QBQ1354 – Biologia Molecular 15/06/2023

# Exercícios – 11

**Gabarito Clonagem Molecular**

1. Mapa de restrição

Um DNA linear dupla fita tem o mapa de restrição indicado abaixo



Transforme este DNA numa molécula circular e determine o tamanho dos fragmentos gerados por digestão independente com: (a) *Bam*HI e (b) *Eco*RI e (c) mistura de *Bam*HI + *Eco*RI.

a) Com digestão com BamHI, os fragmentos gerados terão 4,5 kb e 5,5 kb.

b) Com digestão com EcoRI, os fragmentos gerados terão 4 kb e 6 kb.

c) Com uma mistura de BamHI e EcoRI, serão gerados fragmentos com 1,5 kb, 2,5 kb e dois fragmentos com 3 kb.

2. Após digestão, os produtos resultantes foram analisados por eletroforese em gel de agarose.

Na figura abaixo, estão indicados os marcadores de tamanho molecular (kb). Na figura desenhe a posição de migração:

- do DNA não digerido (Poço A);

- dos produtos da digestão com *Bam*HI (Poço B);

- dos produtos da digestão com *Eco*RI (Poço C).

Na Figura indique a posição dos polos (positivo e negativo) da eletroforese.



3. Especifique a função das regiões ORI, AMPR e MCS indicadas no plasmídeo pUC19-207.



- A origem de replicação (ORI) do plasmídeo corresponde a uma sequência de nucleotídeos reconhecida pela DNA polimerase do hospedeiro, permitindo sua replicação.

- O gene marcador de seleção (AMPR) tem a função de conferir resistência a um antibiótico e permite determinar se o plasmídeo foi introduzido com sucesso na bactéria (se o organismo for resistente ao anitbiótico, isso indica que o plasmídeo foi inserido).

- O sítio de clonagem múltipla (MCS) é uma sequência de nucleotídeos que correspondem a vários sítios de restrição (nos quais as enzimas de restrição realizam a hidrólise do DNA). A presença desses sítios permite a inserção do DNA exógeno no vetor.

4. Um pesquisador recebeu duas culturas de bactérias *E. coli (*A e B*)*. Em uma cultura, as bactérias não contêm nenhum plasmídeo; na outra cultura, as bactérias contêm o plasmídeo pUC19-207.

Proponha um procedimento para identificar qual das duas culturas contêm o plasmídeo. Especifique todas as etapas.

 A B

Duas respostas possíveis

ALTERNATIVA 1

1. Preparar QUATRO placas de Petri com meio que permita o crescimento das bactérias.
2. Em DUAS placas adicionar o antibiótico ampicilina
3. Inocular/plaquear volumes iguais de CADA cultura em uma placa com ampicilina e em uma placa sem ampicilina.
4. Incubar as placas em temperatura e tempo adequados.
5. Verificar o crescimento das culturas nas placas.
6. Nas placas SEM ampicilina ambas as culturas A e B irão crescer.

Nota: Este é um controle positivo que mostra que as bactérias crescem nas placas com o meio de cultura.

Nas placas COM ampicilina APENAS a cultura da bactéria que contém o plasmídeo pUC19-207 irá crescer.

ALTERNATIVA 2

1. Preparar DUAS placas de Petri com meio que permita o crescimento das bactérias e adicionar o antibiótico ampicilina em ambas as placas.
2. Inocular/plaquear volumes iguais de cada cultura nas placas.
3. Incubar as placas em temperatura e tempo adequados.
4. Verificar o crescimento das culturas nas placas.

A placa onde houver crescimento de colônias corresponde cultura da bactéria que contém o plasmídeo pUC19-207.