

Genetická analýza



Kapitola 3 - Molecular Genetics of Bacteria

Genetická analýza

- Mutanty jsou esenciálním předpokladem pro jakoukoliv genetickou studii, pro strukturu genů, i jejich funkčních závislostí
- Jednoduchost izolace mutant bakterií spočívá v jejich klonovatelnosti –
 - klonují se sami a rozmnožují se asexuálně.
- Recesivita alel se projevuje jednoznačně bez dalších křížení a je homozygotní.

Základní terminologie – taxonomické dělení

□ **Bakteriální druh:**

skupina kmenů, které mají mnoho stejných stabilních vlastností a výrazně se jimi liší od ostatních druhů (skupin kmenů)
je charakterizován genotypově a fenotypově

□ **Bakteriální kmen:**

populace organismů, které jsou potomky jednoho organismu, t.j. jedné buňky, ze které vznikla kolonie.

□ **Biovar:**

varianta bakteriálního kmene, která se liší biochemicky nebo fyziologicky.

□ **Morfovar:**

varianta bakteriálního kmene, která je morfologicky odlišná.

□ **Sérovar:**

varianta bakteriálního kmene, která má odlišné některé antigenní struktury.

□ **Taxonomie podle podobnosti 16S rRNA:**

ke stejnému bakteriálnímu druhu přísluší bakterie, které mají nejméně z 97% identickou sekvenci 16S rRNA.

Základní terminologie – genetická charakterizace

- **Divoký kmen:**
náhodně nalezený přírodní kmen, který je považován za srovnávací a je používán pro genetickou analýzu druhu (např. *B. subtilis* 168).
- **Mutant:**
je kmen, který se od původního liší v růstových vlastnostech a ty jsou předávány na potomstvo.
- **Fenotyp:**
růstové vlastnosti kmenu (Leu^+ , Leu^- , Sm^s , Sm^r),
(fyziologický projev exprese určitého genu,)
- **Genotyp:**
sekvence DNA organismu (leu^+ , leu^- , $leuA$, $leuB$),
(mnemotechnický popis funkce genu, biosyntéza leucinu)
- **Alela:**
název pro alternativní formu genu ($leuA128$)
dominantní: kóduje funkčně aktivní polypeptidový řetězec
recesivní: kóduje funkčně inaktivní polypeptidový řetězec

Základní terminologie - mutace

Mutace: změna sekvence DNA oproti divokému kmeni

Mutace podle různých kritérií:

□ Podle způsobu vzniku:

- spontánní (10^{-7} až 10^{-10})
- indukované (10^{-3} až 10^{-5})

□ Podle *projevu* :

- absolutní,
- neúplné
- podmíněné

□ Podle typu:

- bodové,
- dvojité,
- deleční, delečně substituční,
- inserční.

Mutace může vzniknout

□ **Bodová mutace**

- spontánní (chybou v přepisu DNA, tautomerní formy basí)
- indukovaná (UV záření, mutageny chemické povahy)

□ **Delece**

- důsledek opravných mechanismů buňky

□ **Inserční a deleční mutace**

- způsobené intragenovými přesuny (transpozice)

□ **Inserční mutace**

- způsobené intergenovými přesuny (transformace, transdukce, konjugace)

□ **Kombinace všech**

Základní terminologie - mutace

Mutace absolutní (*Tight mutant*): projevuje svůj fenotyp (rozdílný od divokého kmene) nesporně a jasně při daných růstových podmínkách.

Mutace neúplná (*Leaky mutant*): prokazuje fenotyp méně výrazně (ve srovnání s absolutní mutantou). Za daných růstových podmínek může růst, ale oproti divokému kmenu se jeho vlastnosti liší, např. nižší rychlostí.

Mutace podmíněná: prokazuje fenotyp pouze za určitých podmínek

Reversní mutace: zpětná mutace na standardní typ, bodové mutace (5×10^{-6}), dvojitý bodový mutant ($2,5 \times 10^{-11}$), delece nerevertují, vyštěpení inserce (závisí na typu).

Polarizující mutace: mutace měnící aktivitu transkripční jednotky za mutačním místem.

Supresorová mutace: je taková následná mutace, která ruší vliv první. (mutace vedoucí ke vzniku supresoru) (např. ambre, ochre)

Genetická nomenklatura

- **genotyp:** *hisG153*,
mutace v biosynthese histidinu, genG, alela 153 (jakákoliv mutace)
- **fenotyp:** His⁻,
mutant není schopen syntetizovat histidin
- **operon:** *hisGDCBHA*F
- **delece:** Δ - delta
Δ *hisG251* (jeden gen), Δ *his(G,D)253* (přes dva geny), Δ(*hisD-rfb*) (delece přes více jak jeden operon)
- **inzerce:** *hisG9425::Tn10(tet)*, *hisD9924::MudJ*
neznámé geny: *yad-1451::Tn10*, *yab-1452::Tn10*,
(poloha v min na gen mapě, a=0, b=1, c=2 atd)
nezmapovaná poloha: *yxx*
inzerce v F-plazmidu: *yzf*, (bez ohledu na polohu).

Genetická nomenklatura

- **fúze genů:** Φ - fí
 $\Phi(hisD-lacZ)9953$, (fúze lacZ genu jako reportérového s regulačním proteinem hisD)
 $\Phi(hisD' - lacZ+)9960$ (Hyb), genová fúze aminoterminální části hisD genu ve čtecím rámci s aminoterminální částí lacZ genu, kde (Hyb) znamená produkci hybridního HisD-LacZ proteinu
- **supresorové a podmíněné mutace:**
hisG2147(Am), pokud je mutace suprimovatelná (stop kodon amber (UAG))
hisG2148(Ts) - mutace teplotně sensitivní (heat-sensitive)
hisG2149(Cs) - mutace chladově sensitivní (cold sensitive)
- **řízené delece a duplikace:**
DEL983[(hisD)*MudA*(hisF)]
- řízená delece, která vznikla rekombinací mezi inzercí hisD::MudA a inzercí hisF::MudA
DUP984[(hisD)*MudA*(hisF)]
- řízená duplikace, při níž vznikla duplikace genetického materiálu mezi inzercemi hisD::MudA a hisF::MudA

Genetická analýza

□ Základní otázka č.1.

zda izolovat přirozeného mutanta, či mutovat.

- Přirozené mutanty jsou méně časté
- Vybrat mutační způsob. - Žádný mutagen nepůsobí zcela náhodně, vždy má určitý stupeň specifity.
(mezi mutageny existuje široká škála stupňů specifity).

□ Základní otázka č.2

jaký je genetický rozsah, který může vyvolat žádaný fenotyp

- Bodové mutace, inserce, delece, rekombinace, inverse sekvencí

jestli uvažovaný mutagen může tuto mutaci vyvolat s rozumnou a detekovatelnou frekvencí

- Mutační rychlost

Genetická analýza

- Pokud je požadována úplná **ztráta určité fyziologické funkce**,
 - inaktivace genu
 - mnoho různých mutací může způsobit žádaný fenotyp.
 - škála mutagenů (nebo náhodných mutací), která je schopná přivodit žádanou mutaci je velká.
 - bodové mutace, bodové delece, větší delece, inserce bodové, inserce markerů
 - liší se pro různé fenotypy –
 - fenotyp zprostředkovaný několika geny – častější výskyt mutant
 - His- (11 genů $10^6 - 10^7$) 10^3 častější výskyt než Str (1 gen) $10^{10} - 10^{11}$
- Pokud je požadováno navození **změny funkce** nebo vznik **nové určité funkce**
 - změna biochemické aktivity stávajících genů
 - bodové mutace – záměna basí – nízká mutační rychlost
 - množství konkrétních mutací, které vyvolají příslušnou změnu produktu budou malé
 - pouze takový mutagen, který je schopen takovou změnu vyvolat je použitelný
 - vnesení nového genu
 - metody horizontálního přenosu - extrémě vysoká mutační rychlost -
Vnesení x ztráta plazmidu nebo profága, rekombinační událost, inverse sekvence
 - genetické inženýrství
 - kombinace obou

Vytváření mutací

- **Nespecifické mutace -**
mutace v mnoha genech a následný výběr mutanta defektní v daném fenotypu
 - **předpoklad:** vypracování selekční strategie
 - **použití:** při studiu děje, jehož molekulární podstatu neznáme
 - **metody:** UV záření, mutagenní látky, inzerce transpozonů

- **Specifické mutace -**
cílená změna určitého genu a následné sledování vlivu na fenotyp
 - **Předpoklad:** nutná znalost sekvence příslušného úseku DNA
 - **použití:** při identifikaci neznámé biochemické funkce sekvenovaného genu (čtecího rámce).
 - **metody:** specifické delece a inserce (pomocí restričních enzymů, ATB kazety)
záměny basí metodami cílené mutagenese (site-direct), inkorporace do chromosomu – metody výměny allel.

Základní metody genetické analýzy

Základní cíl genetické analýzy

- rozpoznat a izolovat žádanou mutantu

- selekční metody (výběr, selections)
- vyšetřovací metody (třídění, screens)
- obohacovací metody (obohacení, enrichments)
- komplementační metody

používají se jak v klasické genetice, tak i genetickém inženýrství

- křížení – HGT– genetické mapování, vytváření násobných mutant
- používá se v klasické genetice

Selekční metody – pozitivní selekce

Podmínky:

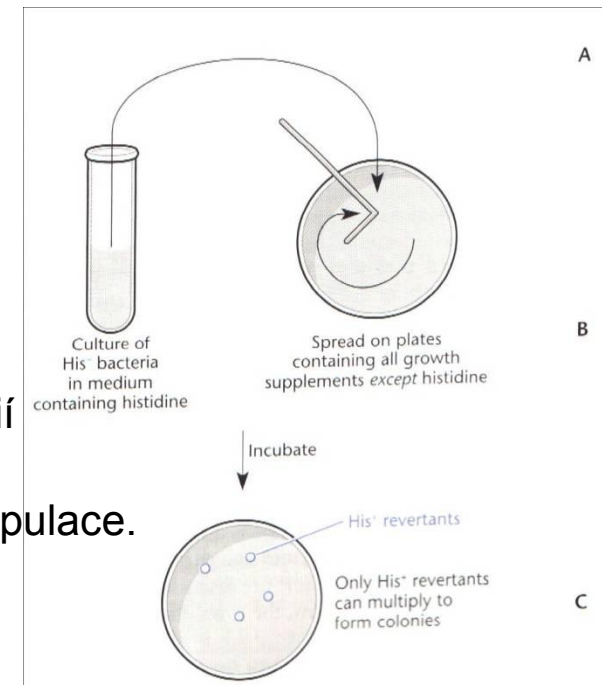
- najít takové podmínky kdy rostou pouze mutanty s žádaným fenotypem.

Vlastnosti:

- Jednokroková velmi účinná metoda, kdy na selektivních plotnách vyrostou pouze žádaný mutant.
- Možnost opakované selekce stejného mutantu.
- Možnost izolace i spontánních mutantů.
- Možnost vnášení markerů či reportérových genů.
př.: resistance k antibiotikům

poz.: Všechny podmínky je možné považovat za určitých kritérií za selektivní.

Pokud se selekční tlak sníží, dojde k nárůstu původní populace.



Selekční metody – negativní selekce

- Podmínky:
 - Najít takové podmínky, kdy roste WT a ne mutant
- Vlastnosti:
 - Není selekce v pravém slova smyslu
 - Vyšetřování diferenční metodou na ztrátu mutanta.
 - Replica plating
 - Obohacovací metody

Obohacovací metody

- Cílem je zvýšit obsah mutanta v populaci.
- Obohacovací metody jsou založené na principu, usmrcování rostoucích buněk.
 - Musí být nalezeny podmínky, kdy žádaná mutanta neroste a ostatní buňky ano.
 - Do media se přidá agens, které usmrcuje rostoucí buňky. Penicilin (tikarcilin, cykloserine)
 - Po určité době kultivace (3-4 generace) se pokračuje v kultivaci za podmínek kdy rostou i mutanty.(bez ATB)
- Metoda zvyšuje koncentraci mutanty na 0,1-1% populace.
- Následuje metoda negativní selekce či screeningu.

Replica plating

Isolace auxotrofní mutanty Lys^-

- ❑ Kultura obsahující divoký kmen a mutantu je pěstována na komplexním mediu
- ❑ Kolonie jsou přeneseny na plotny ve stejné orientaci, jak na komplexní medium, tak na minimální medium pomocí razítka
- ❑ Na minimálním mediu Lys^- kolonie nevyrostou.
- ❑ Mohou být lokalizovány na komplexním mediu.

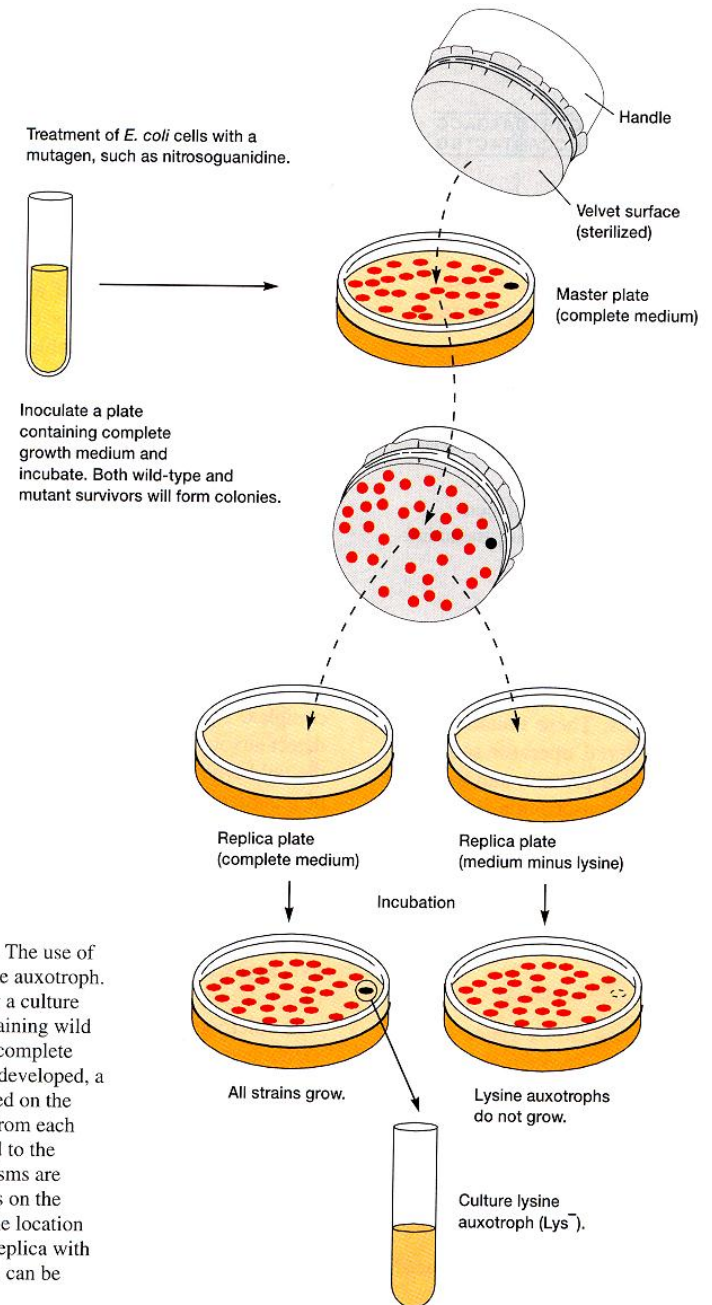


Figure 13.15 Replica Plating. The use of replica plating in isolating a lysine auxotroph. Mutants are generated by treating a culture with a mutagen. The culture containing wild type and auxotrophs is plated on complete medium. After the colonies have developed, a piece of sterile velveteen is pressed on the plate surface to pick up bacteria from each colony. Then the velvet is pressed to the surface of other plates and organisms are transferred to the same position as on the master plate. After determining the location of Lys^- colonies growing on the replica with complete medium, the auxotrophs can be isolated and cultured.

Vyšetřovací metody - screening

- Analýza různých bakteriálních isolátů na žádaný fenotyp nebo vlastnost (neobvyklý růst, přítomnost zajímavého metabolitu, produkce enzymu, přítomnost úseku DNA hybridizující s danou sondou).
- Používají se tehdy,
 - > pokud růstové vlastnosti žádané mutanty jsou ve vztahu k divokému kmeni neovlivněné nebo ovlivněny zhoubně (škodlivě - deleteriously).
 - > pokud frekvence mutant je dostatečná (UV, transposony.)
- **Celkové analýzy:**
pokud se hledají enzymové aktivity, sekundární metabolity apod. je třeba vyšetřit jednotlivé klony. (10^1 až 10^4 kolonií)
- **Diferenční analýzy :**
pokud je možné vyšetřování na diferenciálních mediích a jejich kombinacích. (10^5) - replica plating.
- **Hybridizace:**
se značenou DNA sondou či protilátkou (přenos kolonií na membránu)

Obecné podmínky

- Pokud se během izolace mutanty naskytne destruktivní krok je třeba si vytvářet repliky a zásoby původních mutantů. Vždy je totiž cíl izolovat živou mutantu dané vlastnosti.
- Při izolaci postupovat metodou vytváření zásob. Pokud izolujeme mutantu, která je v populaci v nízké koncentraci a hledání vyžaduje dvou a více krokovou izolaci je užitečné si v každém kroku nechat zásobu buněk, tak, aby se kdykoliv mohl vrátit o krok zpět k úspěšné izolaci, kroku.
- Nevýhody
Tento systém většinou vyžaduje vyšetření daleko většího množství potenciálních mutantů, než systém založený na analýze homogenních kolonií nebo tekuté kultury.

Kultivační media – podle složení

Řada testů se interpretuje na základě odpovědi roste X neroste.

- **Definovaná kultivační media** (minimální media, synthetická)
jsou složena z látek známého chemického složení. (pufr, zdroje C, N, P, ionty, vitaminy, popř. auxotrofní požadavky)
Jako zdroje všech dalších biogenních prvků postačují jejich množství, které kontaminuje složky media.

- **Komplexní kultivační media**
jsou složena z hydrolyzátů chemicky nedefinovaných biologických materiálů. (peptone, casamino acids, yeast extract)
Přidávané soli obvykle pouze upravují osmolaritu kultivačního media
Rozdíly mezi peptony: podíl aminokyselin a oligopeptidů
(Casaminoacids: kyselý hydrolyzát kaseinu, chybí tryptofan, asparaginu, glutaminu a cysteinu). málo

Kultivační media – podle působení

□ **Selektivní medium:**

umožňuje růst mutantě, ale nikoliv divokému kmenu.

- antibiotikum obsahující media, (ampicilin, chloramfenikol, tetracyklin, kanamycin, streptomycin)
- toxický metabolický intermediát (sacharosa pro G- v přítomnosti sac genu *Bacillus subtilis*)

□ **Diferenciální medium:**

umožňuje růst jak divokému kmeni tak mutantě, ty však vytvářejí rozdílné kolonie (barva, tvar).

Vnášení metabolických aktivit - Lac, Pho.

□ **Minimální media:**

neumožňují růst auxotrofům.

- růst pouze po přidání auxotrofního požadavku,
- možno selektovat mutantu auxotrofní na více požadavků

Detekce vzácných mutant na diferenciálních a minimálních mediích je limitována celkovým počtem kolonií.

Diferenciální media

□ **Tetrazoliová media:**

Triphenyl tetrazolium chlorid - redoxní činidlo, v ox. formě bezbarvý v red. formě červený. Redukce inhibována nízkým pH. Karbohydráty metabolizující enterobakterie vytvářejí bezbarvé kolonie, ty co využívají jiný zdroj C, vytvářejí červené kolonie.

□ **MC Conkey agar:**

Neutrální červeň a krystalová violet' - pH indikátory na rozlišení Lac mutant a *E. coli* (Lac⁺) od ost. pathogenních enterobakterií (např. *Salmonelly* (Lac⁻)).

□ **Xgal:**

5-bromo-4chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid, substrát pro β -galaktozidasu. Po rozštěpení vytváří modré zabarvení. Použití při fusích s *lacZ* genem. (klonovací vektory, promotor probe vektory)

□ **XP:**

5-bromo-4-chloro-indolyl-phosphate, pro detekci alkalické fosfatasy (*phoA* gen). Po rozštěpení modrá barva (indigo).

Příklad izolace mutanta

Máme-li divoký kmen *E.coli*,

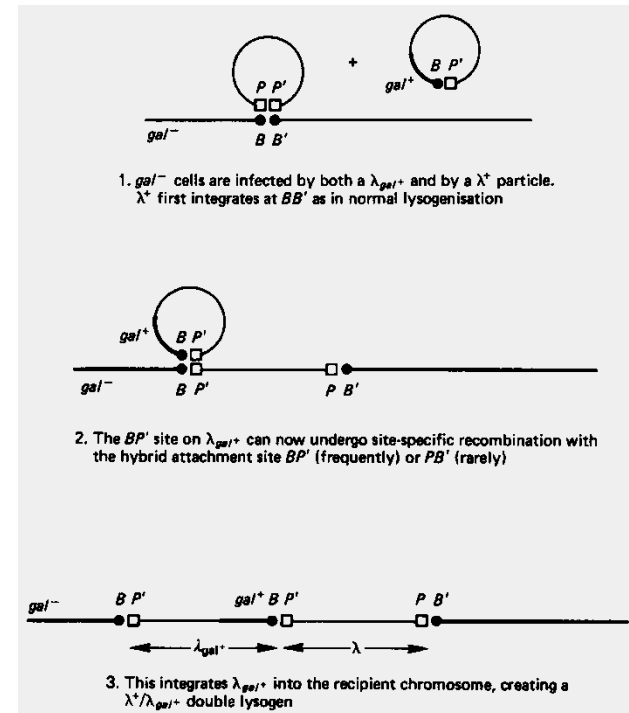
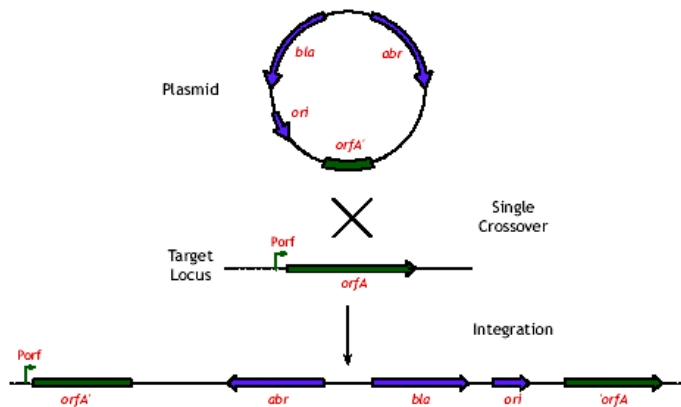
který je citlivý k antibiotiku streptomycinu (**Str^s**) a je schopen utilizovat laktózu jako zdroj uhlíku (**Lac⁺**).

- Můžeme z něho izolovat **spontánní streptomycin rezistentní mutanty** (Str^r) i když jsou vzácné a v kulturách divokých kmenů *E. coli* se vyskytují ve frekvencích menších než 10⁹.
 - Toho lze snadno dosáhnout použitím selektivního media obsahující streptomycin neboť buňky divokého kmene na tomto mediu nerostou.
- **Izolace mutant neschopných utilizovat laktózu** vyžaduje jiný postup.
 - **Na minimálních mediích s laktózou**
jako jediným zdrojem uhlíku bude růst divoký kmen (Lac⁺), ale nikoliv mutant Lac⁻
 - **Na diferenciálním mediu**
jako je například MacConkey-laktose agar, či X-gal se Lac⁺, od Lac⁻ budou lišit barvou kolonií.
U spontánních mutantů je to ovšem obtížné, protože jich je velmi málo a je obtížné je tímto způsobem izolovat.
- **Selektivní media** pro Lac mutanty se dají připravit použitím chemického analogu laktózy, který je konvertován na toxický metabolický produkt. Tím jsou buňky s Lac⁺, zabíjeny, kdežto buňky Lac⁻ na tomto mediu mohou růst.
- Zvýšíme pravděpodobnost působením mutagenů

Komplementační metody

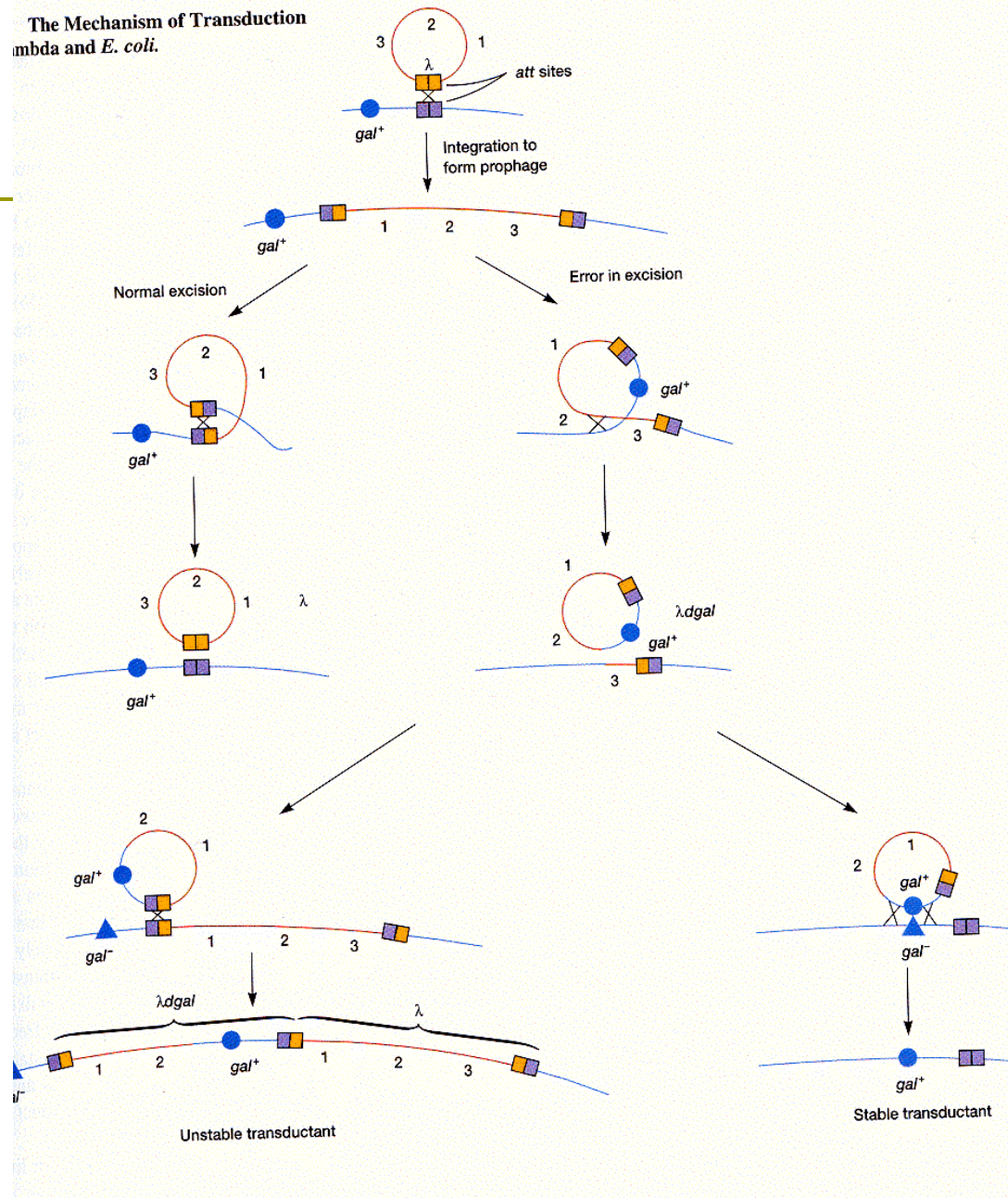
Genetická analýza mutant stejného fenotypu

- podmínka: existence dvou forem alely v jednom organismu
- provedení: vytvoření částečného diploida
 - Na plazmidu - konjugativní plazmidy, jednokopiové
 - Inzerce do chromozomu - lysogenní fágy, integrativní plazmidy



□ Schéma excise λ fága

The Mechanism of Transduction
 mbda and *E. coli*.



Komplementační metody

Aplikace

- Test alelismu –
 - určuje zda dvě mutace jsou alelické či nikoliv
 - určení počtu genů odpovědných za fenotyp
 - F' *lacZ*⁻ *lacY*⁺ / *lacZ*⁺ *lacY*⁻ - komplementuje se na WT
 - F' *lacZ*⁻ *lacY*⁺ / *lacZ*⁻ *lacY*⁺ - zůstává Lac-
 - F' *lacP*⁻ *lacZ*⁺ / *lacP*⁺ *lacZ*⁻ - zůstává Lac-
 - F' *lacP*⁺ *lacZ*⁺ / *lacP*⁻ *lacZ*⁻ - komplementuje se na WT

Komplementační metody

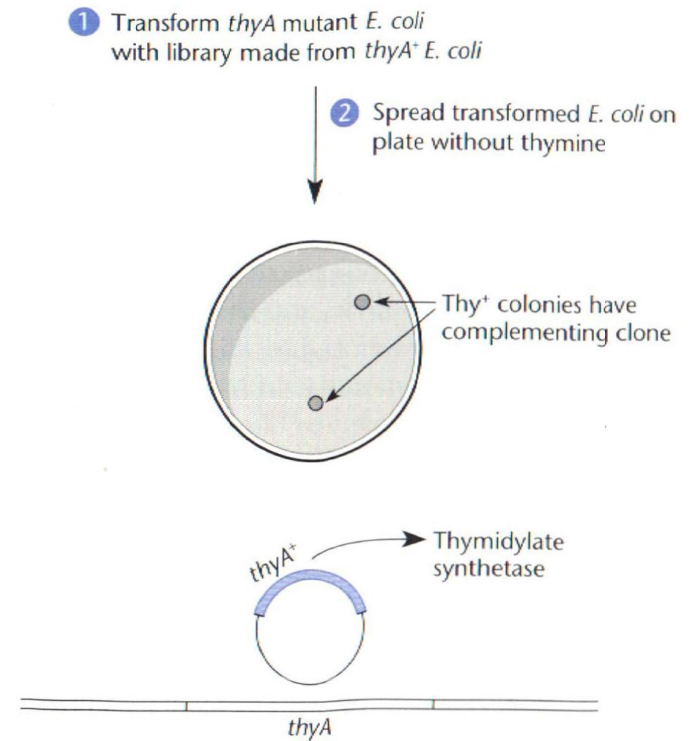
Určení recesivity a dominance

- Určuje zda mutantní alela v přítomnosti WT alely projeví původní fenotyp
 - Recesivní – neprojeví svůj fenotyp v přítomnosti WT alely
 - Dominantní – projeví svůj vliv na fenotyp v přítomnosti WT alely

- Cis-trans test
 - Určuje zda mutace je tzv. trans acting nebo cis acting
 - trans – pokud je mutován gen jehož produkt je difusibilní
 - možnost komplementace in trans
 - cis – mutace v části DNA promotoru či začátku replikace
 - není možno komplementovat

Komplementační metody

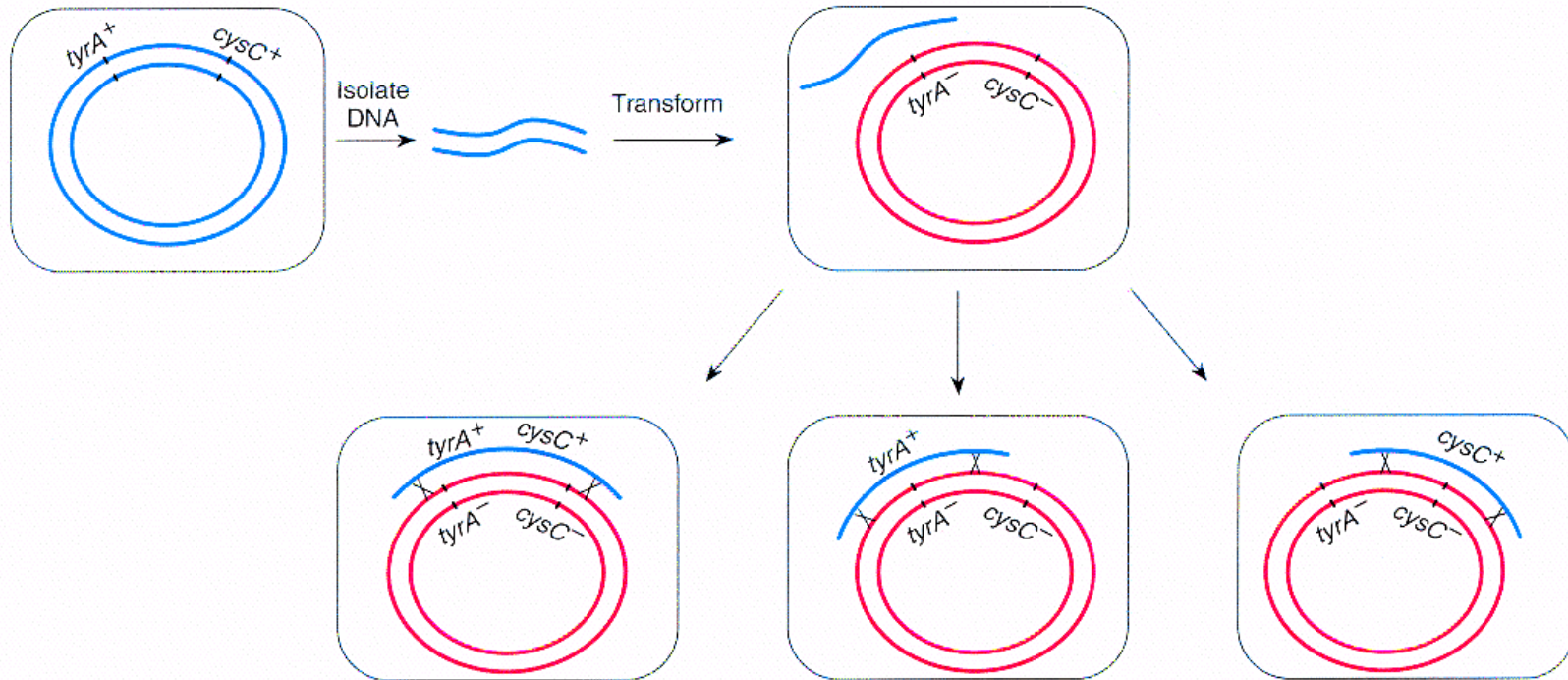
- Klonování pomocí komplementace
 - Využití schopnosti komplementace in trans k nalezení genu sledovaného fenotypu
 - knihovna WT se komplementuje s mutantou
 - selekce komplementovaných klonů



Křížení

- Konjugace, transformace, transdukce
 - Detekce – pouze jestli proběhne mezi dvěma mutanty
 - Pokud dojde k rekombinaci do chromosomu –
 - Náhodný proces
 - Proběhne s nízkou frekvencí
 - Selekční podmínky – pouze jeden typ mutace
 - **Selektovaný marker** – výhodnější pozitivní selekce
 - Poté analýza na další přenesené geny – **neselektovaný marker**
- př.: výběr selektovaného markeru
donor *arg - , trp+ , Hfr,*
recipient *arg+ , trp-*
při přenosu a rekombinaci zaměněn *trp-* za *trp+*
- je lepší použít *trp* marker (*trp-* v recipientovi) jako selektovaný než *arg* (*arg-* v donorovi)

Př. - mapování



Growth			
Complete medium	+	+	+
Minimal medium	+	-	-
Minimal + tyrosine	+	-	+
Minimal + cysteine	+	+	-

$tyrA^+ cysC^+$

$tyrA^+ cysC^-$

$tyrA^- cysC^+$

Typy mutant: užitečné mutanty

- **Prototrof:**
Kmen, který je schopen pokrýt všechny požadavky na zdroj uhlíku. (vyžaduje růstové faktory, které vyžadují všechny kmeny jeho druhu).
- **Auxotrof:**
kmen který k svému růstu vyžaduje jeden nebo více růstových faktorů organické povahy (např. aminokyseliny, nukleotidy, vitaminy), který není požadován divokým kmenem.
- **Mutant resistentní k antibiotikům:**
mutant, který roste v přítomnosti antibiotika
- **Mutant citlivý k supresorům (sus):**
přítomnost nesmyslného kodónu uvnitř genu, nonsense mutace (UAA, UAG, UGA (isolace pomocí fága se supresorovým genem v tRNA aminokyseliny).
- **Podmíněný mutant:**
projevuje mutaci pouze za určitých podmínek.
 - **Permisivní** - podmínky při kterých se jeví jako divoký kmen
 - **Non-permisivní podmínky** - fenotyp mutanty očividný.
 - **příklad:** teplotně závislé mutanty. (projevují svůj odlišný fenotyp pouze při zvýšené, resp. snížené teplotě, změna aminokyseliny významné pro teplotní stabilitu)

Užitečné mutanty

- Auxotrofní mutanty
 - selekční markery (aa), pozadí reportérových genů (*lac*)
- Termosensitivní mutanty- podmíněné letální
 - studium esenciálních genů, kontrola exprese, „vyředování“ plazmidů
- RecA
 - nerekombinantní kmeny pro klonování
- Mut
 - cílená mutagenese
- Dam
 - cílená mutagenese (mismatch repair, studium role methylace DNA, regulace některých genů), klonování
- tRNA supresory –
 - studium esenciálních genů, studium bakteriofágů

Auxotrofní mutanty

- Aminokyseliny –
 - tryptofan, tyrosin, histidin, leucin, atd.
 - jednoduché
- Bodové mutace (spontánní, UV, chemická mutageneze)
 - Nevýhoda vzniku mnohonásobných mutací, možnost reverze
 - Nezbytný přenos do geneticky „čistého prostředí“ (nemutovaný kmen - transformace, transdukce)
- Inserční mutace (transposony)
 - záleží na typu organismu, vyvinuto mnoho rekombinantních transposonů i vektorů
 - Jednoduché mutace, nerevertují
 - Špatně se přenášejí, špatně komplementují
- Cílené (pokud je známá sekvence) –
 - techniky na vrácení mutace do chromosomu
- Násobné
 - Přenos z jednoduchých mutant nástroji horizontálního přenosu (transformace, konjugace, transdukce)

Auxotrofní mutanty - Aminokyseliny

Příklad: příprava auxotrofů u *Salmonella thiphimurium*

- Doprava na upraveném P22 (Kleckner et al. 1975)
 - Tn10(Te^{TR}) a mutace, která blokuje replikaci fága (12⁻), integraci (int⁻), lysi (13⁻), represi (c2^{ts})
 - Mutace zabraňující předání Tet^R na recipienta ve formě plasmidu nebo lysogena. –
 - možno selektovat na tetracyklin
 - vždy jenom inserce transposonu.
- Selekcce na tetracyklin na bohatém mediu –
 - všechny mutanty s insercí transposonu –
 - výsevy tak aby bylo 100-200 kolonií na plotnu (multiplicita infekce > 1, pravděpodobnost transpozice 1/10⁵ infikovaných buněk).
 - Pěstovat při 40 °C, restrikce replikace fága.
- Přerazítkování na minimální medium s Tet –
 - porovnáním zjistit auxotrofy. Přeočkovat z LB media na selektivní medium (green) rozlišující lysogeny , infikované buňky a buňky bez fága (Alizarinová žluť a anilinová modř).
- Klony sensitivní k fágovy (nelysogeny) podrobit selekci na žádanou aminokyselinu
 - (11 diagnostických ploten) a LB zelené
- Kontrola auxotrofie – „colony purifiing“,
 - každou kolonii napěstovat v tekutém mediu a inokulovat na MM mediu s krystalkem sledované aa.

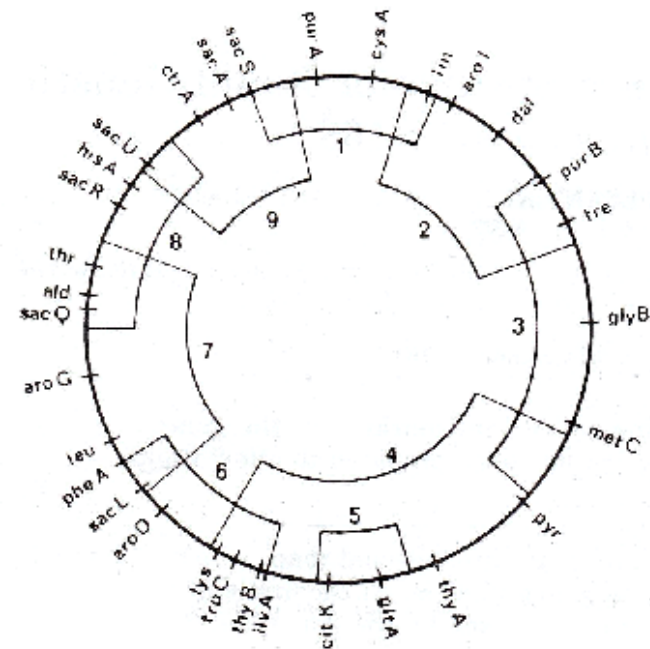
Auxotrofní mutanty - Aminokyseliny

- Složení diagnostických ploten: (Advanced Bacterial genetics, Davis R.W., Botstein D., Roth J.R., pp. 209-211), Cold Spring Harbor, New York 1980)
- Každý nutriční přídavek je obsažen ve dvou mediích
- Konkrétní auxotrof musí růst na dvou médiích
- Společné biosynthetické dráhy
- Některé purinové mutanty rostou na adenosinu nebo guanosinu (1,2,6)
- Některé purinové mutanty rostou na adenosinu + thiaminu (pouze 6)
- Mutanty s mutací na začátku aromatické dráhy porostou pouze na 8
- Mutanty s blokováním na začátku lysinové dráhy porostou pouze na 4
- Plotny 11 jsou pouze pro vitaminy, požadují další selekci na jednotlivé součásti

	1	2	3	4	5
6	adenosin	guanosin	cystein	methionin	thiamin
7	histidine	leucin	isoleucin	lysin	valin
8	fenylalanin	tyrosin	tryptofan	threonin	prolin
9	glutamin	asparigin	uracil	asparagová kys.	arginin
10	thymin	serin	glutamová kys.	DAP	glycin
11	pyridoxin, nicotinová kyselina, biotin, panthothenat, alanin				

Kit pro genetické mapování

- *Bacillus subtilis* v roce 1977
- pro rychlé mapování nových mutací
- American Society of Microbiology
Appl. Environ. Microbiol. 33, 989
- základní principy
 - redukovat počet markerů na kmen na minimum - redukovat vedlejší účinky (kompetence, motilita, sporulace)
 - zachování překryvu v transdukčních experimentech pomocí fága (PBS1)
 - snadno selektovatelné markery s preferencí auxotrofií



Kit 6: příprava kmenu QB935 (*aroD lys1 trpC*)

QB15(*sacA*) $\text{tf} \rightarrow$ GSY254(*lys1 trpC2*) \rightarrow B122(*sacA78 lys1*)

SB120(*aroD trpC*) $\text{tf} \rightarrow$ QB103 (*sacA hisA trpC*) \rightarrow QB929 (*aroD hisA trpC*)

QB122 $\text{tf} \rightarrow$ QB929 \rightarrow QB935

Supresorové mutace mutace

□ **Intragenová suprese.**

Supresorová mutace ve stejném genu

- Změna další aminokyseliny, která obnoví funkci proteinu
- U mutace v čtecím rámci, kdy následná mutace obnovuje čtecí rámec

□ **Intergenová suprese:**

Změny v jiném genu, které navozují zpět funkci původního mutovaného genu

■ přímá:

- Je pozměněna jiná enzymová aktivita, která ruší či doplňuje původní
- Je pozměněna struktura dalšího proteinu v komplexu a dojde k obnovení interakce a funkce.

■ nepřímá:

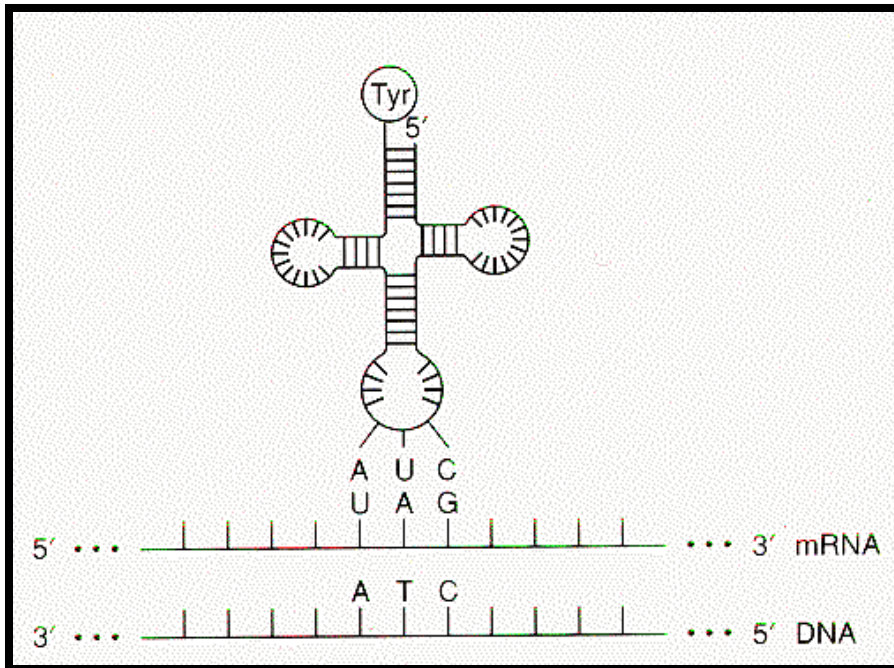
- mutace v t-RNA genech, při kterých dochází ke změně čtení kodonu
Mohou obnovit čtení nonsense, missense a frameshift mutací.

Supresorové mutace

nonsense: pokud kodon pro aminokyselinu se změní na nonsense (*sup*)

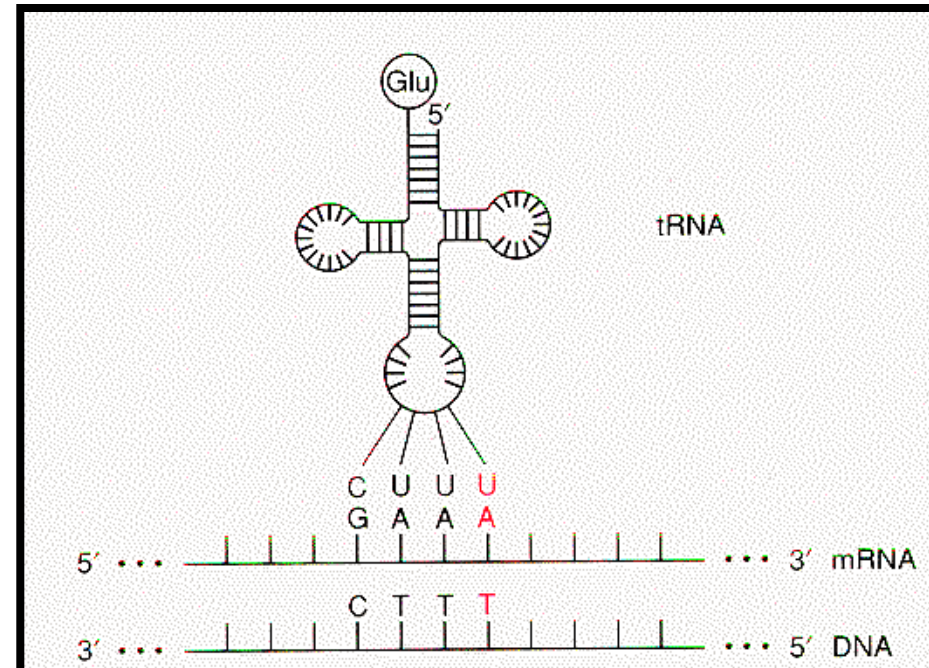
missense: mutace kodonu aminokyseliny v kodon pro jinou aminokyselinu

frameshift: adicí, či delecí v kodonu se umožní alternativní čtení čtecího rámce v místě původní mutace



Nonsense suprese:

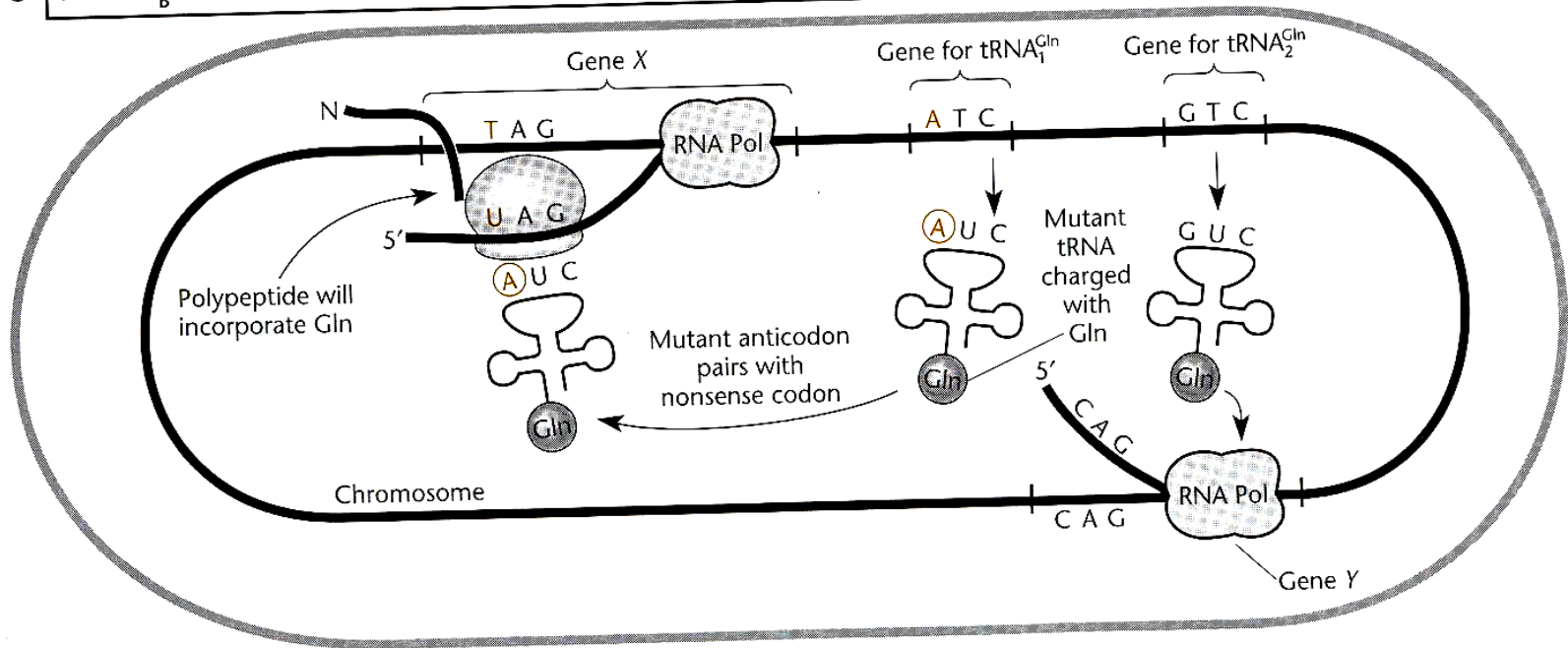
- amber mutace (UAG) je čtena jako tyrosin



Frameshift suprese: navození původního čtecího rámce je dosaženo přidáním jedné base v antikodonu.

Supresorové mutace

C Mutant_B with **nonsense mutation** in gene X and **nonsense suppressor mutation** in gene for tRNA^{Gln}₁



- ▣ dva geny pro tRNA^{Gln}, jeden majoritní nemutovaný, druhý mutovaný na supresor.
- ▣ intergenové supresorové mutanty jsou snadno detegovatelné, neboť rostou pomaleji.

Supresorové mutace – názvy supresorů

Nonsens supresory u <i>E. coli</i>			
Název supresoru	tRNA	Změna antikodonu (5-3)	Typ supresoru
<i>supE</i>	tRNA ^{Gln}	CUG - CUA	Amber
<i>supF</i>	tRNA ^{Tyr}	GUA - CUA	Amber
<i>supB</i>	tRNA ^{Gln}	UUG - UUA	Ochre/amber
<i>supL</i>	tRNA ^{Lys}	UUU - UUA	Ochre/amber

Mutace v esenciálních genech.

- Mutace, která inaktivuje esenciální geny v haploidním organismu je obvykle letální.
- Tyto potenciálně letální mutace lze studovat, pokud jejich exprese je kontrolovatelná experimentálními podmínkami.
 - mutace, která zvyšuje termolabilitu produktů esenciálních genů může zamezit bakteriální růst při 42 °C, přestože při 25 °C může mutanta růst zcela normálně.
 - Teplotně závislé mutace jsou příkladem kondicionálních mutací.
 - Nonsens mutace a izolace pomocí supresoru v tRNA
 - Nonsens supresory lze detegovat pomocí vnesení alely supresorového genu např. pomocí fága Φ80 se mohou přenést do mutantního kmene supresorové alely supF a supC.
 - Jestliže se kolonie mutantů přerazítkují na selektivní půdu pokrytou suspenzí tohoto fága, vyrostou na této půdě nové kolonie jen z těch kolonií přenesených razítkem, které jsou tvořeny buňkami sus.
- Kondicionálně letální fenotyp indikuje, že mutované geny jsou esenciální pro růst.

Komplementace
