

## Fundamentos de Biologia Molecular

### Problemas Práticos (desordenados)

1- Pretende clivar um plasmídeo recombinante no local GATC. O plasmídeo foi amplificado numa estirpe de *E. coli dam<sup>-</sup>*. Qual enzima das três enzimas usaria: *DpnI*, *DpnII* ou *Sau3A1*? Justifique.

2- Pretende cortar um plasmídeo numa sequência de DNA reconhecida pela *XbaI*. Sabendo que o plasmídeo foi amplificado numa estirpe *dam<sup>+</sup>*, será isto possível? Justifique. De que depende?

3- Pretende cortar um plasmídeo numa sequência de DNA reconhecida pela *XbaI*. Sabendo que o plasmídeo foi amplificado numa estirpe *dam<sup>-</sup>*, será isto possível? Justifique. De que depende?

4- Pretende cortar um plasmídeo numa sequência de DNA reconhecida pela *XbaI*. Sabendo que o plasmídeo foi amplificado numa estirpe *dcm<sup>+</sup>*, será isto possível? Justifique.

5- Pretende cortar um plasmídeo numa sequência de DNA reconhecida pela *XbaI*. Sabendo que o plasmídeo foi amplificado numa estirpe *dcm<sup>-</sup>*, será isto possível? Justifique.

6- Como justifica que uma mesma estirpe possa produzir duas enzimas que reconhecem os mesmos locais de restrição, mas com diferentes sensibilidades à metilação, i. e., a enzima A corta no seu local de reconhecimento só quando este se encontra metilado e a enzima B só corta nesse mesmo local quando ele não se encontra metilado? Como é que a estirpe produtora destas enzimas sobrevive?

7- Pretende clonar um fragmento de DNA de 350 pb que foi extraído de um plasmídeo recombinante, com as enzimas *BamHI* e *BglII*. O vector de clonagem pUC19, foi digerido com *BamHI*. Será esta clonagem possível? Justifique representando o vector e as extremidades após a clivagem, o inserto e as extremidades após a clivagem, e a molécula de DNA recombinante resultante.

Se pretendesse confirmar a clonagem efectuada, que enzimas de restrição usaria?

8- Pretende clivar um plasmídeo recombinante no local GATC que foi amplificado numa estirpe de *E. coli dam<sup>+</sup>*. Que enzimas de restrição usará *DpnI*, *DpnII* ou *Sau3A1*? Justifique.

9- Os isoesquízómeros podem diferir na sensibilidade à metilação?

10- Quais as vantagens da amplificação de plasmídios recombinantes em estirpes *dam<sup>-</sup>*?

11- Pretende clonar DNA humano em *E. coli*. Que genótipo conviria que esta estirpe possuísse no que se refere aos sistemas de modificação/restricção? Justifique.

12- Pretende clonar DNA de *D. melanogaster* em *E. coli*. Poderia usar uma estirpe fosse *mrr<sup>+</sup>* e *mcrAB<sup>+</sup>*? Justifique.

13- Pretende clonar DNA amplificado por PCR em *E. coli*. Poderia usar uma estirpe fosse *mrr<sup>-</sup>* e *mcrAB<sup>-</sup>*? Justifique.