metilado não é degradado por estes sistemas de restrição que clivam sequências metiladas.

Grupo 2. Clivagem de DNA com enzimas de restrição

2.1. Classifique como verdadeiras ou falsas as seguintes afirmações

a) Uma digestão com enzimas de restrição tem de incluir tampão com NaCl. F

b) Uma digestão parcial é detectada quando a soma das dimensões estimadas para os diferentes fragmentos de DNA, observados em gel de agarose, ultrapassa a dimensão total da molécula que foi digerida. V

c) Uma digestão parcial é detectada quando a intensidade de fluorescência dos fragmentos de DNA obtidos é proporcional à sua dimensão.F

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

- a) Sequências palindrômicas são segmentos da molécula de DNA de cadeia dupla que:
- têm a mesma sequência na direção 5'→3' e na direção 3'→5' da mesma cadeia;
 - têm a mesma sequência na direção 5'→3' ou na direção 3'→5' em cadeias complementares;
 - apresentam um eixo de simetria bilateral;
 - são frequentemente locais de reconhecimento das endonucleases de restrição de tipo II;
 - são alvos preferenciais de enzimas de tipo I e III.

R: b, c, d

2.3. Questões básicas (responda de forma sucinta)

a) O que são endonucleases de restrição de tipo II e que importância têm na tecnologia do DNA recombinante?

R: São as que tem a unidade de restrição separada da unidade de modificação e cortam (clivam) numa sequência específica

b) 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?

R. Por se tratar de uma molécula de DNA de cadeia simples (as % de bases são diferentes) , não passível de ser clivada pela maioria das endonucleases de restrição de tipo II.

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

R. Não, porque são sequências de reconhecimento diferentes, que só podem ser clivadas por enzimas de restrição diferentes.



d) 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.

R. a) 5' aaTT 3'; b) 5' atgCAT 3'; c) 5' ggnCC 3'; d) 5' atnnAT 3'

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

- i. *Hae*III (5'-GG/CC-3')
- ii. *Mae*I (5'-C/TAG-3')
- iii. *Cfo*I (5'-GCG/C-3')

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

R. a) Extremidades cegas; b) Extremidades coesivas 5' projetadas, ou 3' recuadas;
c) Extremidades coesivas 3' projectadas, ou 5' recuadas.