

QUESTÃO 1

Baseado no seu conhecimento de biologia molecular até aqui, como você explicaria o que são alimentos transgênicos para um leigo, por exemplo sua tia que se recusa a comprar alimentos desse tipo? (Por favor não usem consulta para responder essa pergunta – ela não vale nota e vamos repetir ela na última aula do curso)

QUESTÃO 2 (1 ponto)

O que é uma enzima de restrição? Descreva como foram descobertas e quais as características principais dessa classe de enzimas.

Questão 2 (1 ponto)

Qual o número de combinações possíveis de sequências de 4pb? E de 6pb? E de 20pb? Baseado nesses números, comente sobre a frequência média com que você esperaria que uma enzima de restrição que reconhece uma sequência de 4pb ou de 6pb clivaria uma sequência de DNA de 10kb.

QUESTÃO 3 (1 ponto)

Encontre e circule todos os sítios de reconhecimento de enzimas de restrição de 6pb palindrômicos contidos na sequência abaixo. Pesquise na internet o nome das enzimas para cada sítio identificado (os sítios diferentes podem se sobrepor!)

```
GAATTCCTGCAGCCCGGGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTTAAGGACGTCGGGCCCCCTAGGTGATCAAGATCTCGCCGGCGGTGGCGCCACCTCGAG
```

QUESTÃO 4 (2.5 pontos)

Você recebeu um tubo contendo uma enzima que você suspeita ser uma enzima de restrição. Caso essa atividade se confirme, essa enzima seria a primeira enzima de restrição extraída da bactéria *Technologiacoccus recombinensis*, cepa QBQ2457.

a) Que nome você daria a essa enzima?

Para começar a caracterizar essa enzima, você obteve um tubo contendo uma solução de DNA altamente concentrada, a ponto de a solução ser viscosa. Você adicionou sua enzima a essa solução e observou que a viscosidade da solução diminuiu drasticamente.

b) O que isso pode significar?

A seguir, você preparou um substrato de DNA sintético para sua enzima, em que DNA de sequência aleatória foi marcado com fosfato radioativo na extremidade 5'. Após reagir esse substrato com sua enzima, você realizou uma precipitação com TCA (ácido tricloroacético), em

condições em que nucleotídeos livres são solúveis em TCA e oligonucleotídeos precipitam. Você observou que independente de adicionar sua enzima ou não, a radioatividade continua precipitando em TCA.

c) Como você interpreta esse resultado? Ele sugere que a enzima é uma fosfatase, endonuclease ou exonuclease?

Para buscar determinar a sequência que sua enzima reconhece e cliva, você realizou o seguinte experimento:

1. Tratou DNA de fita dupla de sequência aleatória com sua enzima
2. Marcou as extremidades 5' dos produtos dessa reação com fosfato radioativo
3. Digeriu esse material por um período curto com uma DNase que cliva DNA aleatoriamente, gerando mono-, di- e tri-nucleotídeos
4. Determinou por um método químico a sequência dos mono-, di- e tri- nucleotídeos radioativos formados nos passos acima

O principal mono-nucleotídeo radioativo foi A, o principal di-nucleotídeo radioativo detectado foi 5'-AT-3' e o principal tri-nucleotídeo foi 5'-ATC-3'.

Você realizou os passos 1 a 4 acima novamente, mas dessa vez marcou a extremidade 3' com fosfato radioativo no passo 2. Os produtos obtidos foram o mononucleotídeo radioativo T, o di-nucleotídeo 5'-AT-3', e o tri-nucleotídeo 5'-GAT-3'.

d) Baseado nesses dados, qual é a sequência de DNA clivada pela sua enzima? Explique o seu raciocínio.

e) A enzima gera extremidades coesivas 3', coesivas 5' ou cegas? Explique o seu raciocínio.

QUESTÃO 5 (1 ponto)

O que são plasmídeos e qual sua utilidade? Quais os principais elementos que um plasmídeo padrão precisa ter?

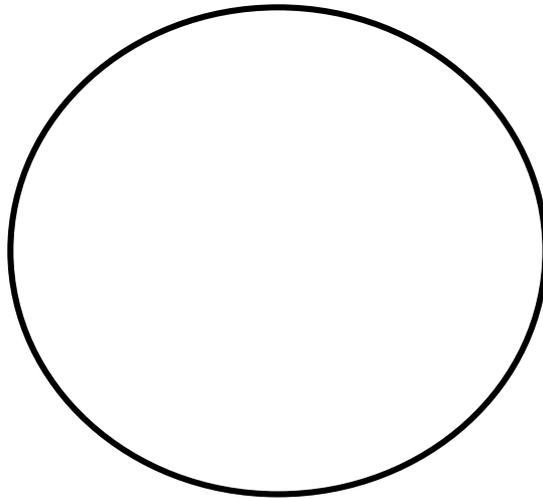
QUESTÃO 6 (1 ponto)

Você recebeu um tubo contendo um plasmídeo, mas a escrita no tubo está apagada e você precisa determinar que vetor é esse. Para caracterizar o plasmídeo do seu tubo, você digeriu o DNA com enzimas de restrição, obtendo os resultados abaixo:

Enzimas de restrição	Tamanho dos fragmentos (kpb)
XbaI	8.2
HindIII	8.2
EcoRI	2.5, 5.7
XbaI + HindIII	2.1, 6.1
EcoRI + HindIII	0.6, 2.5, 5.1
EcoRI + XbaI	2.5, 2.7, 3.0
EcoRI + XbaI + HindIII	0.6, 2.1, 2.5, 3.0

a) Qual o tamanho total desse vetor?

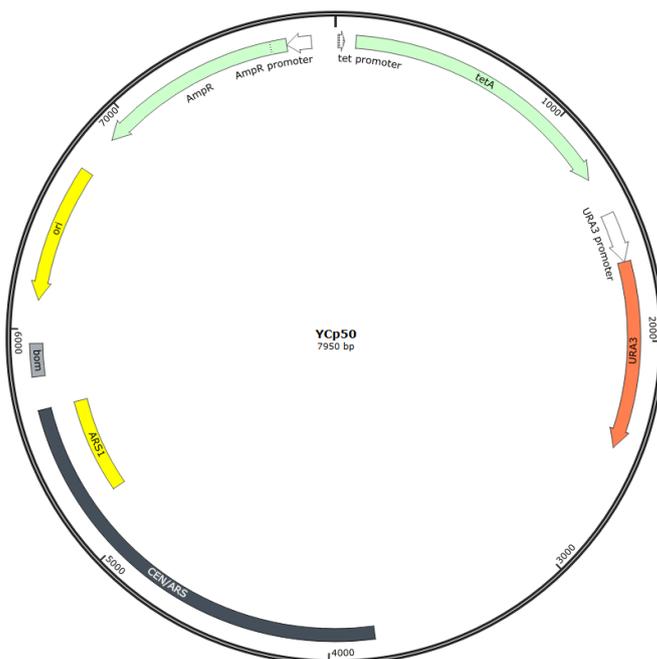
b) Marque no esquema abaixo os locais aproximados dos sítios de restrição dessas três enzimas, indicando a distância em kpb entre os sítios.



QUESTÃO 7 (1.5 pontos)

YCp50 é um *shuttle vector* que pode ser propagado tanto em bactérias quanto em leveduras. Veja o mapa do vetor na imagem abaixo. Os elementos *ori*, *AmpR* e *tetA* são originários do vetor pBR322 apresentado em aula. Já os elementos *URA3*, *CEN* e *ARS* permitem a propagação em levedura. Pesquise sobre esses elementos na internet.

- a) Qual dos elementos de levedura têm função semelhante a *ori* de bactérias? Qual tem função semelhante a *AmpR* e *tetA*?
- b) Qual característica a célula de levedura precisa ter para que a presença desse plasmídeo possa conferir uma vantagem seletiva?
- c) Qual o efeito do elemento *CEN* sobre a estabilidade desse vetor em leveduras?



QUESTÃO 8 (1 ponto)

Uma pesquisadora coletou uma grande quantidade de água do Rio Pinheiros, para clonar um gene específico de uma bactéria contida nessa amostra. Ela realiza um tratamento simples para isolar os microorganismos da amostra e extrai DNA desse material. Sabendo que o gene de interesse dela por acaso tem sítios para a enzima EcoRI no começo e final do gene, ela poderia digerir esse DNA com EcoRI e clonar esse material diretamente em um plasmídeo? Justifique sua resposta