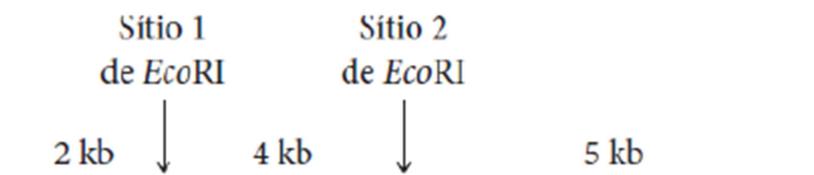


QBQ1354 – Biologia Molecular - Exercícios

1. Um geneticista usa um plasmídio para clonagem que tem o gene lacZ e um gene que confere resistência à penicilina. Ele insere um fragmento de DNA exógeno em um sítio de restrição localizado entre o gene lacZ e usa o plasmídio para transformar as bactérias. Explique como o geneticista pode identificar as bactérias que têm uma cópia de um plasmídio com o DNA exógeno.

2. O mapeamento de restrição de um fragmento linear de DNA revela os seguintes sítios de restrição EcoRI. Este segmento de DNA é cortado pela EcoRI, os fragmentos resultantes são separados por eletroforese em gel e o gel é corado com brometo de etídio.



- Desenhe uma imagem das bandas que aparecerão no gel.
- Se ocorre uma mutação que altera o sítio 1 de EcoRI neste fragmento de DNA, qual será a diferença do padrão de bandejamento no gel a partir do que você desenhou na parte a?
- Se ocorrerem mutações que alteram os sítios 1 e 2 de EcoRI neste fragmento de DNA, qual será a diferença do padrão de bandejamento no gel a partir do que você desenhou na parte a?
- Se forem inseridos 1.000 pb de DNA entre os dois sítios de restrição, qual será a diferença do padrão de bandejamento no gel a partir do que você desenhou na parte a?
- Se forem eliminados 500 pb de DNA entre os dois sítios de restrição, qual será a diferença do padrão de bandejamento no gel a partir do que você desenhou na parte a?

3. Uma molécula linear de DNA é submetida a digestão simples e dupla por endonucleases de restrição e são obtidos os seguintes resultados:

Enzimas	Tamanhos dos fragmentos (em kb)
EcoRI	2,9, 4,5, 7,4, 8,0
HindIII	3,9, 6,0, 12,9
EcoRI e HindIII	1,0, 2,0, 2,9, 3,5, 6,0, 7,4

Desenhe o mapa de restrição definido por esses dados.

4. Você está estudando uma molécula de DNA de plasmídeo circular com 10,5 quilopares de bases (kb). Ao digerir esse plasmídeo com endonucleases de restrição BamHI, EcoRI e HindIII, isoladas e em todas as combinações possíveis, obtêm-se fragmentos de restrição lineares com os seguintes tamanhos:

Enzimas	Tamanhos dos fragmentos (em kb)
BamHI	7,3, 3,2
EcoRI	10,5
HindIII	5,1, 3,4, 2,0
BamHI + EcoRI	6,7, 3,2, 0,6
BamHI + HindIII	4,6, 2,7, 2,0, 0,7, 0,5
EcoRI + HindIII	4,0, 3,4, 2,0, 1,1
BamHI + EcoRI + HindIII	4,0, 2,7, 2,0, 0,7, 0,6, 0,5

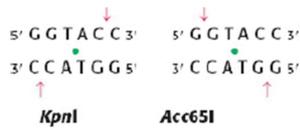
Desenhe um mapa de restrição do plasmídeo compatível com seus dados.

5. Quando se clona um fragmento de DNA exógeno em um plasmídeo, é frequentemente útil inserir o fragmento em um sítio que interrompa um marcador de seleção (como o gene de resistência à tetraciclina de pBR322). A perda da função do gene interrompido pode ser utilizada para identificar os clones que contêm os plasmídeos recombinantes com o DNA exógeno. Com o vetor bacteriófago λ , isso não é necessário, pois é muito fácil distinguir os vetores que incorporaram fragmentos grandes de DNA exógeno daqueles que não o incorporaram. Como esses vetores recombinantes podem ser identificados?

6. A anemia falciforme é resultante de uma mutação no gene da cadeia β da hemoglobina humana. A mudança de GAG para GTG no mutante elimina um local de corte da enzima de restrição MstII, que reconhece a sequência-alvo CCTGAGG. Estas descobertas foram a base para o teste diagnóstico para o gene da anemia falciforme. Proponha um procedimento rápido para distinguir o gene normal do mutante. Um resultado positivo provaria que o mutante contém GTG no lugar de GAG?

7. A enzima de restrição AluI corta na sequência 5'-AGCT-3' e a NotI corta na sequência 5'-GCGGCCG-3'. Qual seria a distância média entre os locais de corte para cada enzima na digestão do DNA de fita dupla? Assuma que o DNA contém proporções iguais de A, G, C e T.

8. As enzimas de restrição KpnI e Acc65I reconhecem e cortam a mesma sequência de 6 pb. No entanto, a extremidade coesiva formada pela clivagem da KpnI não pode ser diretamente ligada à extremidade coesiva formada pela clivagem da Acc65I. Explique o motivo.



9. O vetor de clonagem plasmídeo pBR322 (ver Figura 9-3) é clivado com a endonuclease de restrição PstI. Um fragmento de DNA isolado de um genoma eucariótico (também obtido por clivagem com PstI) é adicionado ao vetor preparado e ligado. A mistura de DNA ligado é então utilizada para transformar bactérias, e as bactérias que contêm os plasmídeos são selecionadas pelo crescimento em presença de tetraciclina.

(a) Além do plasmídeo recombinante desejado, quais outros tipos de plasmídeos podem ser encontrados entre as bactérias transformadas que são resistentes à tetraciclina? Como podem ser diferenciados?

(b) O fragmento de DNA clonado tem um tamanho de 1.000 pb e um sítio de EcoRI a 250 pb de uma extremidade. Três plasmídeos recombinantes diferentes foram clivados com EcoRI e analisados por eletroforese em gel, com os padrões mostrados a seguir. O que cada padrão de restrição nos informa a respeito do DNA clonado? Note que em pBR322, os sítios de restrição de EcoRI e PstI estão distantes cerca de 750 pb. O plasmídeo inteiro, sem o clone inserido, tem um tamanho de 4.361 pb. Marcadores de tamanho na canaleta 4 possuem o número de nucleotídeos observado.

