

Августовская школа олимпиадной подготовки.
Новосибирск. 20-30 августа 2018

Генетика. 11 кл.

Генетика микроорганизмов

Бактерии

Волошина Марина Александровна
СУНЦ НГУ

Генетика бактерий

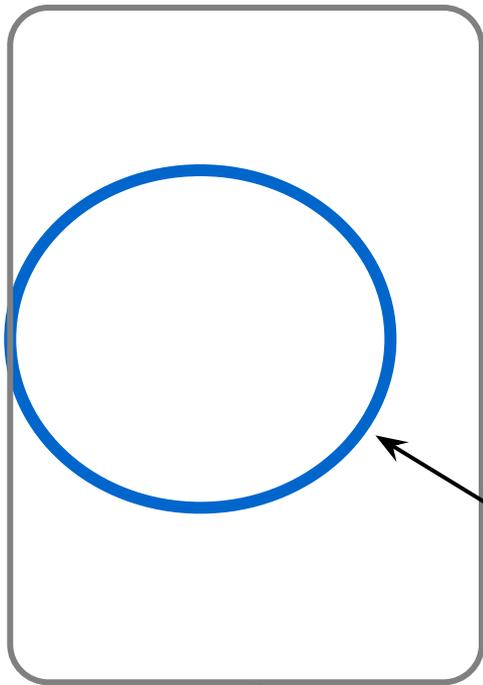
Бактерии – прокариоты



Гаплоидны



Все гены по одному
(один аллель у особи)



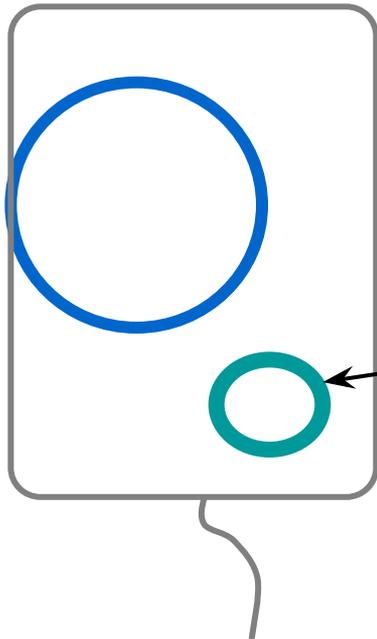
ОДНА кольцевая ДНК

Бактерии – прокариоты



У них нет полового размножения

Но **обмен генетической информацией** есть –
половой процесс

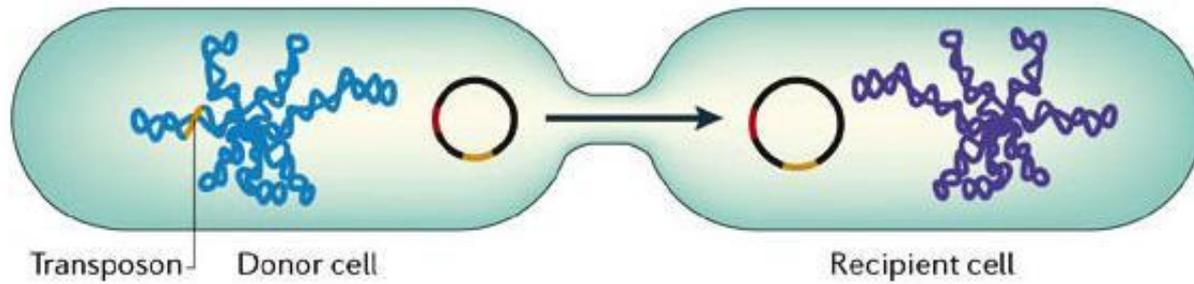


Плазмида – маленькая кольцевая ДНК для обмена

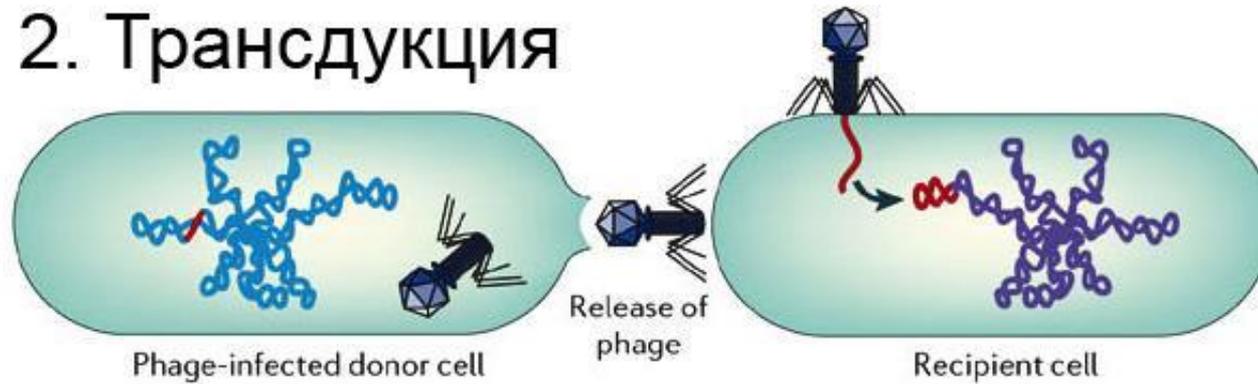
Способы обмена генетической информацией у бактерий

- 1. Конъюгация** – через **пили**
- 2. Трансдукция** – перенос **вирусами**
- 3. Трансформация** – поглощение **чужеродной ДНК**

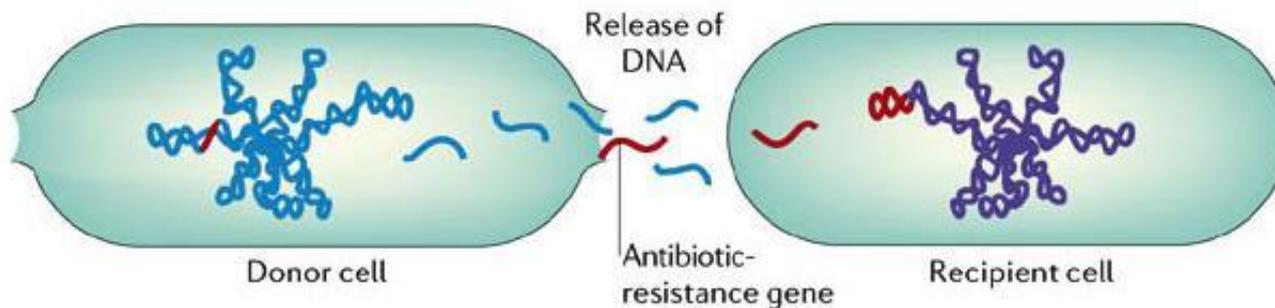
1. Конъюгация



2. Трансдукция



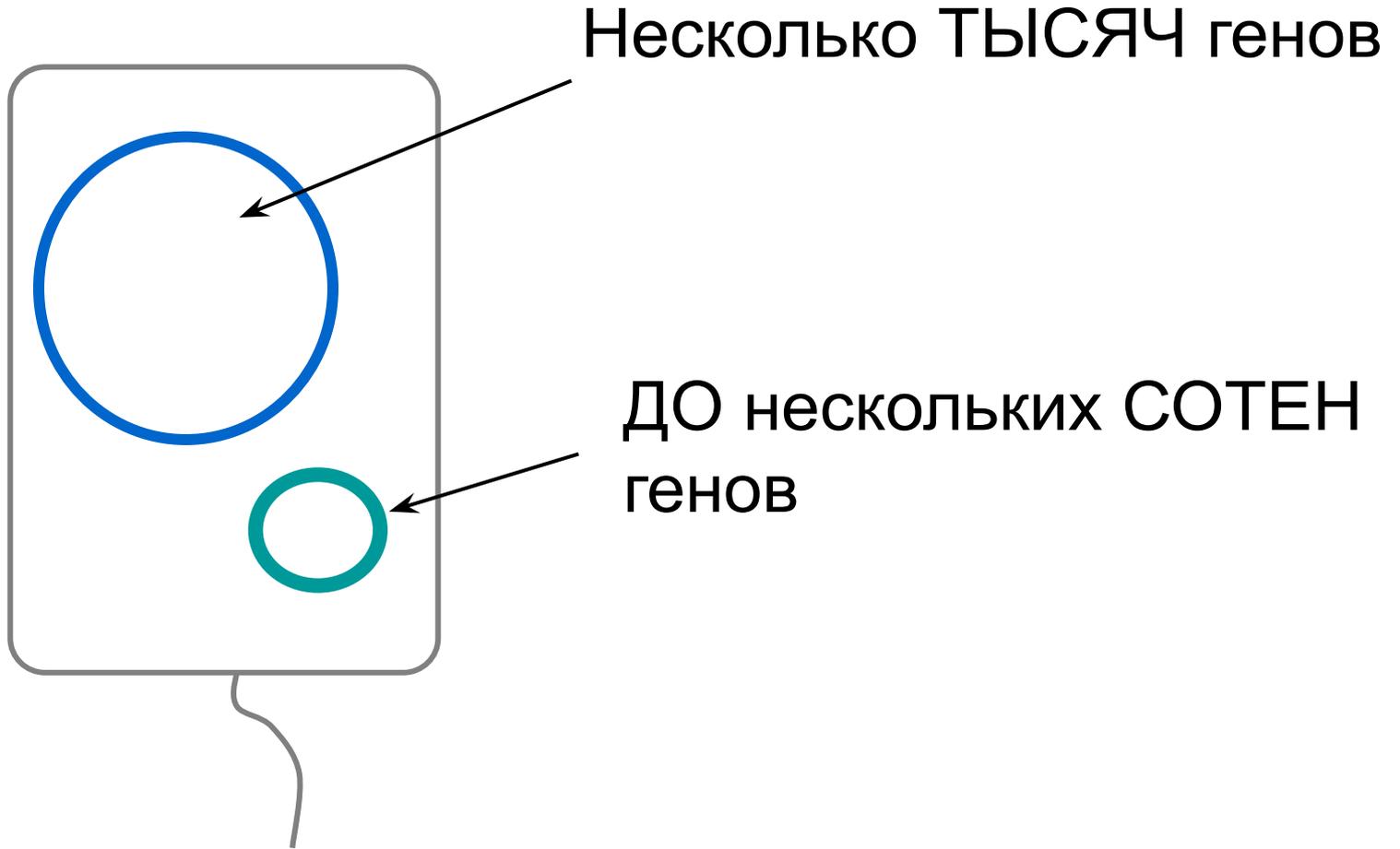
3. Трансформация



Особенности бактерий

- Гаплоидны
- Геном – кольцевой
- Признаки – **биохимические** (рост на определенных средах)
- При конъюгации возникает **частичная и временная диплоидность**

Размер генома бактерий



Особенности признаков бактерий

- Мутации нарушают способность синтезировать какое-либо вещество
- Поэтому **признак** – это способность расти на среде без определенного вещества
- Или, наоборот, с антибиотиком, подавляющим рост дикого типа

селективная среда

Прототроф (дикий тип) – растет на **минимальной** среде (сахар + набор микроэлементов в виде солей)

Ауксотроф (требующий дополнительного питания) – не может расти без какого-то вещества (мутант по одному из генов его синтеза).

Обычно это азотистые основания и аминокислоты.

Растет на полной среде или минимальной, в которую добавлено это вещество.

Символика

ФЕНОТИПЫ

Met⁻ Thi⁻ Pur⁻ – мутанты (ауксотрофы), нуждающиеся в метионине, тимине, пурине

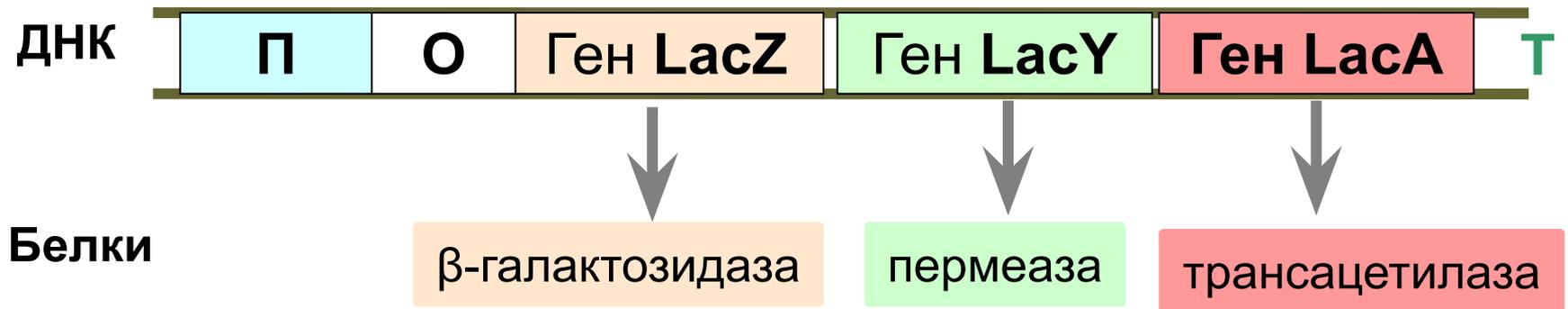
Met⁺ Thi⁺ Pur⁺ – дикий тип (прототрофы)

ГЕНОТИПЫ

met A met B – мутанты разных генов (неаллельных), необходимых для синтеза метионина. Каждый имеет фенотип **Met⁻**

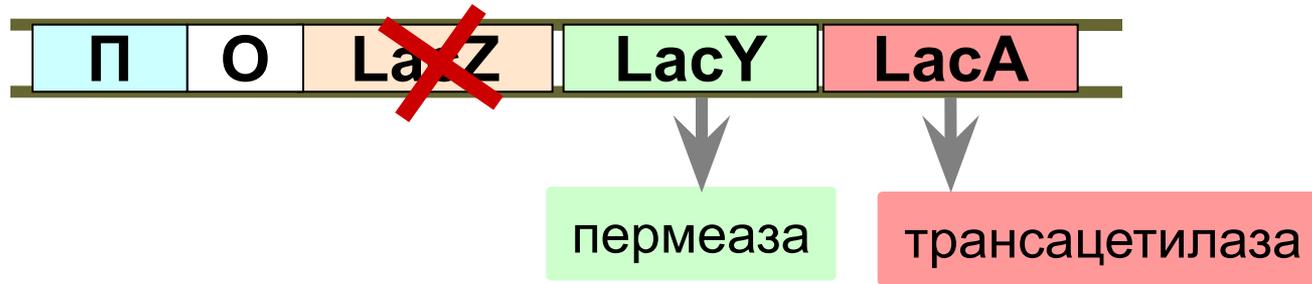
Нормальные аллели – ***met A⁺ met B⁺***

Пример: *Lac*-оперон

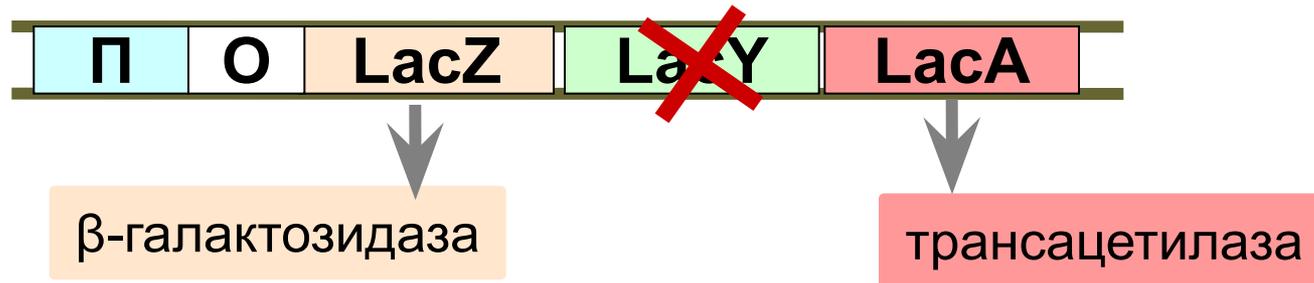


Все три мутанта – фенотип Lac^-

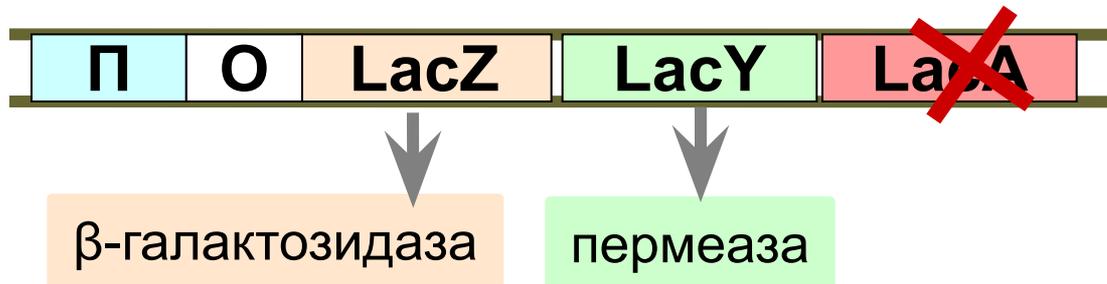
1



2



3



Среды

Минимальная

Состав: сахар + микроэлементы

Чтобы расти на ней организм должен использовать весь свой метаболизм.

Поэтому растут только **прототрофы**
(дикий тип)

Примечание

Минимальная среда может быть разной для разных видов.

Например, среда без источников азота позволила выявить **азотфиксирующие** бактерии. *(Виноградский, 1893)*

Автотрофные виды могут расти на среде без органического углерода.

Полная

Состав: содержит органический экстракт

Растут **ВСЕ**, в том числе и самые разные **ауксотрофы**.

Полная среда позволяет сохранить мутантов, о которых еще неизвестно, по какому веществу они ауксотрофны.

Селективные среды

Минимальная + вещество X – растет
дикий тип и **мутанты X⁻**

Мутанты по другим генам биосинтеза НЕ растут.

С добавлением антибиотика – растут
только **мутанты** с аллелем **устойчивости**
к этому антибиотику.

Дикий тип НЕ растет.

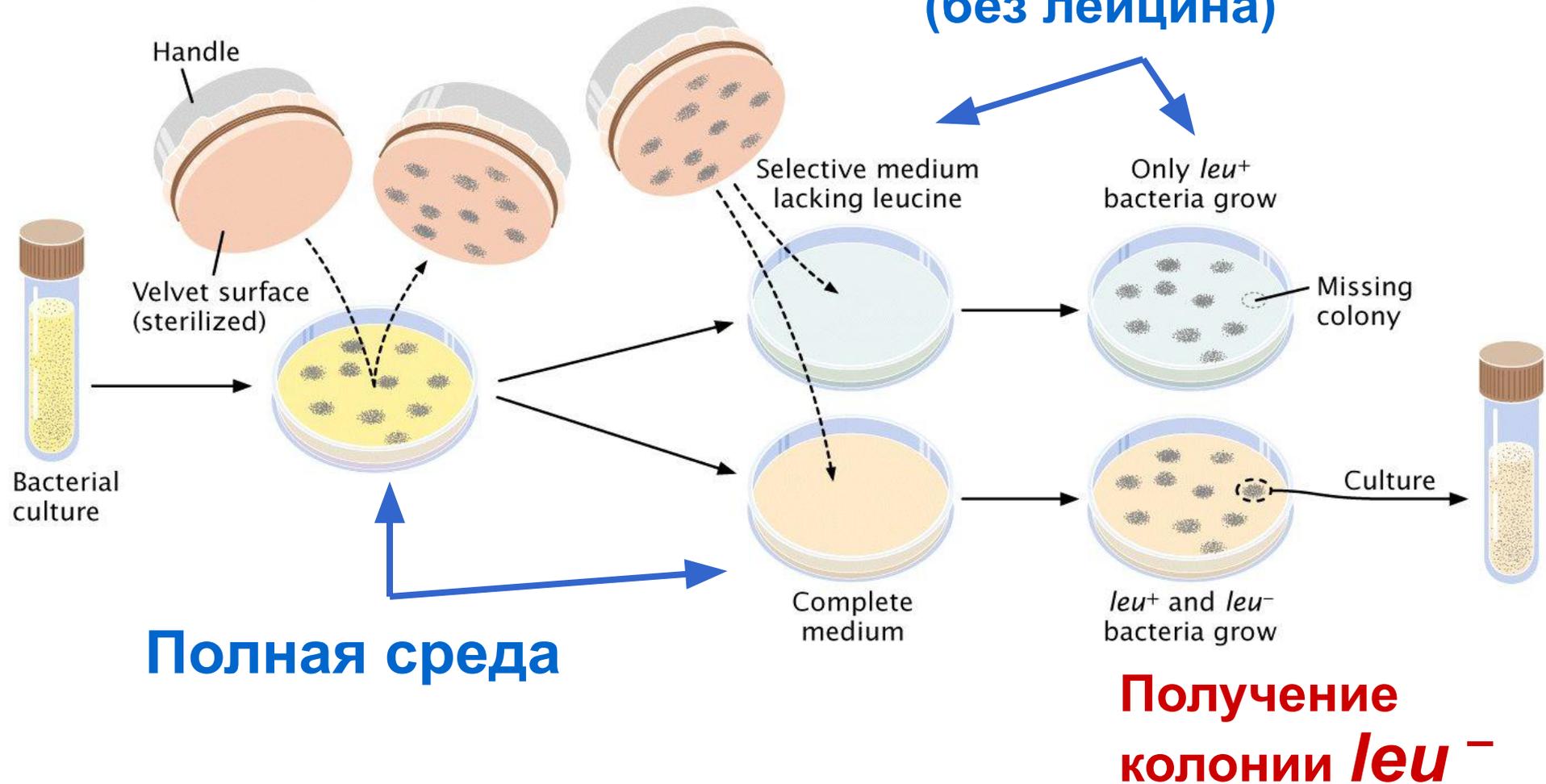
Мутанты по генам устойчивости к антибиотикам

Str^R – **Resistant**, устойчив к
стрептомицину (мутант)

Str^S – **Sensitive**, погибает на среде со
стрептомицином (**ДИКИЙ ТИП**)

Метод отпечатков

Пример: поиск мутантов по биосинтезу лейцина



№ 430. Установите генотипы следующих штаммов *E.coli*.

Для обозначения генотипов используйте символы

leu⁺ – прототроф по лейцину

leu – ауксотроф по лейцину

thr⁺ – прототроф по треонину

thr – ауксотроф по треонину

Штамм	Минимальная среда			
	без добавок	с добавлением треонина	с добавлением лейцина	с добавлением треонина и лейцина
1	–	–	–	+
2	–	+	–	+
3	+	+	+	+
4	–	–	+	+

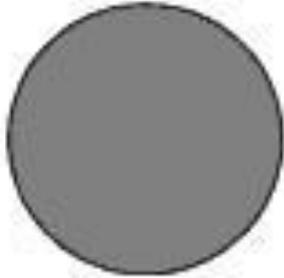
№ 430. РЕШЕНИЕ

Штамм	Минимальная среда			
	без добавок	с добавлением треонина	с добавлением лейцина	с добавлением треонина и лейцина
1	-	-	-	+
2	-	+	-	+
3	+	+	+	+
4	-	-	+	+

- 1 – нуждается в обоих веществах → *leu thr*
- 2 – нуждается в треонине → *leu⁺ thr*
- 3 – растет на миним. → дикий тип *leu⁺ thr⁺*
- 4 – нуждается в лейцине → *leu thr⁺*

Задача

Master Plate



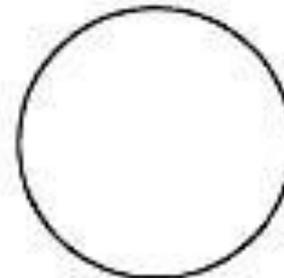
Medium contains:
arg, lys, ser

↑
10⁸ клеток
тройного
ауксотрофа
arg⁻ lys⁻ ser⁻

Replica Plates



arg & lys
(1)



arg & ser
(2)



lys & ser
(3)

Какие колонии выросли
на чашках-репликах?
(определите генотип)

Откуда они взялись?

(№ 97 Всеросс, закл 2007)

Получены три **делеционных** мутанта кишечной палочки:

мутант 1 не растет в отсутствии **лизина** и **метионина**,
мутант 2 – в отсутствии **лейцина**, **валина** и **тирозина**,
мутант 3 – **валина**, **тирозина** и **лизина**.

Наиболее вероятное расположение генов биосинтеза аминокислот на бактериальной хромосоме:

- а) лизин – метионин – лейцин – валин – тирозин
- б) метионин – лизин – валин – лейцин – тирозин
- в) лейцин – тирозин – валин – лизин – метионин
- г) лейцин – валин – тирозин – метионин – лейцин

(№ 97 Всеросс, закл 2007) РЕШЕНИЕ

Ауксотрофность:

мутант 1 – лизин, метионин

мутант 2 – лейцин, валин, тирозин

мутант 3 – валин, тирозин, лизин

м.1 и **м.2** – затронуты совершенно разные гены (наборы не перекрываются). У **м.3** с первым перекрывается **ЛИЗИН**, а со вторым – **ВАЛИН** и **ТИРОЗИН**.

Значит эти три гена (затронутые у третьего мутанта) находятся **между** другими генами первого и второго.

Ищем такой порядок, где в центре подряд идут (в любом порядке) все гены третьего мутанта (**ТИРОЗИН, ВАЛИН, ЛИЗИН**) – это вариант В.

Построение генетических карт бактерий



Как строят генетические карты у диплоидных организмов?

Способы обмена генетической информацией

- Конъюгация (плазмиды)
- Трансдукция (вирусы)
- Трансформация (ДНК)

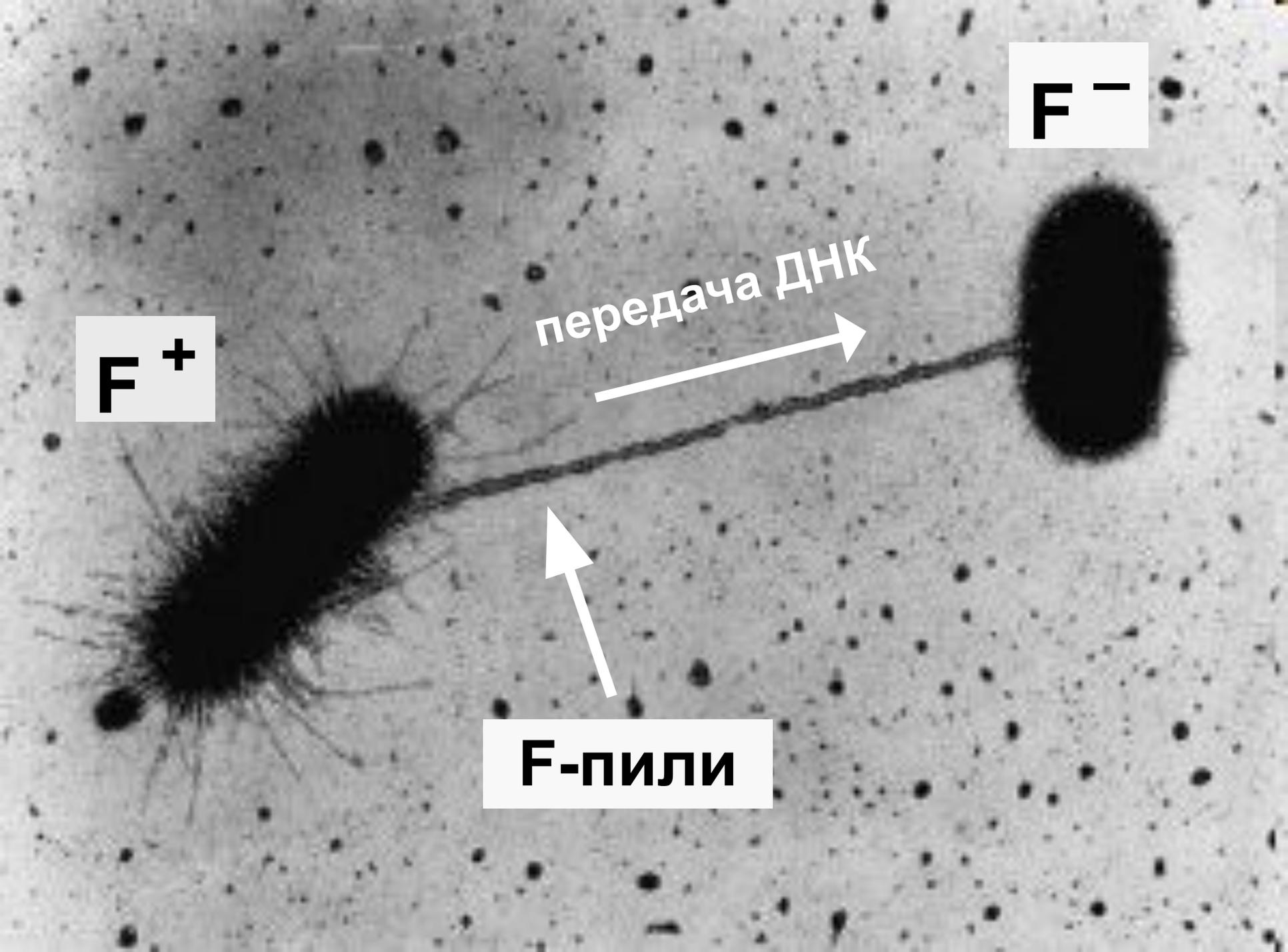
Конъюгация

F⁻

передача ДНК

F⁺

F-пили



История открытия и изучения конъюгации

A
met⁻ *bio*⁻ *thr*⁺ *leu*⁺ *thi*⁺

Mixture

B
met⁺ *bio*⁺ *thr*⁻ *leu*⁻ *thi*⁻

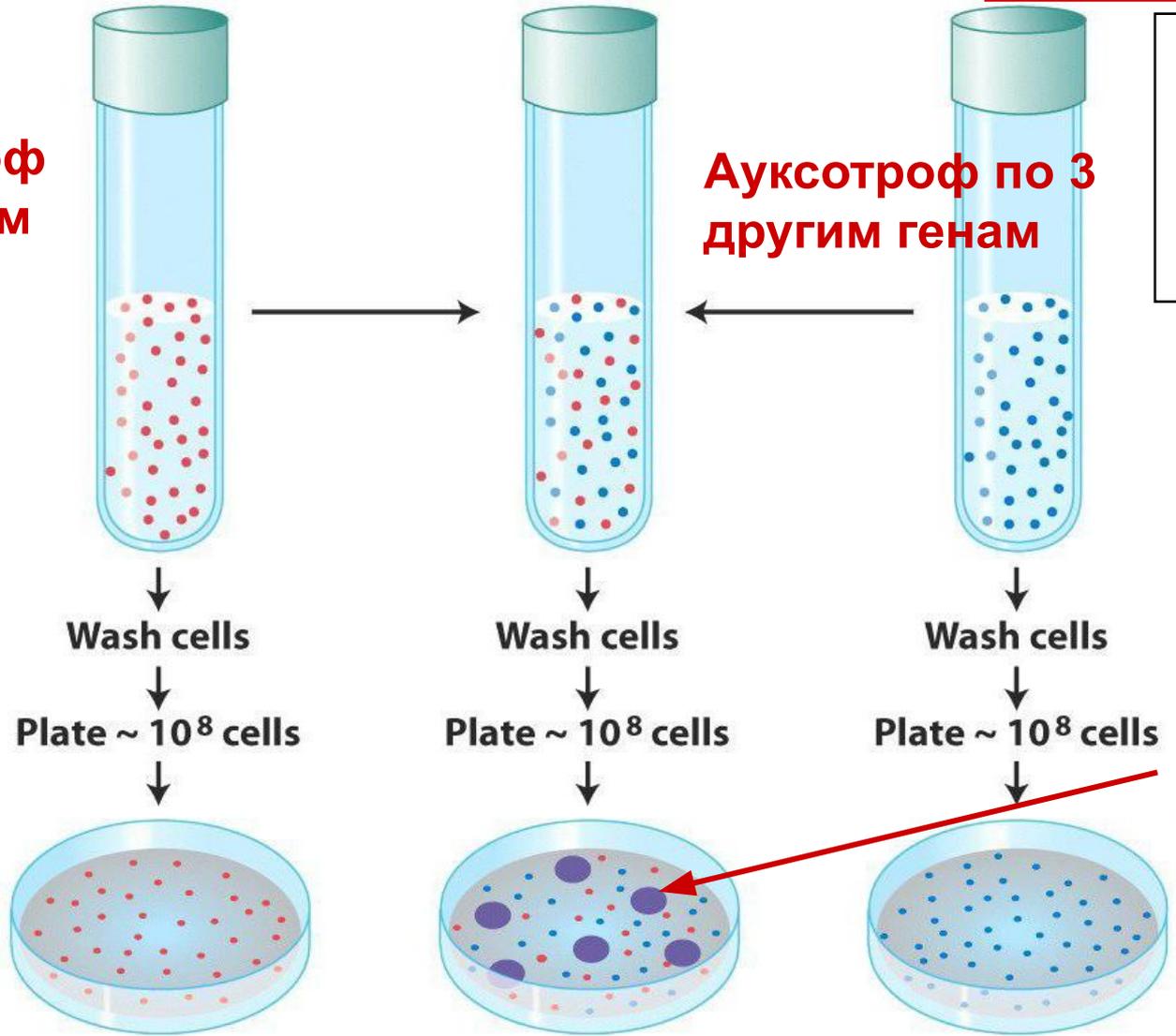
Ауксотроф
по 2 генам

Ауксотроф по 3
другим генам

Ледерберг
и Тэтум
1946

Полная
среда

Обнаружен
сам факт
передачи
генов



Мини-
мальная
среда

В смеси
появляются
прототрофы

MM
No colonies

MM
met⁺ *bio*⁺ *thr*⁺ *leu*⁺ *thi*⁺
Prototrophic colonies

MM
No colonies

Хэйс
1953

Открытие «пола» у бактерий

Штаммы неодинаковы.

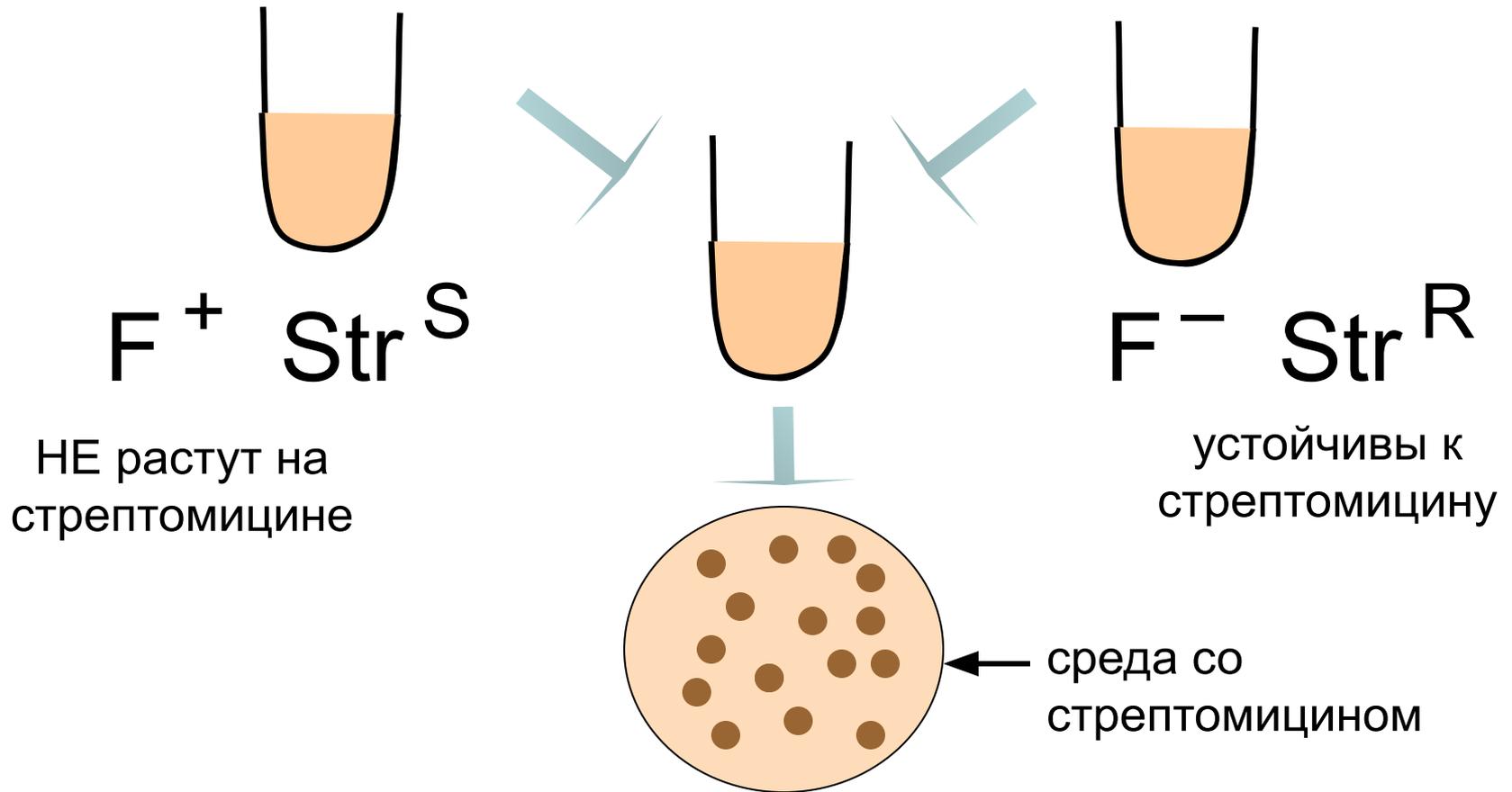
Одни передают гены, другие – принимают

Способность к передаче названа

F-фактор – Fertility Factor

А клетки, имеющие его – F^+

F фактор оказался **инфекционен!**

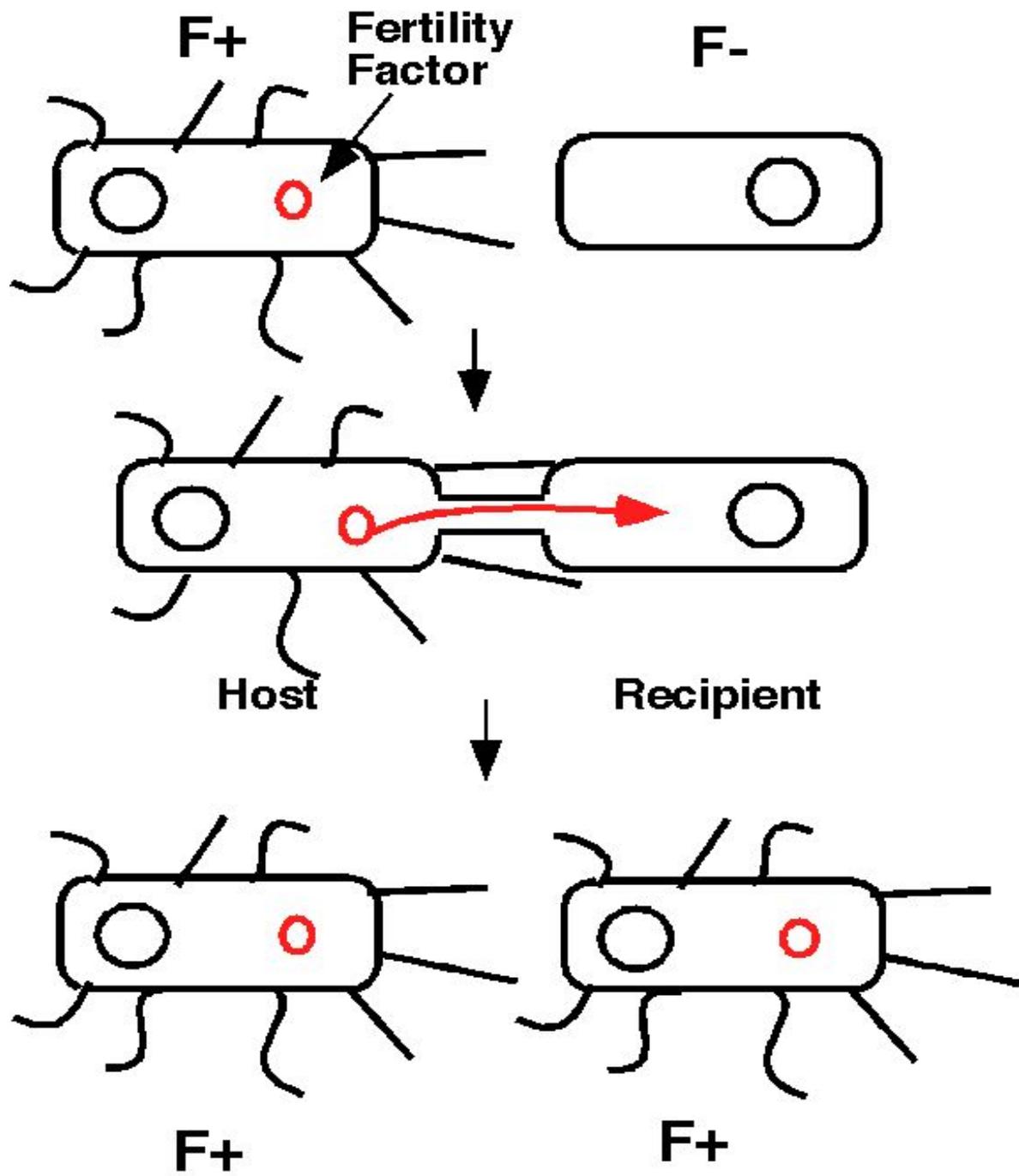


Много колоний и почти все – F^+

Что такое F-фактор

Плаزمида – кольцевая ДНК, около 100 тыс. н.п. (10^5)

Содержит группу генов **tra** (от transfer – передача), куда входят:
белки F-пилей
репликации,
встраивания в основную хромосому



В результате контакта F^+ и F^-
все становятся F^+

Передача плазмиды происходит
одновременно с ее репликацией,
поэтому исходная клетка (донор)
свою плазмиду **не теряет**

Конъюгация между
двумя F^+ или
двумя F^- клетками
НЕВОЗМОЖНА

Рецепиент – всегда F^-

Потому что F-плазмида кодирует белки,
препятствующие присоединению чужих пилей

Разнообразие плазмид

У *E.coli* есть и другие плазмиды

По способности инициировать конъюгацию

Трансмиссивные

содержат комплекс
генов **tra**

Нетрансмиссивные

могут передаваться
пассивно,
одновременно с
F-плазмидой

Разнообразие плазмид

По набору функциональных генов

F

tra

R

resistance – уст. к антибиотикам

Col

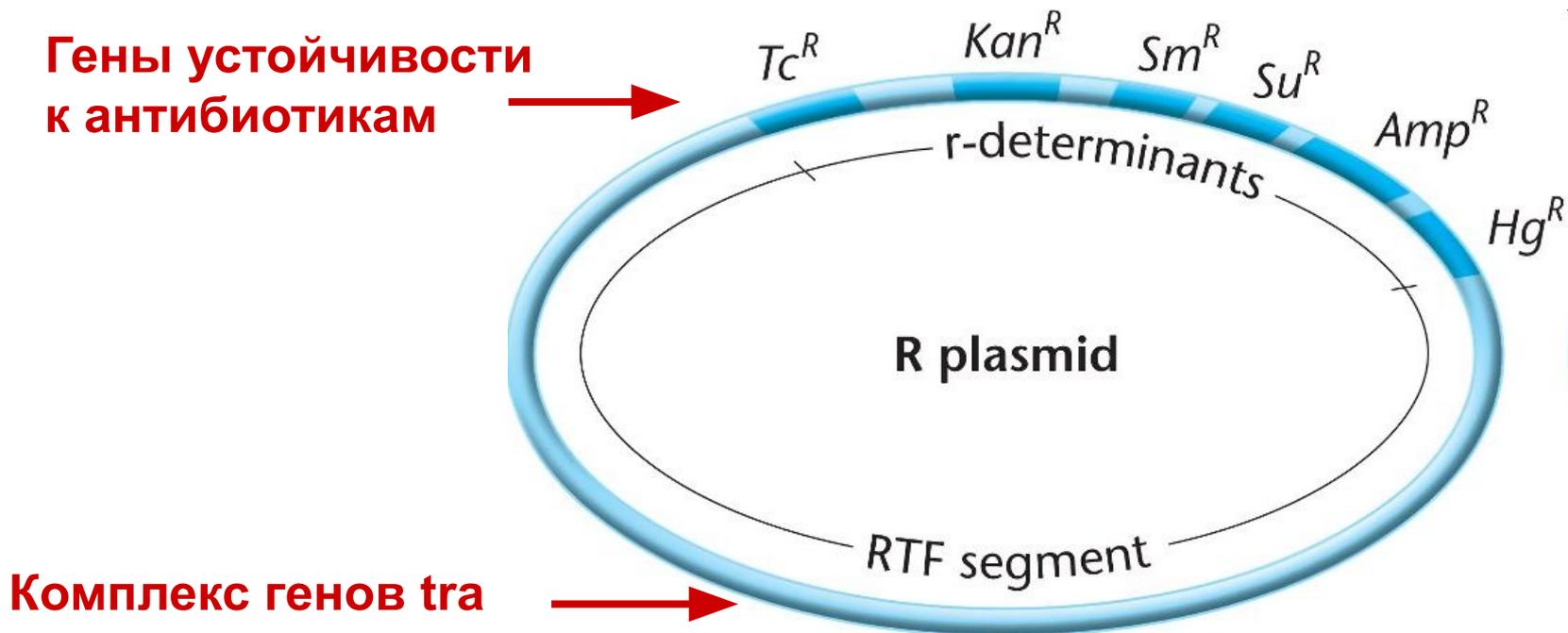
белки, убивающие других бактерий

Плазмиды биodeградации

белки,

переваривающие необычные природные и искусств. субстраты: нафталин, толуол и др.

Одна плазмида может принадлежать к нескольким функциональным группам



Стало ясно, как передается
сама F-плазмида

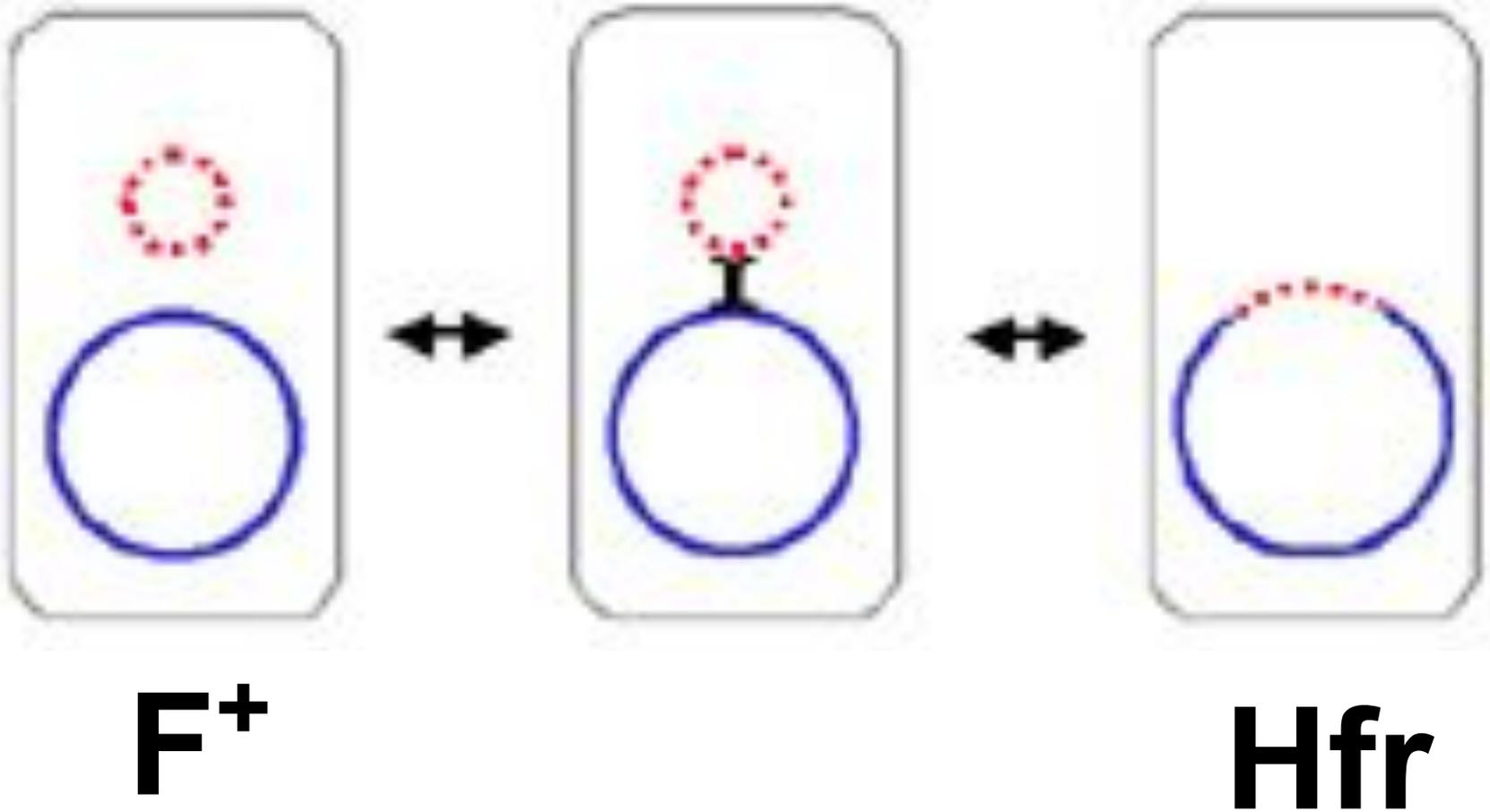
Но почему при конъюгации
передаются **гены из основной
хромосомы?**

(эксперимент Ледерберга и Тэтума)

Передача хромосомных генов

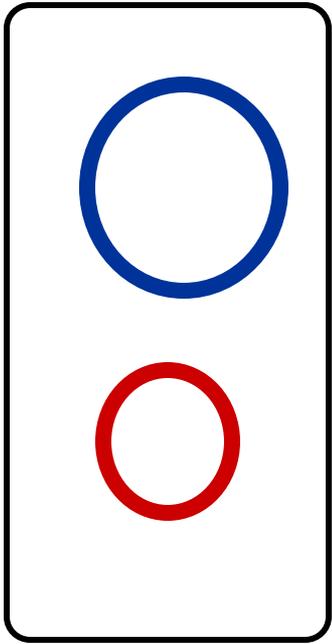
- Чтобы были переданы гены основной хромосомы, F плазмиды должна **встроиться в нее**
- Такое встраивание происходит среди **F⁺** бактерий с частотой $\sim 10^{-5}$
- Полученные клетки называются **Hfr**. Именно они передают штамму **F⁻** хромосомные гены

Образование Hfr штамма из F+

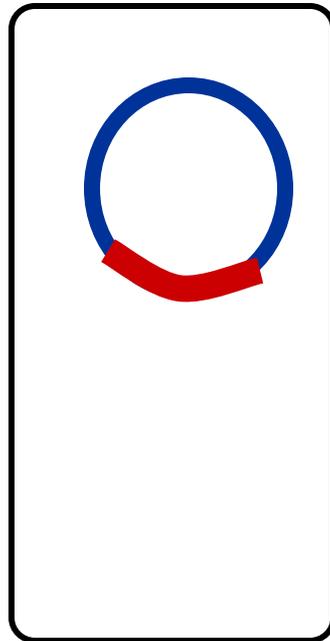


Hfr

High Frequency of Recombination



F⁺



Hfr

Передают

хромосомные гены

штамму F⁻ с частотой
примерно 10⁻²

В тысячу раз чаще,
чем обычные F⁺ клетки

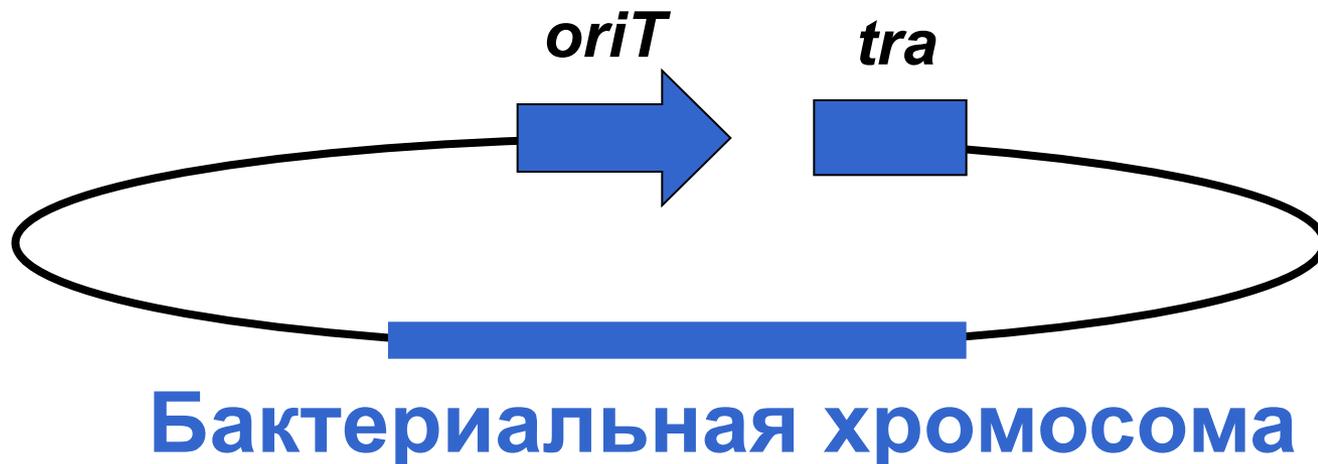
Hfr

Сам F фактор, интегрированный в хромосому, не передается (точнее, передается последним, т.е. почти никогда – конъюгация прерывается раньше)

Поэтому **Hfr** не превращает реципиента в такую же клетку, как он сам

Чем ближе ген к точке начала передачи, тем быстрее он окажется в клетках реципиента.

Точка начала передачи *oriT* находится в середине интегрированной плазмиды



Сайты встраивания. Здесь будет передаваемая хромосома бактерии

Район **tra** содержит гены, делающие клетку донором (F^+ или Hfr)

Сайт **oriT** с него начинается передача ДНК

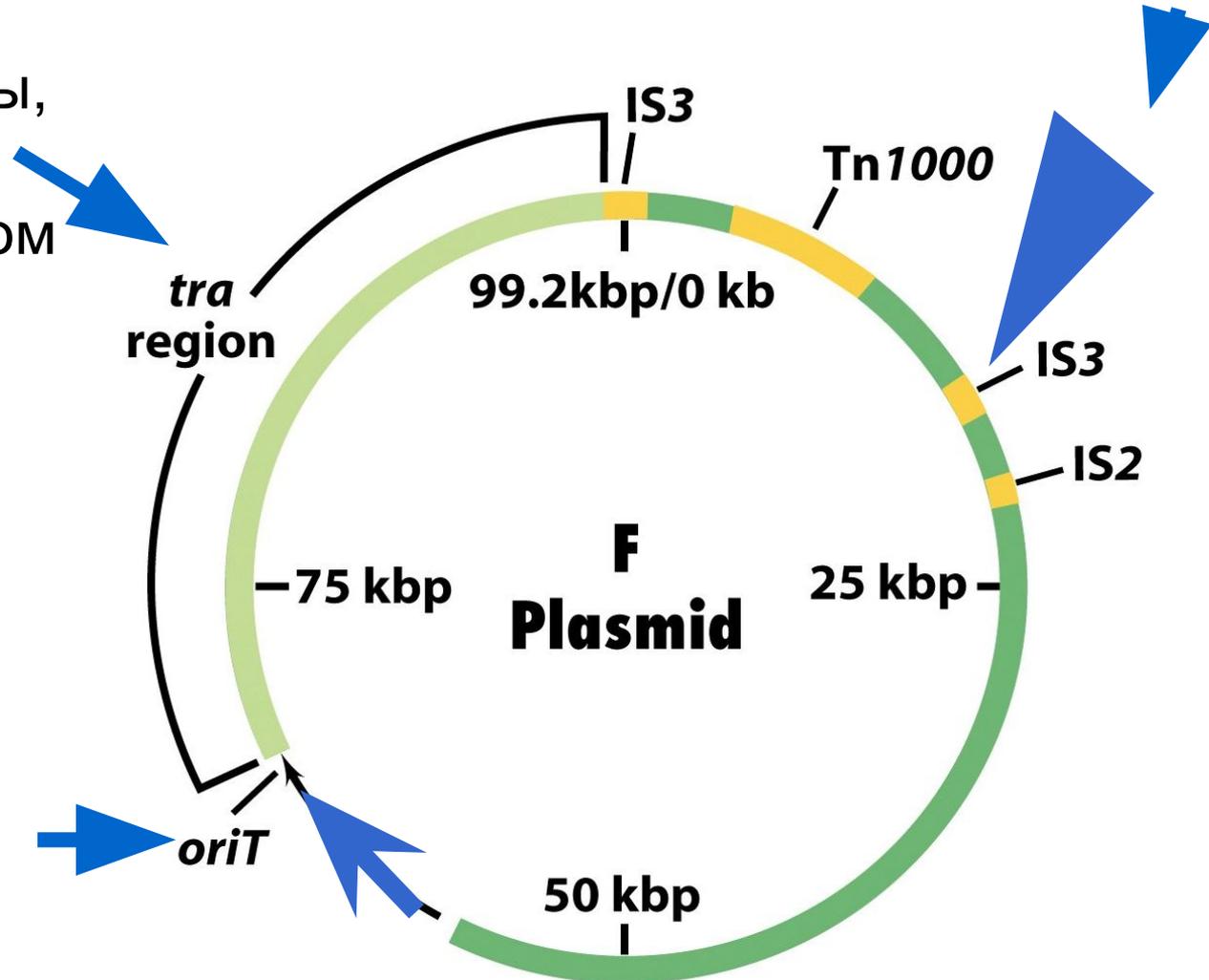
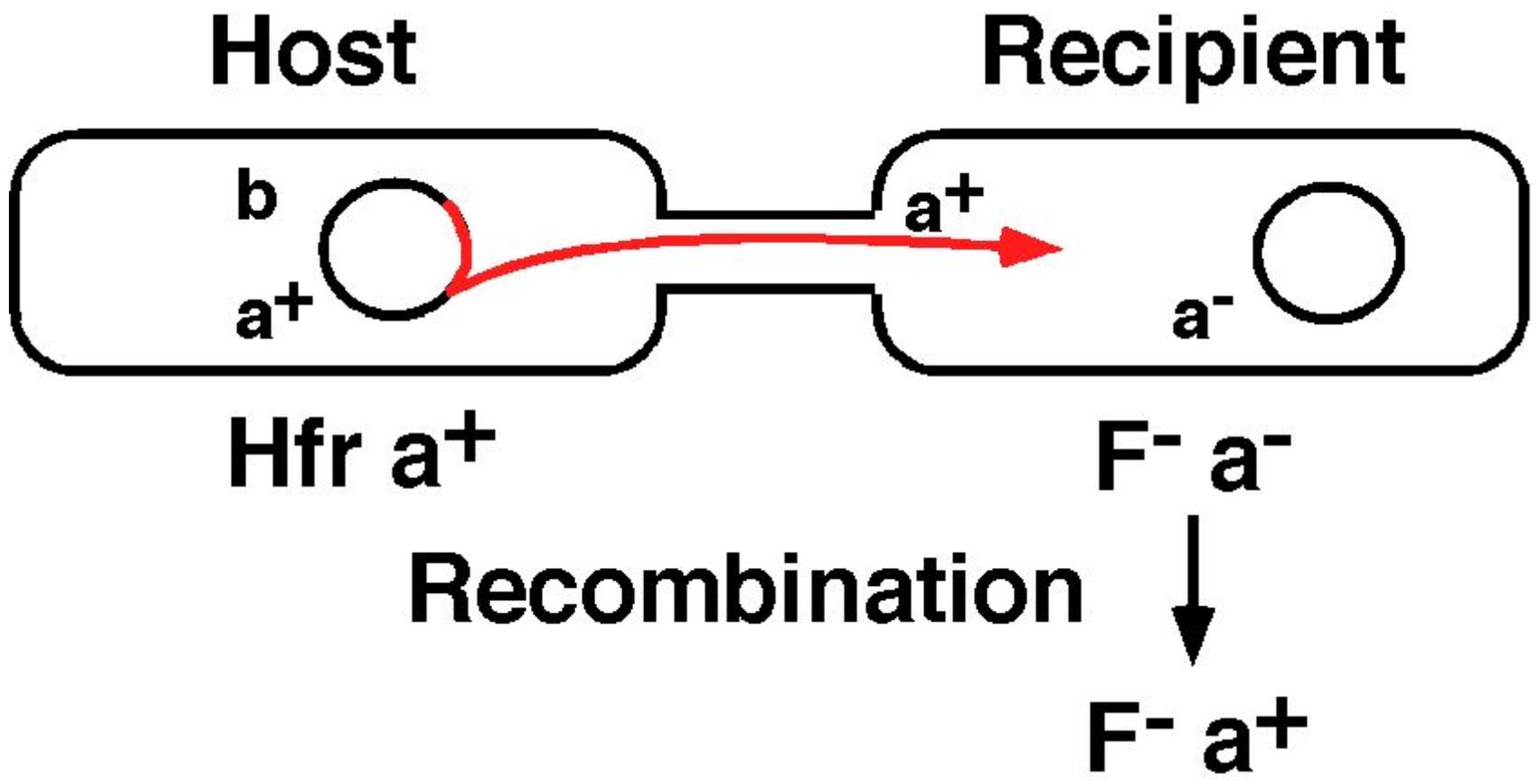
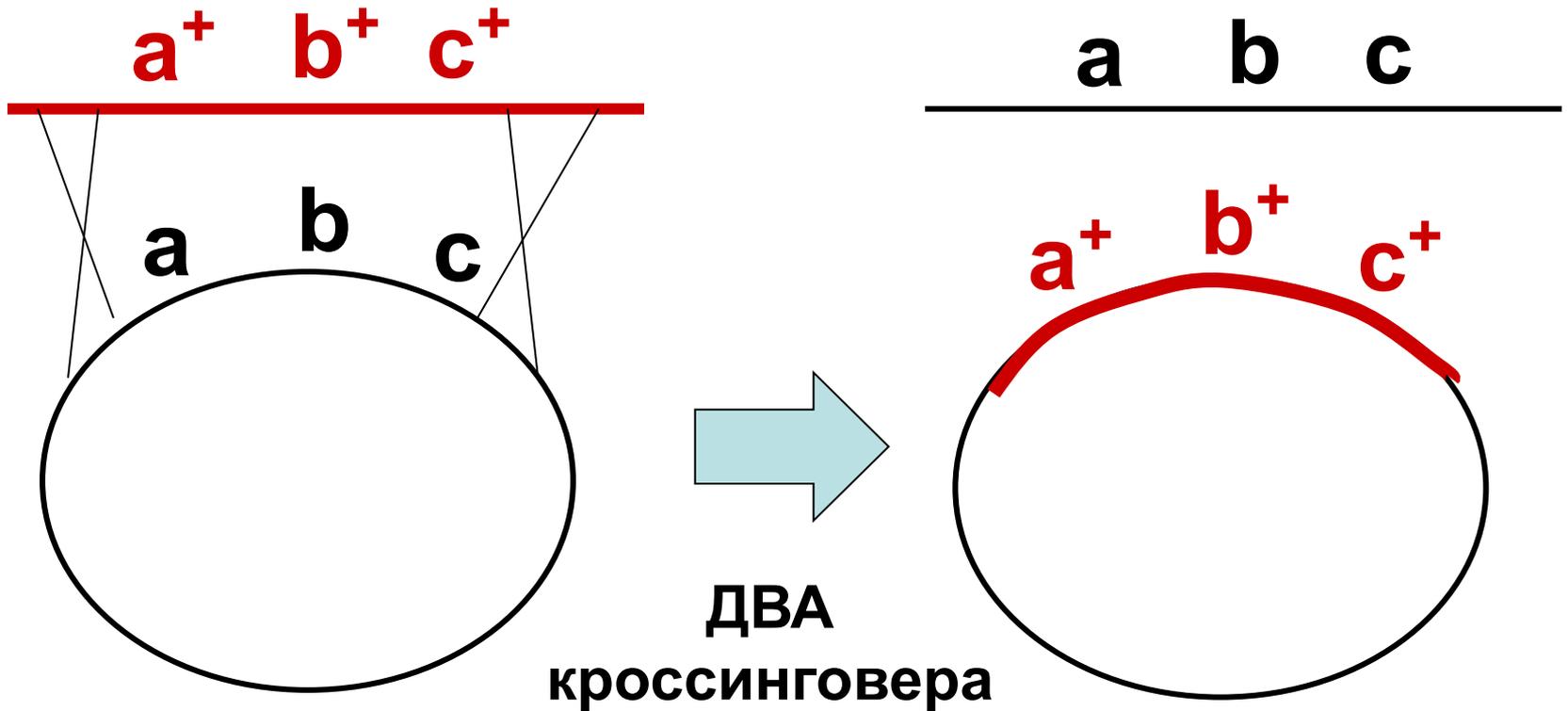


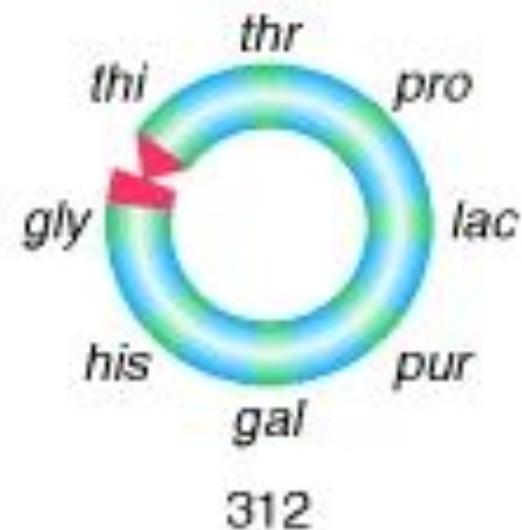
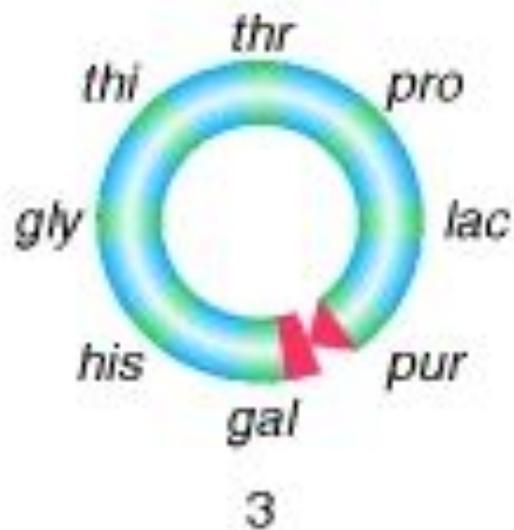
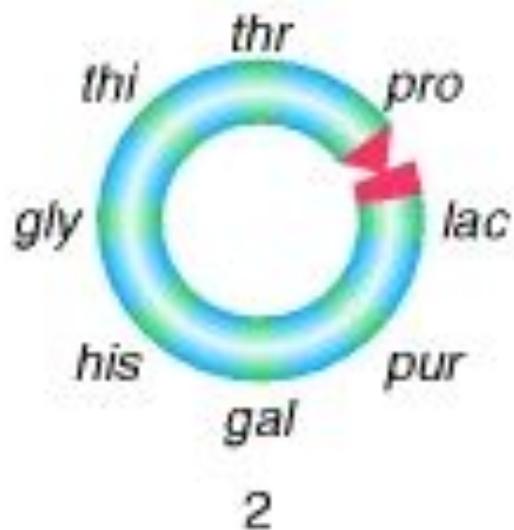
Figure 10-18 Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

Передача генов Hfr клетками



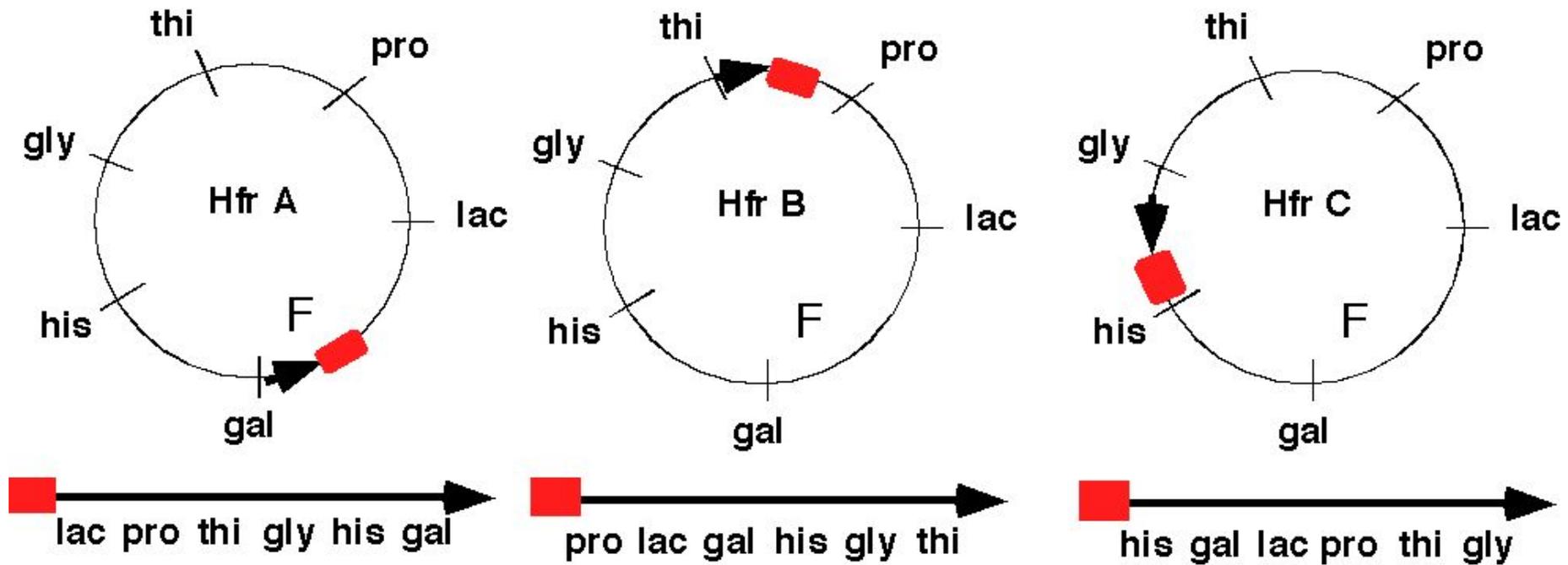
Встраивание переданных генов в хромосому реципиента





В разных Hfr штаммах F плазмиды
встроена в разные места и в разной
ориентации

Разные Hfr передают гены в разном порядке



Красным показан район генов *tra*, который передается последним – т.е. практически **никогда не передается**

Именно в экспериментах с передачей генов разными **Hfr** штаммами было впервые обнаружено, что генетическая карта *E.coli* – кольцевая

Задачи на определение
порядка генов помощью
нескольких Hfr штаммов

При конъюгации *Escherichia coli* установлены такие последовательности передачи генетических маркёров для донорных штаммов:

HfrH: *0-thr-leu-proA-purE-trp-his*

HfrC: *0-purE-proA-leu-thr-ilv-mal-rpsL*

Hfr KL19: *0-trp-his-tyrA-thy*

Hfr AB313: *0-mal-rpsL-thy-tyrA-his-trp*

Hfr PK191: *0-his-tyrA-thy-rpsL-mal-ilv*

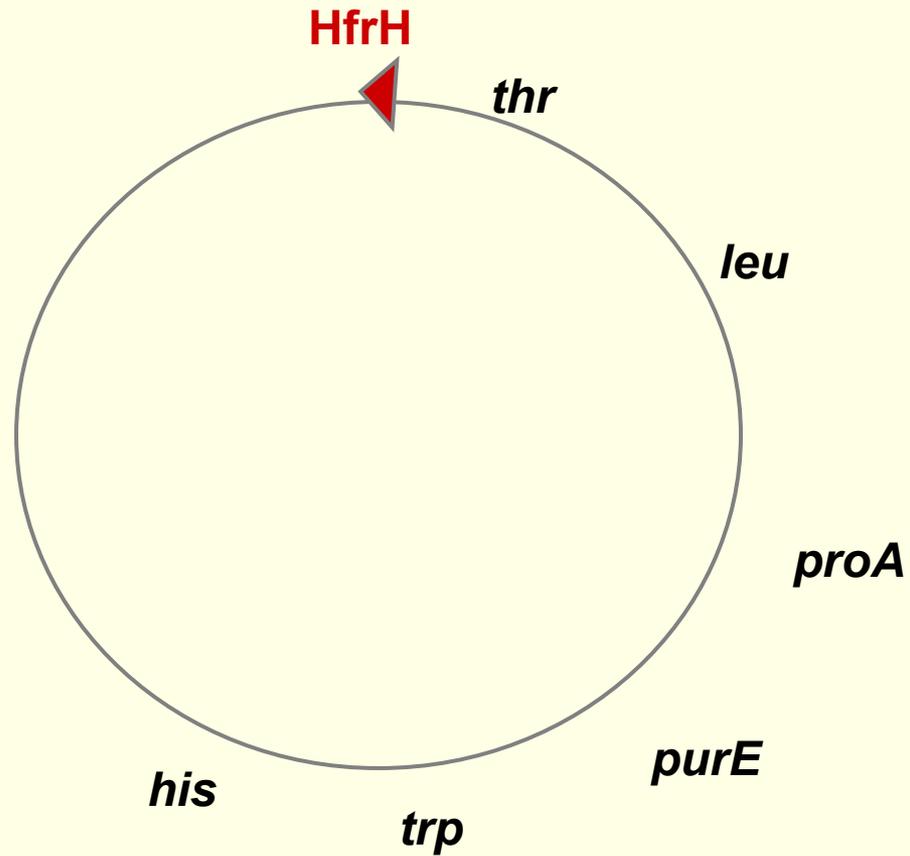
Hfr KL14: *0-rpsL-mal-ilv-thr-leu-proA*

Чем различаются данные штаммы Hfr?

Постройте генетическую карту хромосомы *E.coli*.

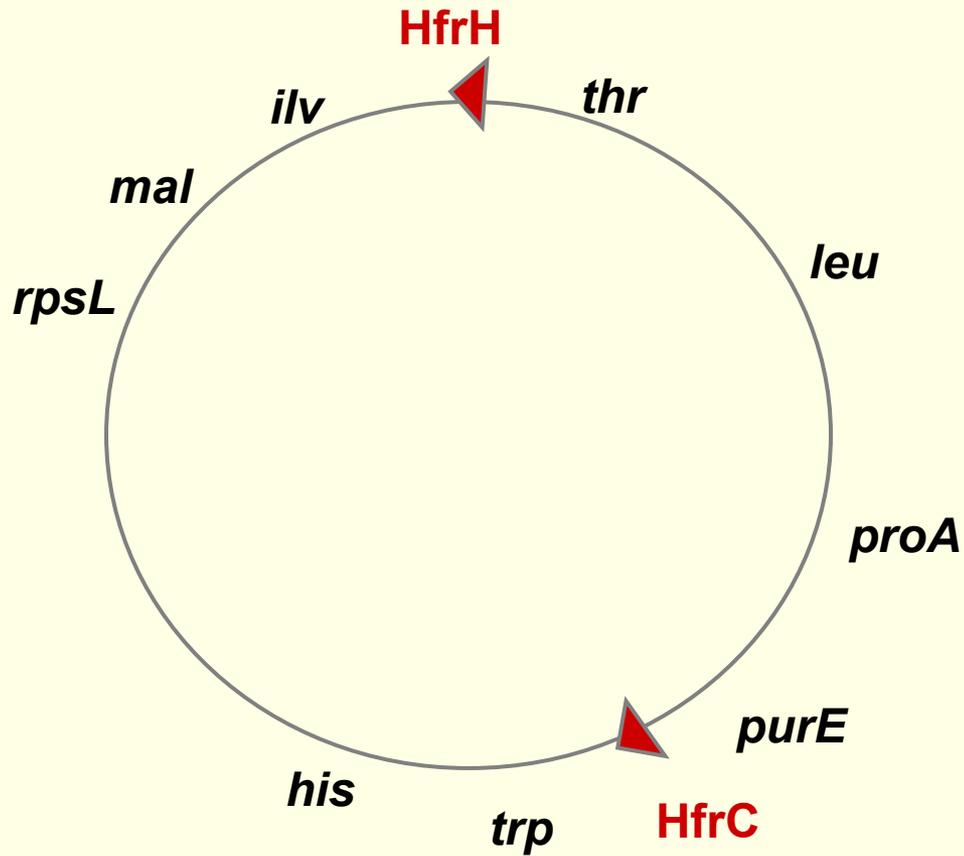
Глазер № 433 Решение

HfrH: *0-thr-leu-proA-purE-trp-his*



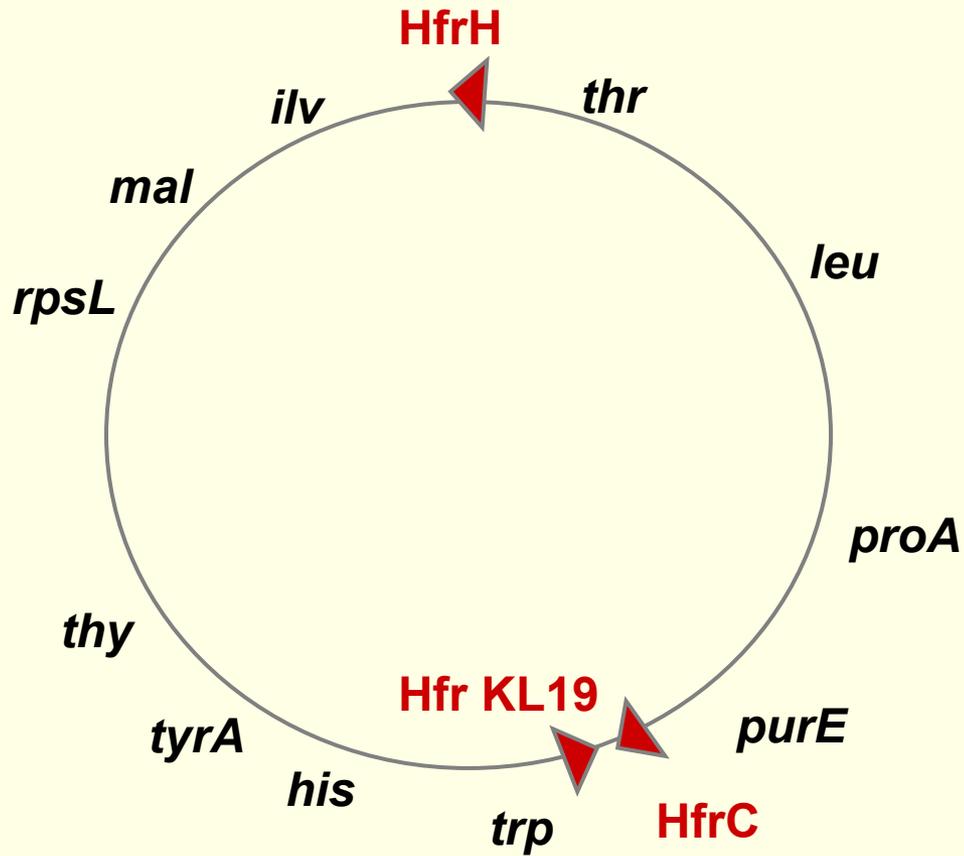
Глазер № 433 Решение

HfrC: 0-purE-proA-leu-thr-ilv-mal-rpsL



Глазер № 433 Решение

Hfr KL19: 0-trp-his-tyrA-thy

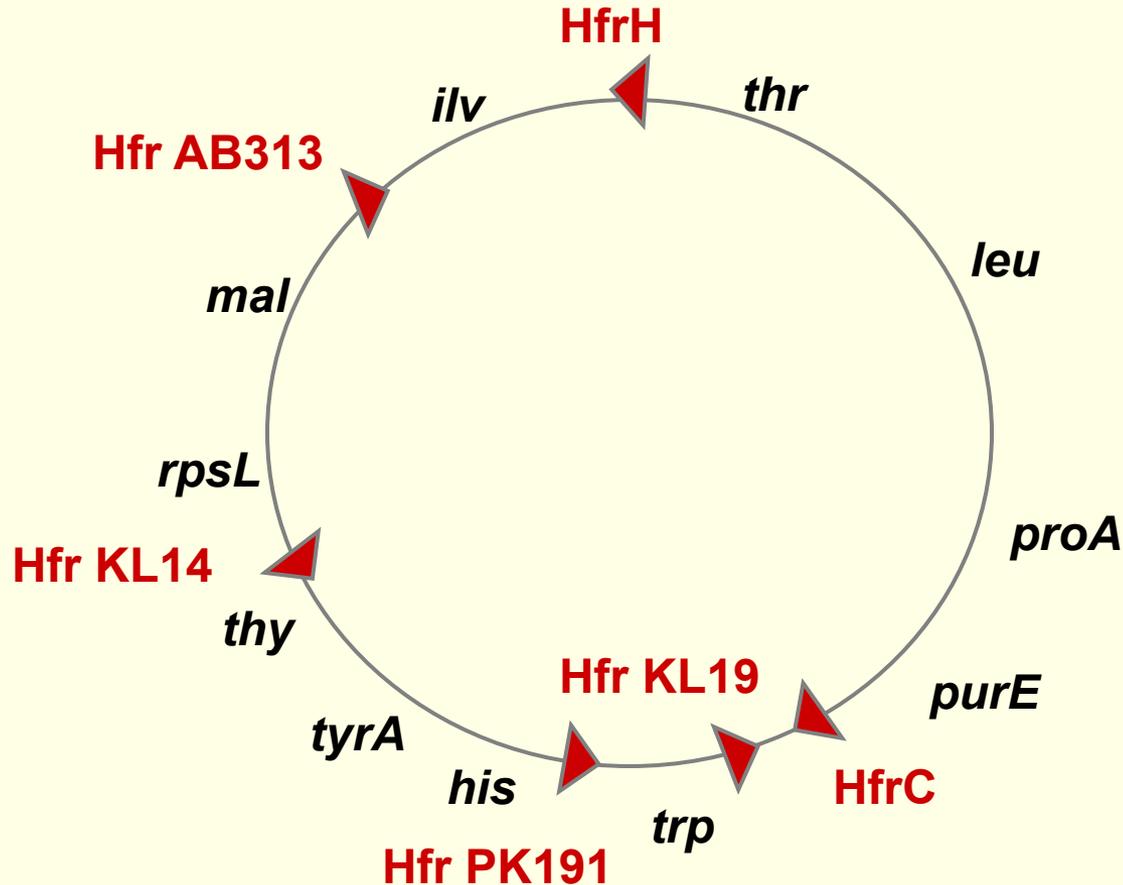


Глазер № 433 Решение

Hfr AB313: 0-mal-rpsL-thy-tyrA-his-trp

Hfr PK191: 0-his-tyrA-thy-rpsL-mal-ilv

Hfr KL14: 0-rpsL-mal-ilv-thr-leu-proA



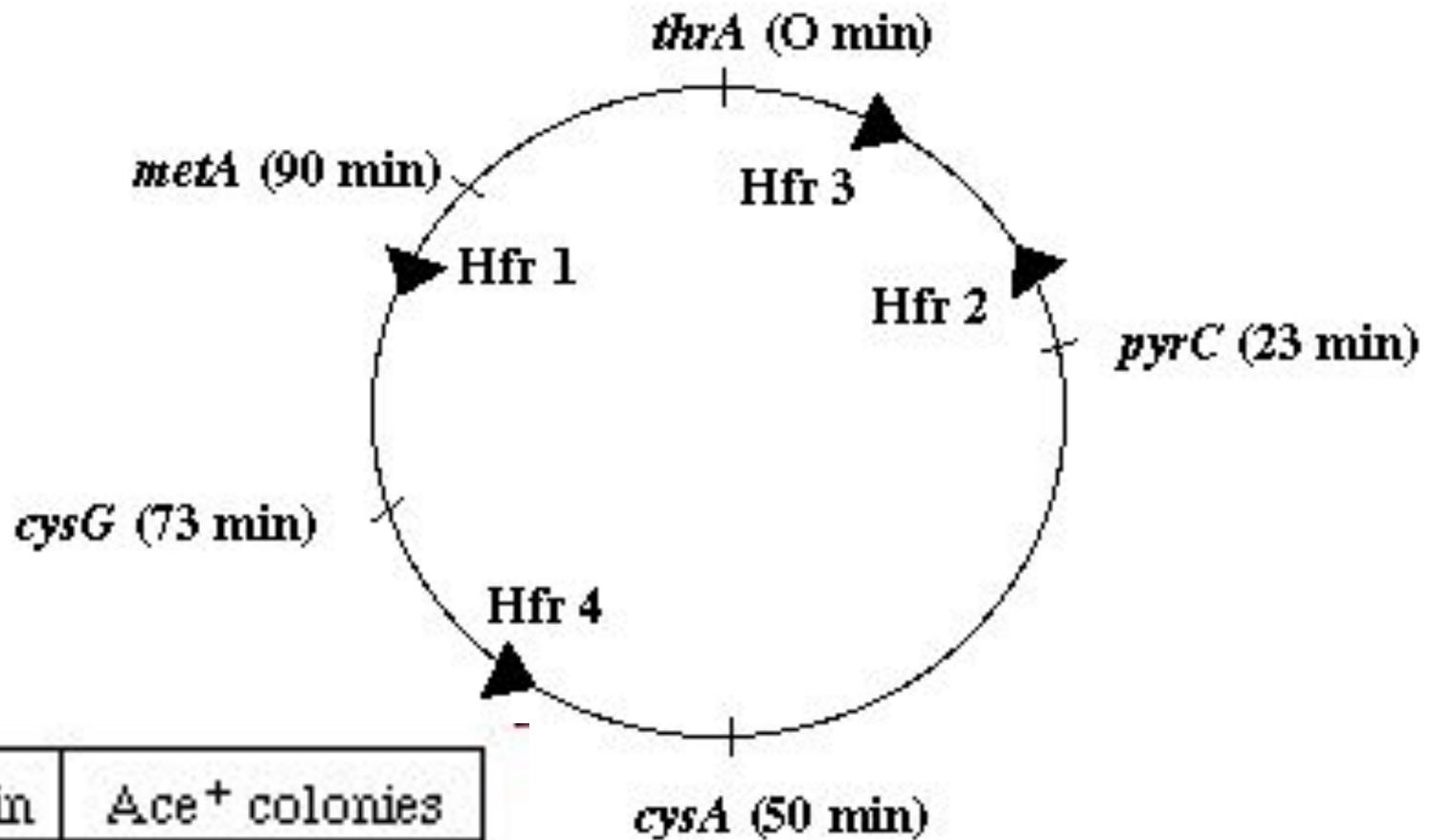
Задача 2 на картирование с разными Hfr штаммами

Был выделен новый мутантный штамм, устойчивый к стрептомицину и неспособный использовать ацетат как источник углерода (фенотип **Ace⁻**).

Чтобы картировать мутацию, новый штамм был скрещен с четырьмя различными штаммами **Hfr Str^S ace⁺** , показанными на рисунке. Стрелки показывают локализацию F-плазмиды и направление передачи.

1. На какой среде нужно выращивать пробы из смеси штаммов, чтобы отобрать рекомбинантов?
2. Определите локализацию мутантного гена исходя из приведенных результатов

Задача 2



Donor strain	Ace ⁺ colonies
Hfr 1	1000
Hfr 2	5
Hfr 3	1000
Hfr 4	80

Карта четырех штаммов Hfr
и результаты скрещиваний

Задача 2. ОТВЕТ

- 1. На какой среде нужно выращивать пробы из смеси штаммов, чтобы отобрать рекомбинантов?*

Минимальная среда, где единственный источник углерода – ацетат. Добавить стрептомицин, чтобы не росли штаммы-доноры.

- 2. Определите локализацию мутантного гена исходя из приведенных результатов*

Около 95 минут – в районе, передаваемом первым между Hfr-1 и Hfr-3

Использование Hfr штаммов для построения генетических карт

Расстояние – в минутах!

а не в привычных нам % кроссинговера

У E.coli

1 мин = 20 % кроссинговера

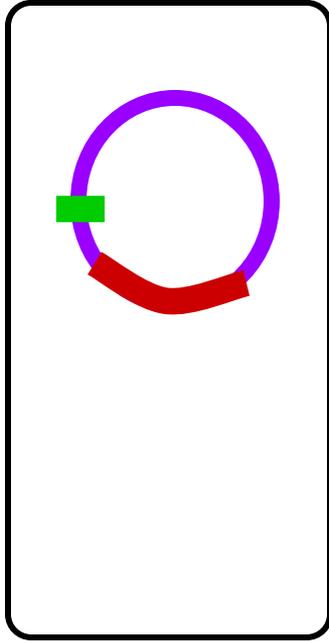
Единицы генетической
карты отражают **метод**

Метод – прерванная конъюгация

Единицы карты – **минуты**

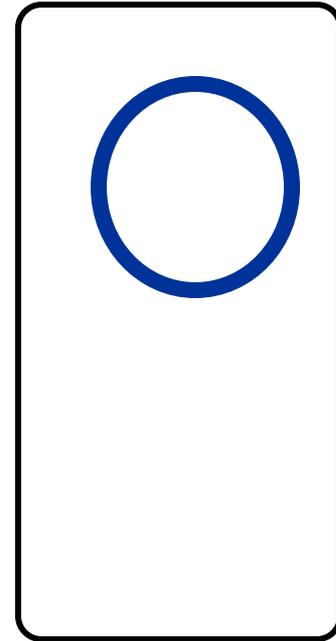
Вся хромосома *E.coli*
передается за 100 мин

Донор генов

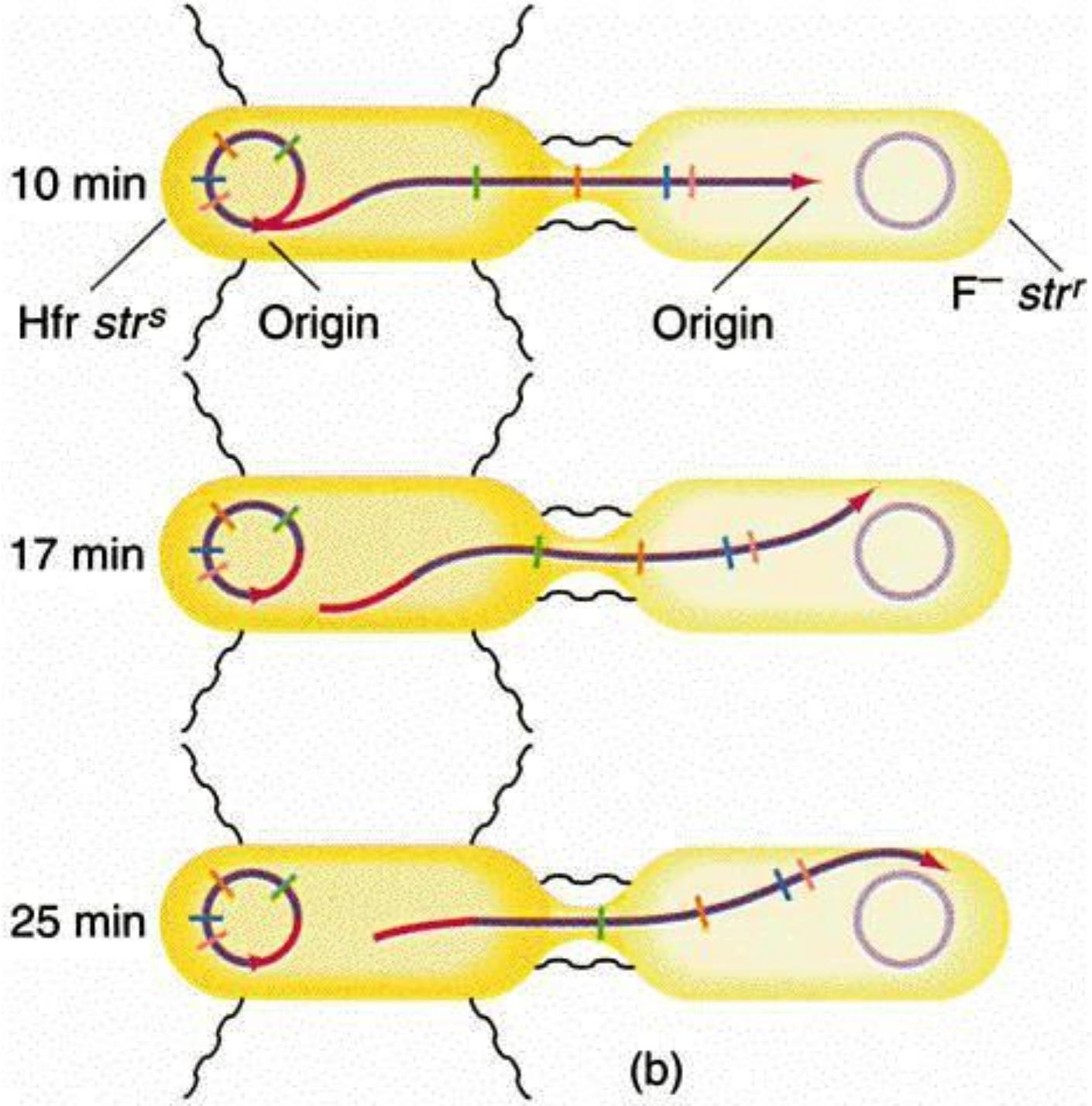


Hfr

Реципиент генов



F⁻



Обычно **донор** – прототроф (штамм с генами дикого типа)

Реципиент – ауксотроф

Нужно создать такую среду, чтобы не рос ни донор, ни реципиент –
только рекомбинанты



Как сделать, чтобы не рос реципиент?

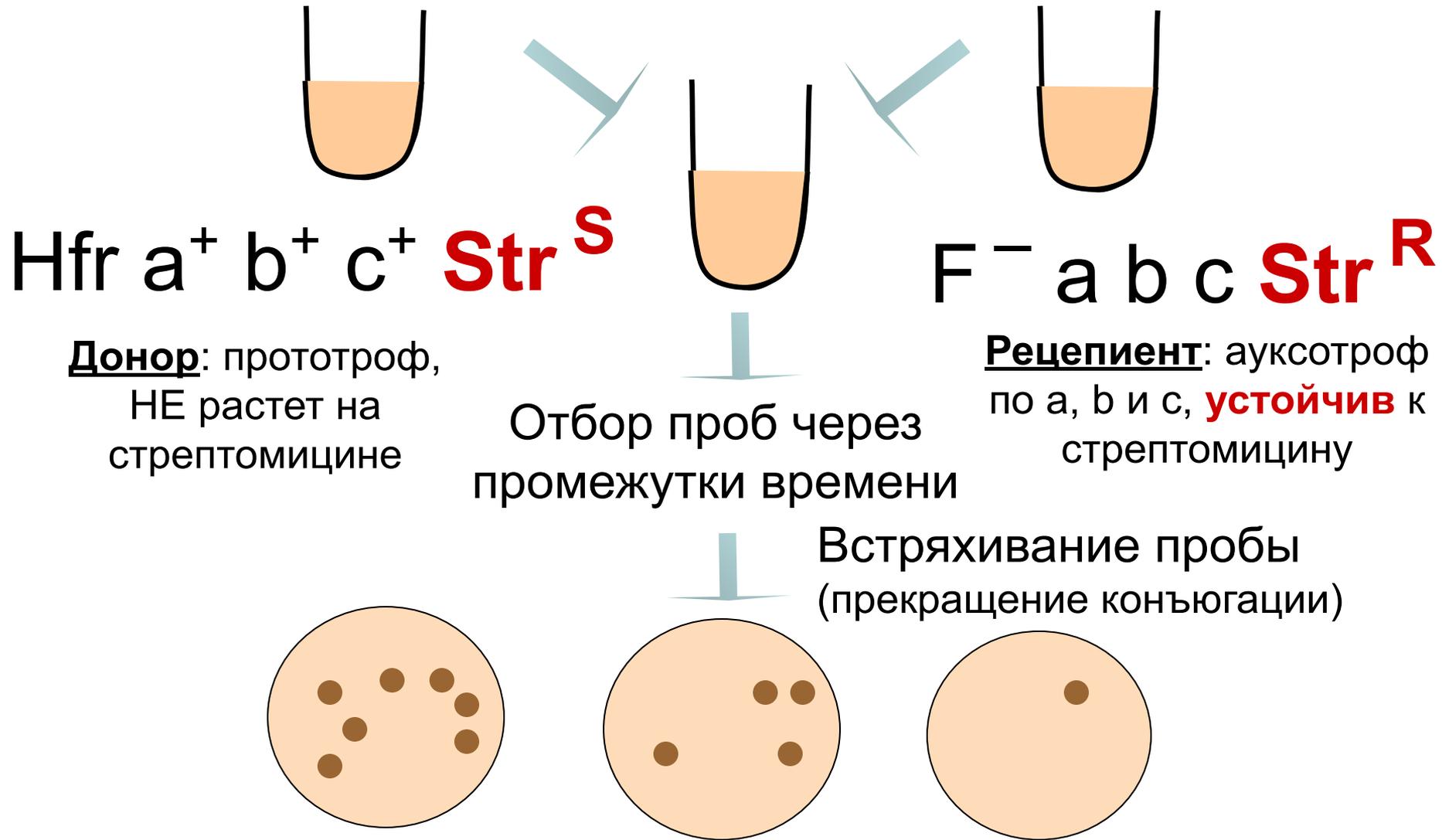
Выращивать на селективной среде, где **ауксотроф**-реципиент **не растет**



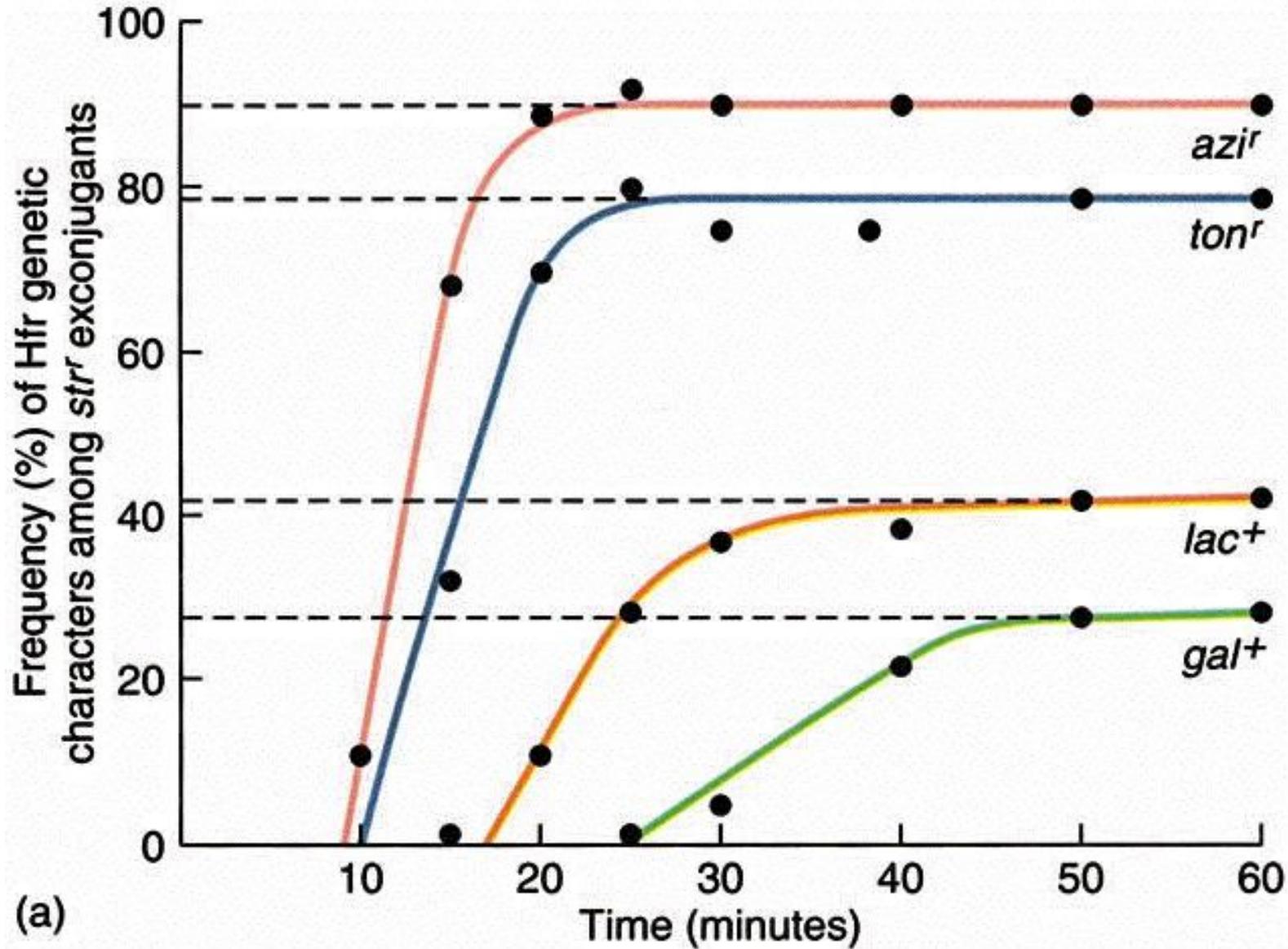
Как избавиться от роста донора?

Добавить донору ген **чувствительности к антибиотику**, а реципиенту – устойчивости, и выращивать смесь на среде с антибиотиком

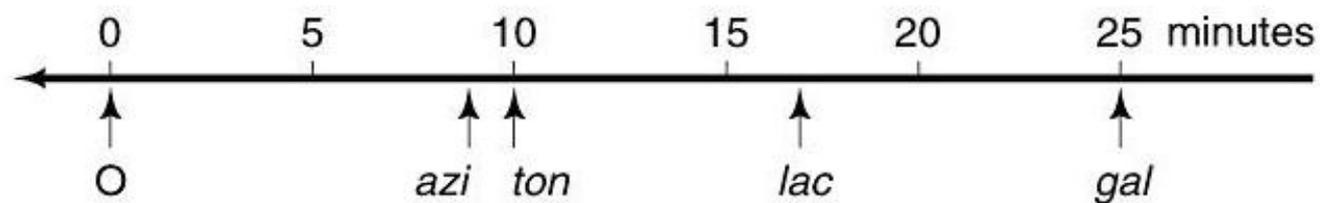
Картирование методом прерванной конъюгации



Посев на минимальную среду со стрептомицином и добавками, позволяющими различить разные генотипы



(a)



Региональный этап 2011-12, практика Микробиология и генетика 11 кл

Задача на картирование, где
использовался только один штамм и
разное время прерывания

Задача. Региональный этап 2012 Практика. Микробиология

Штамм 1 кишечной палочки, неспособный расти на среде **без аргинина и серина**, смешали с штаммом 2, неспособным расти в отсутствии **триптофана**.

Через определенные промежутки времени отбирали пробы, резко встряхивали и высевали на чашки Петри со **средами, не содержащими определенных аминокислот**.

Результаты приведены в таблице. Объясните результаты.

Среда Время	Без серина	Без триптоф	Без серина и триптоф	Без арг и триптоф	Без серина, арг и триптофана
5 мин	+	+	—	—	—
10 мин	+	+	—	+	—
15 мин	+	+	—	+	—
20 мин	+	+	+	+	+

Критерии оценки.

Правильное описание полового процесса – 16

Определение донорного и реципиентного штаммов – 1 балл.

Определение последовательности генов синтеза аргинина и серина – 1 балл.

Координаты генов синтеза аргинина и серина на генетической карте – по 1 баллу

Задача. Региональный этап 2012 Практика. Микробиология

Решение Генотипы штаммов по условию:

Штамм 1 $arg^- ser^- trp^+$

Штамм 2 $arg^+ ser^+ trp^-$

Среда Время	Без серина	Без триптоф	Без серина и триптоф	Без арг и триптоф	Без серина, арг и триптофана
5 мин	+	+	-	-	-
10 мин	+	+	-	+	-
15 мин	+	+	-	+	-
20 мин	+	+	+	+	+

Растет
штамм 2

Растет
штамм 1

Штамм 2 расти не может (нет ТРП)

Штамм 1 расти не может (нет СЕР или АРГ)

ВЫВОД: это рекомбинанты

Шт.1 $arg^- ser^- trp^+$

Шт.2 $arg^+ ser^+ trp^-$

Среда Время	Без серина	Без триптоф	Без серина и триптоф	Без арг и триптоф	Без серина, арг и триптофана
5 мин	+	+	-	-	-
10 мин	+	+	-	+	-
15 мин	+	+	-	+	-
20 мин	+	+	+	+	+

Выпишем генотипы
появляющихся
рекомбинантов

$arg^? ser^+ trp^+$

$arg^+ ser^+ trp^+$

$arg^+ ser^? trp^+$

Все рекомбинанты - trp^+ . Если бы этот ген передавался, то рост на всех средах начался бы одновременно. Значит, этот ген был в реципиенте.

ВЫВОД: Штамм 1 – F^- , Штамм 2 – Hfr

F^- arg^- ser^- trp^+

Hfr arg^+ ser^+ trp^-

Среда Время	Без серина	Без триптоф	Без серина и триптоф	Без арг и триптоф	Без серина, арг и триптофана
5 мин	+	+	-	-	-
10 мин	+	+	-	+	-
15 мин	+	+	-	+	-
20 мин	+	+	+	+	+

Растет
штамм 2

Растет
штамм 1

Ген ser^+
появляется
через 20 мин

Ген arg^+ появляется
через 10 мин

ser^+

arg^+

Hfr

20 мин

10 мин

Еще задачи из Глазера

№ 435*. Для картирования генов *leuA* (2 мин), *proA* (6 мин), *lacZ* (8 мин) и *purE* (12 мин) у *Escherichia coli* методом прерывания конъюгации лучше всего использовать в качестве донора штамм HfrH (прототроф, чувствителен к стрептомицину). Какой генотип должен иметь реципиентный штамм? Почему для контрселекции (подавления роста) клеток донорного штамма следует использовать стрептомицин (хромосомный ген чувствительности – устойчивости к стрептомицину *rpsL*, 72 мин)? Какие среды для обнаружения рекомбинантов следует приготовить? Как проводить отбор рекомбинантов? Какие рекомбинанты будут образовывать колонии на этих средах? Изобразите предполагаемый график кинетики появления рекомбинантов.

Решение

Реципиентный штамм для скрещивания должен иметь генотип $F^- leuA proA lacZ purE rpsL$ (нуждается в лейцине, пролине, не способен использовать лактозу в качестве источника углерода, нуждается в пурине (аденине), устойчив к стрептомицину — Str^r). Для элиминации прототрофных клеток донора целесообразно использовать стрептомицин, так как донорный маркер $rpsL^+$ (Str^s) (72 мин) практически не передается в реципиентные клетки штаммом HfrH.

Среды для обнаружения рекомбинантов готовят на основе минимальной среды с добавлением стрептомицина. В среду для выявления клонов рекомбинанта Leu^+ надо внести пролин и аденин, для рекомбинанта Pro^+ — лейцин и аденин, для Pur^+ — лейцин и пролин. Среда для обнаружения Lac^+ должна содержать лактозу в качестве единственного источника углерода и все вещества, в которых нуждается реципиентный штамм, т. е. лейцин, пролин и аденин.

Рекомбинанты можно отбирать двумя способами: 1) часто проводят отбор по самому проксимальному из изучаемых маркеров (если это уже известно), и затем у полученных рекомбинантов производят анализ остальных маркеров, которые будут выступать в качестве неселективных; 2) можно высевать пробы из конъюгационной смеси на селективные среды для отбора всех типов рекомбинантов одновременно. Оба способа дают сходные результаты.

Предполагаемый график кинетики появления рекомбинантов для анализа по первому способу имеет следующий вид:

Кинетика появления рекомбинантов в скрещивании
 $HfrH \times F-leuA \ proA \ lacZ \ purE \ gpsL$

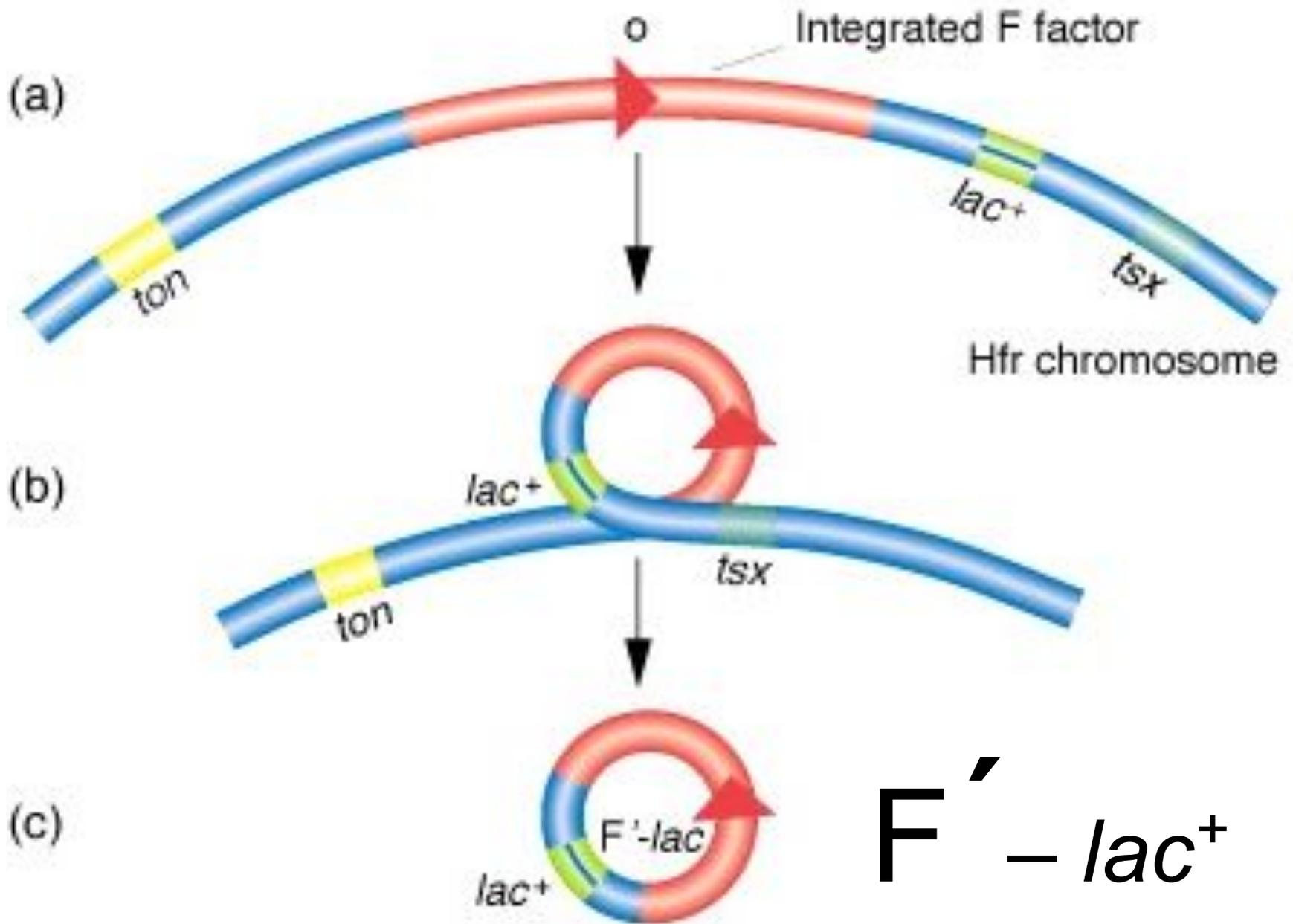


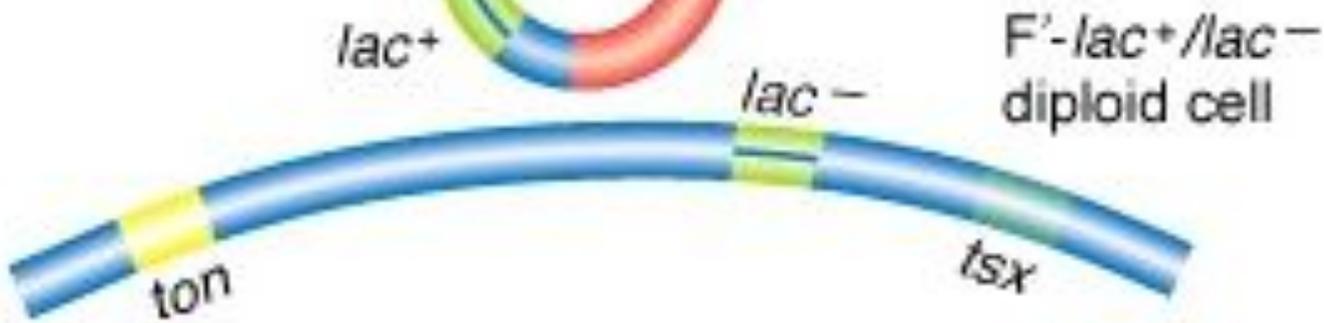
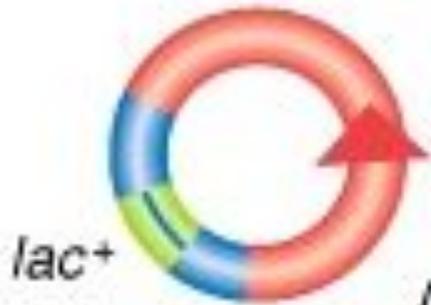
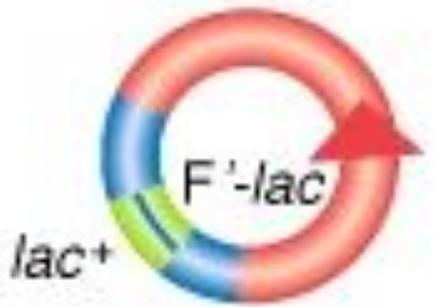
F' штаммы

Возникают из Hfr штаммов

Если встроенная в хромосому
плазмида **вырезается неточно**

И в ней оказывается захвачен
**один или несколько генов из
основной хромосомы**





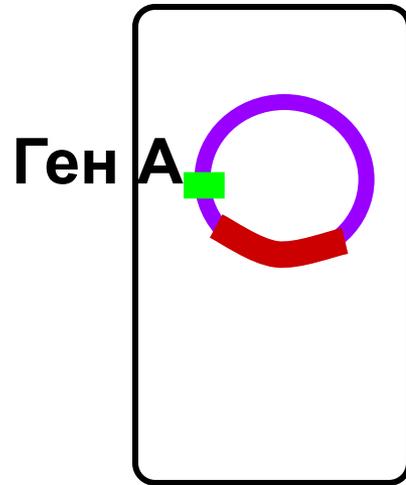
Конъюгация с F^- штаммом
 F' плазмиды передается
вместе с захваченным геном.
Но в реципиенте такой ген
есть и в основной хромосоме!

Мерозигота – **частично диплоидная** клетка
(по генам, захваченным F-плазмидой)

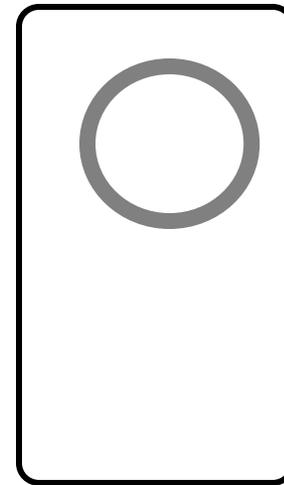
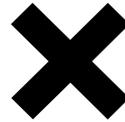
Отличия в передаче генов Hfr и F' штаммами

Донор генов

Рецепиент генов

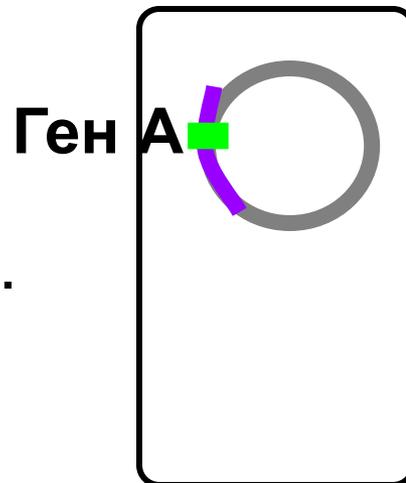


Hfr



F⁻

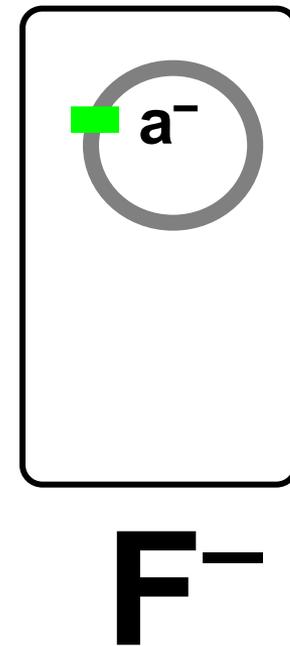
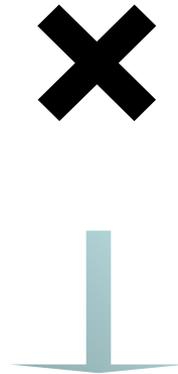
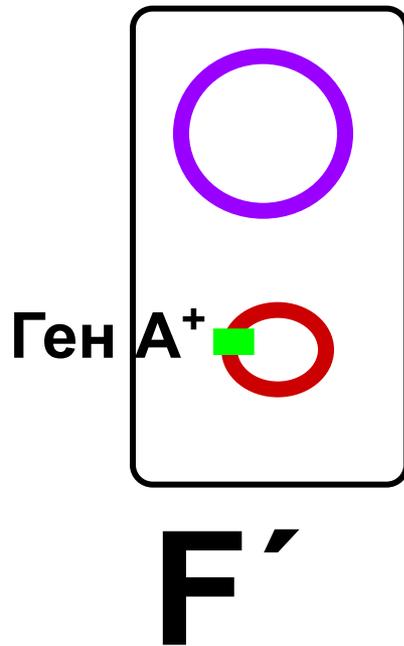
- Ген А передается части реципиентов. Рекомбинант остается **F⁻**



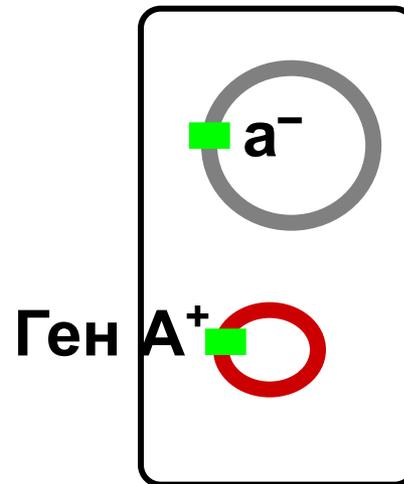
F⁻

Донор генов

Рецепиент генов



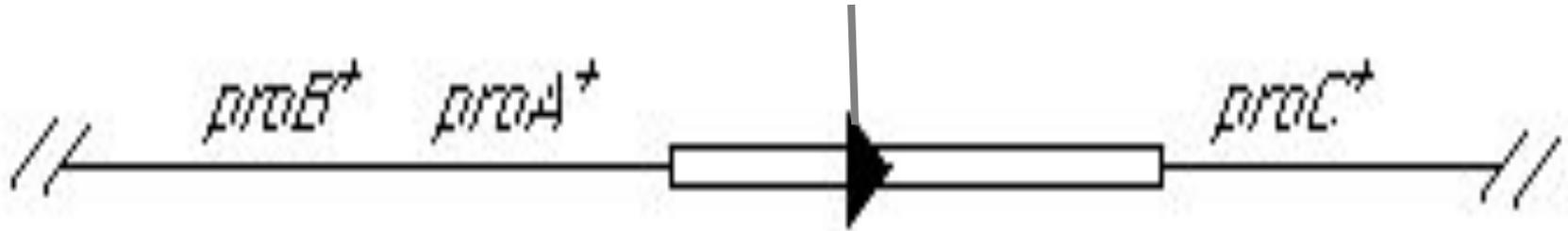
■ Ген A^+ передается
ВСЕМ реципиентам
Все они становятся
 F'



F'

Задача на получение и
выделение F' штаммов

Начало передачи бактериальной хромосомы



Гены *proA*, *proB* и *proC* необходимы для биосинтеза пролина.

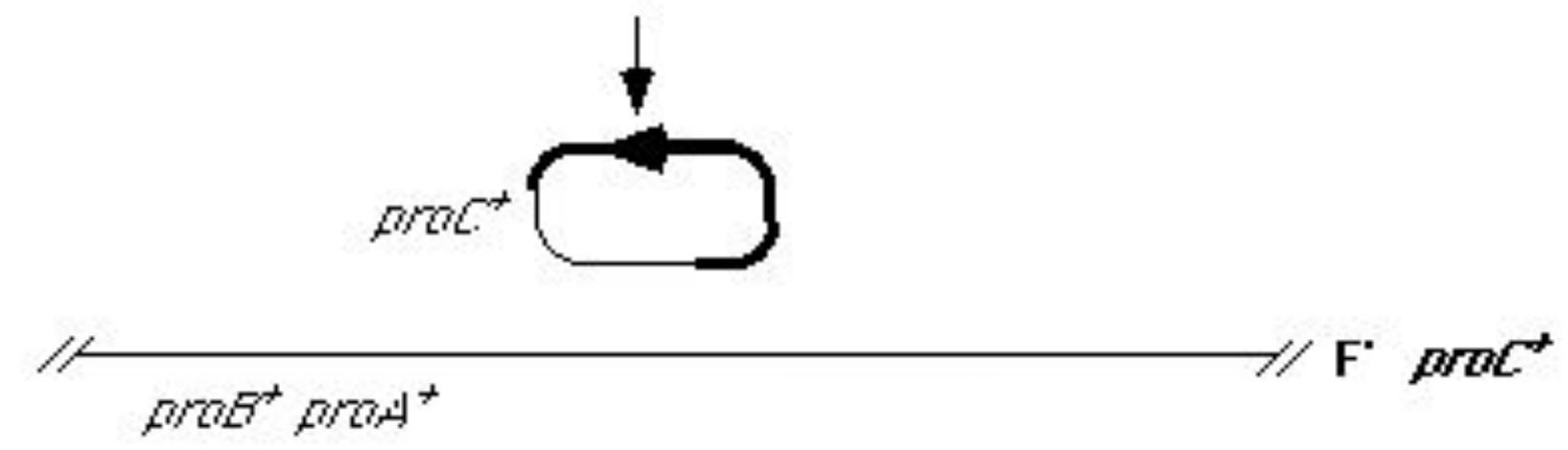
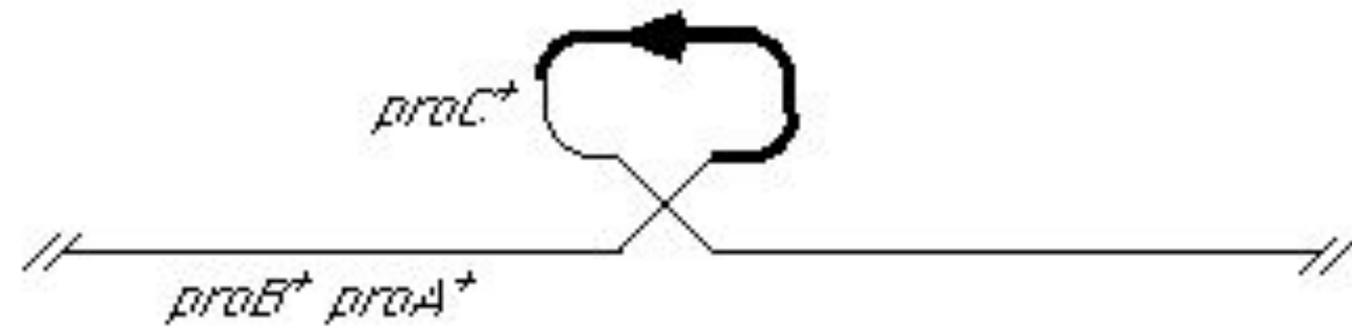
У вас есть Hfr штамм (прототроф) с F плазмидой, встроенной между генами *proA*⁺ *proB*⁺ и *proC*⁺, как показано на рисунке.

В этом штамме спонтанно иногда возникают F' штаммы содержащие один или несколько перечисленных генов.

Задача 1: выделить штамм F' *proC*⁺



Rare aberrant excision
(about 10^{-6})



Ответ:

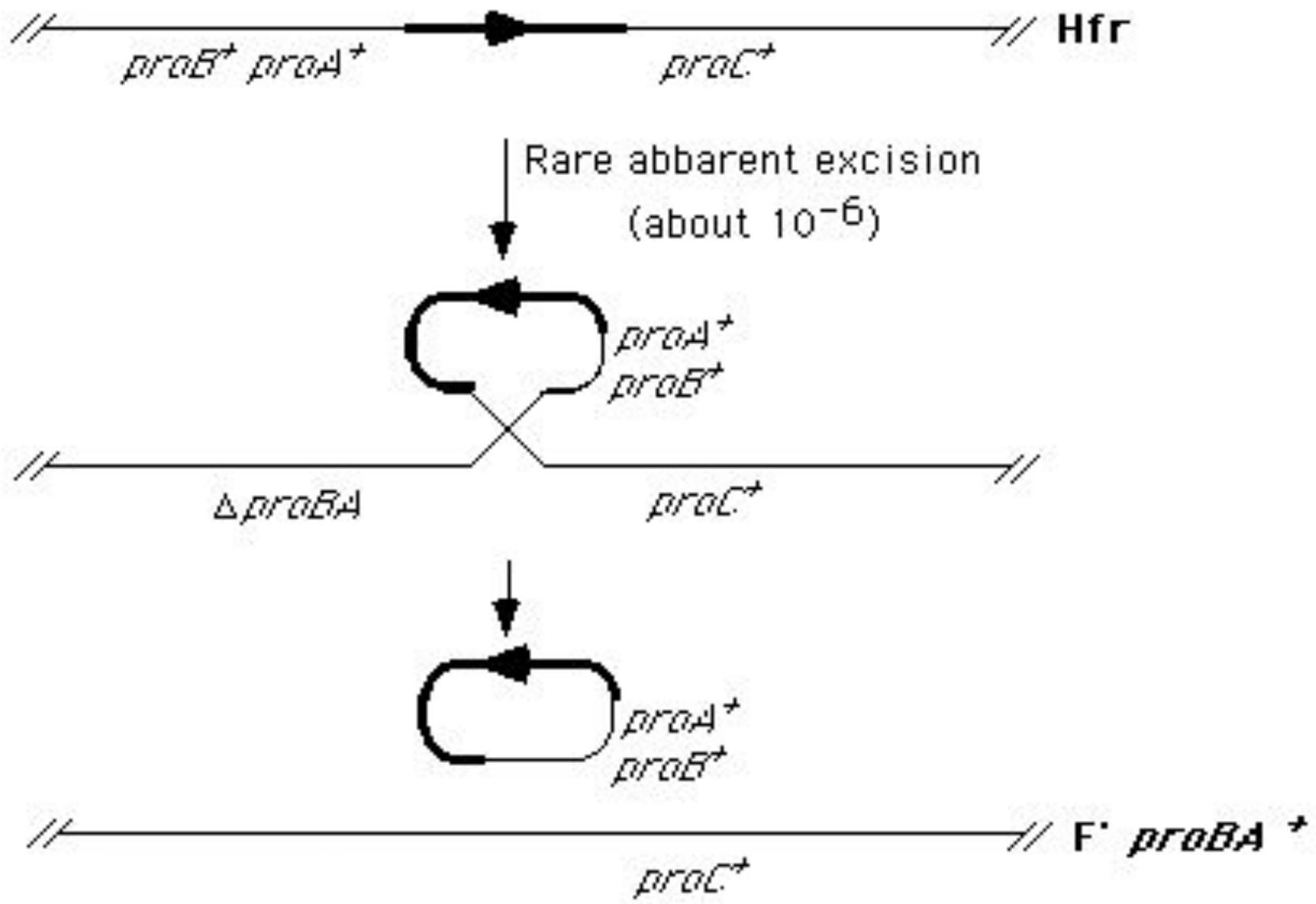
Чтобы выделить штамм F' *proC*⁺ нужно скрестить исходный Hfr штамм с мутантом *proC* – Str R

Выращивать на минимальной среде, без пролина и со стрептомицином.

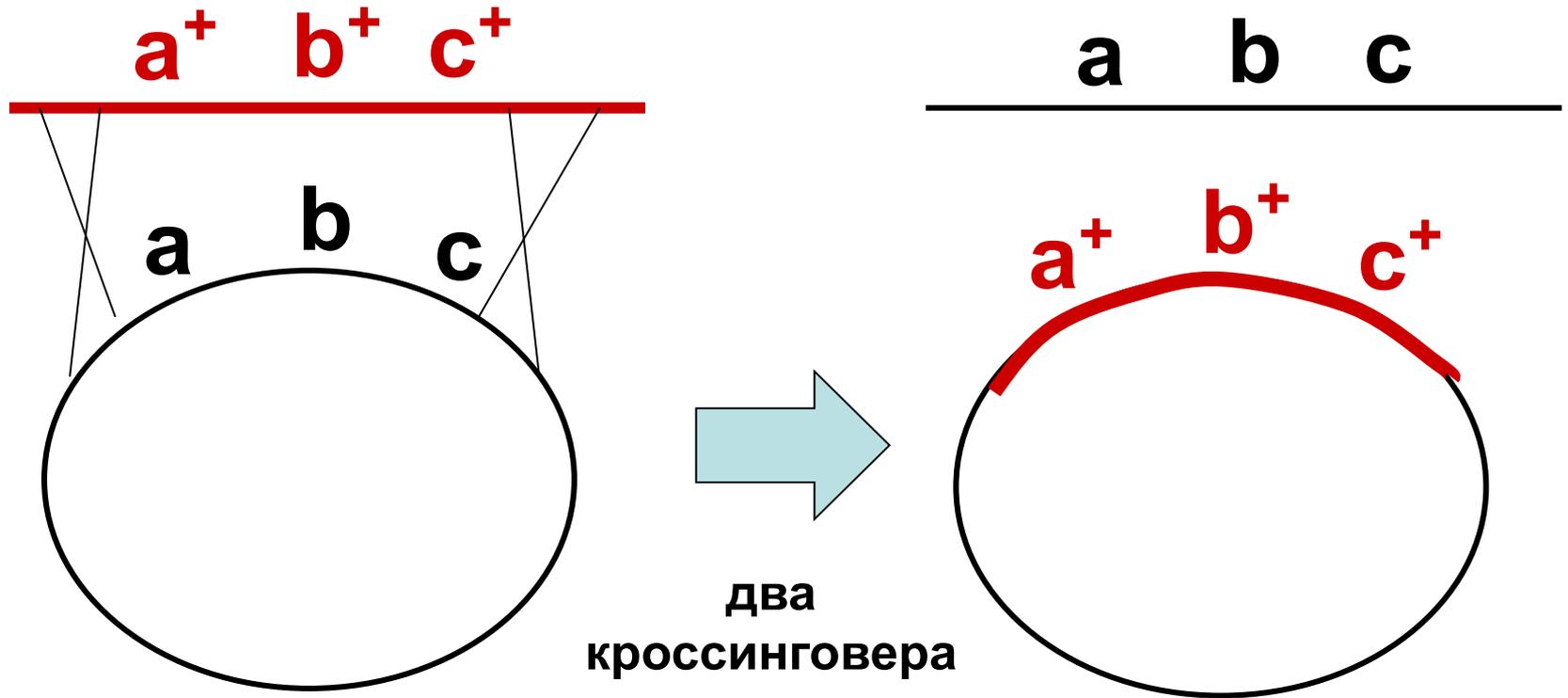
Поскольку при конъюгации ген *proC*⁺ в этом штамме передается последним, то единственный способ получить его – это F' *proC*⁺ плаزمида



Задача 2: выделить штамм F' *proA⁺ proB⁺*



Встраивание переданных генов в хромосому реципиента



Кроссинговер обеспечивается бактериальным геном **RecA**

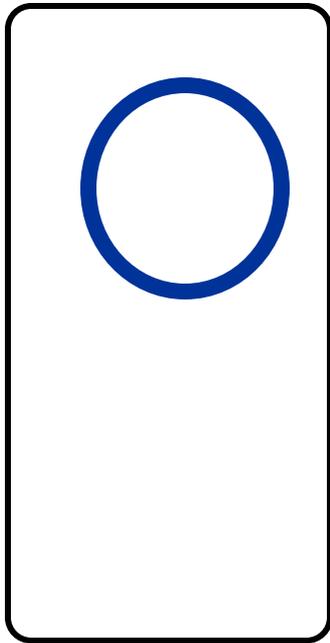
Ответ:

скрестить исходный Hfr штамм с двойным мутантом *proA*⁻ *proB*⁻ и, кроме того, мутантным по гену *recA*

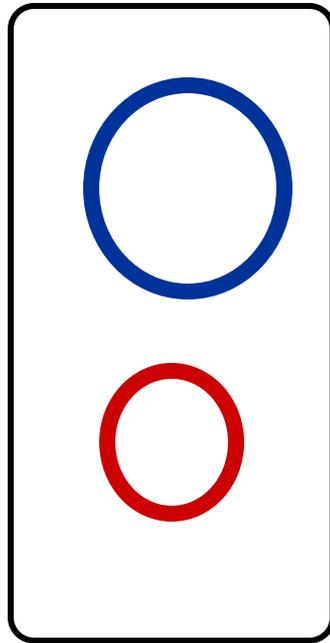
У такого мутанта не будет идти кроссинговер, поэтому получить гены *proA*⁺ *proB*⁺ он сможет только через F' плазмиду

Итоги по F штаммам

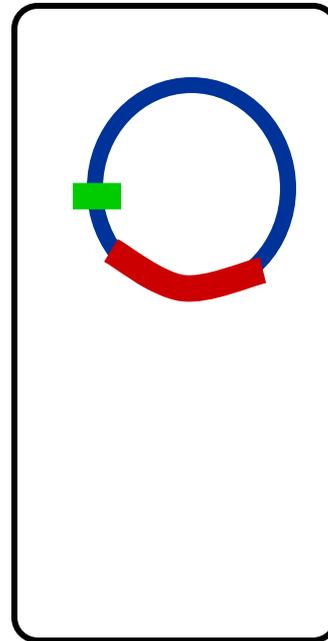
Какие бывают штаммы



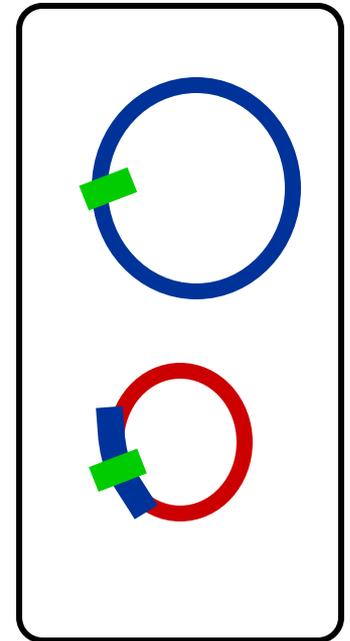
F⁻



F⁺



Hfr



F'

Какие бывают штаммы

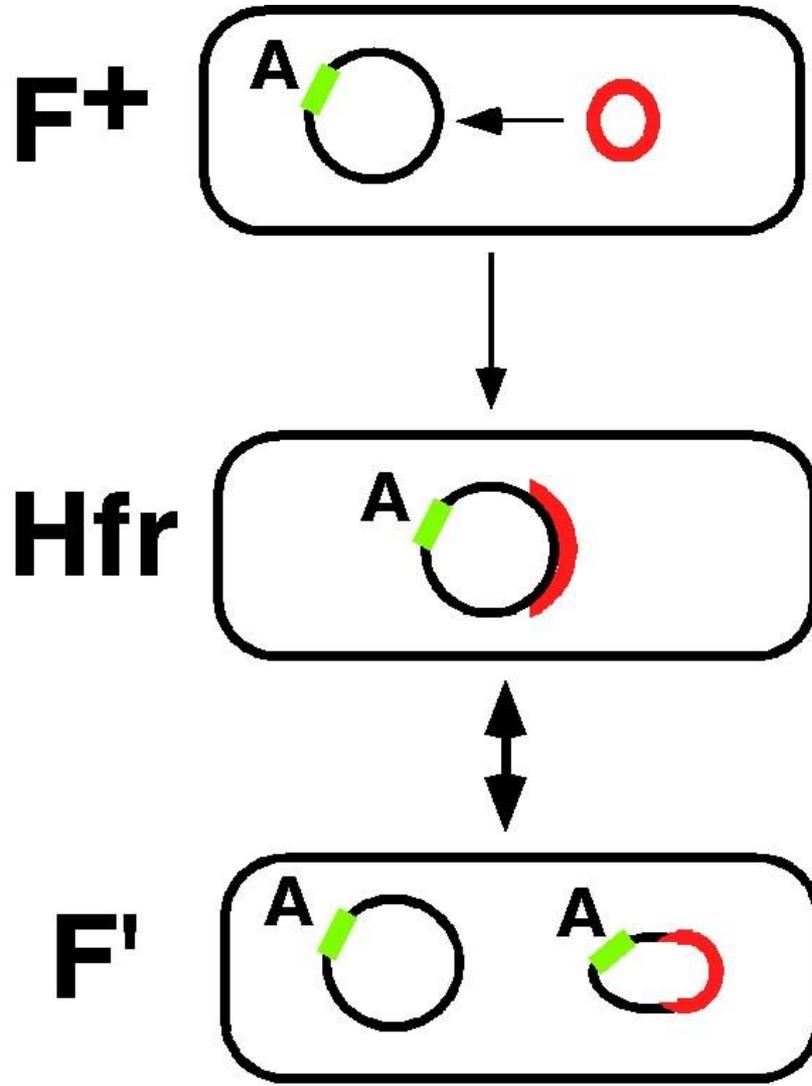
F⁻ нет F плазмиды, реципиент

F⁺ свободная F плазида

Hfr F плазида встроена в бактериальную «хромосому»

F' образуется в результате вырезания из «хромосомы» Hfr F плазмиды, прихватившей часть хромосомных генов

Генезис штаммов Hfr и F' из F⁺



Картирование близких генов

Кроссинговер у бактерий

Методы картирования у бактерий

1. **Прерванная конъюгация** – используется для удаленных друг от друга генов, но не годится для близко расположенных

2. **Частота кроссинговера** – для близких маркеров (меньше 5 мин)

Сначала необходимо получить **мерозиготу** (любым способом – конъюгацией, трансдукцией, трансформацией)

Соответствие карт в минутах и построенных по частоте кроссинговера

У E.coli

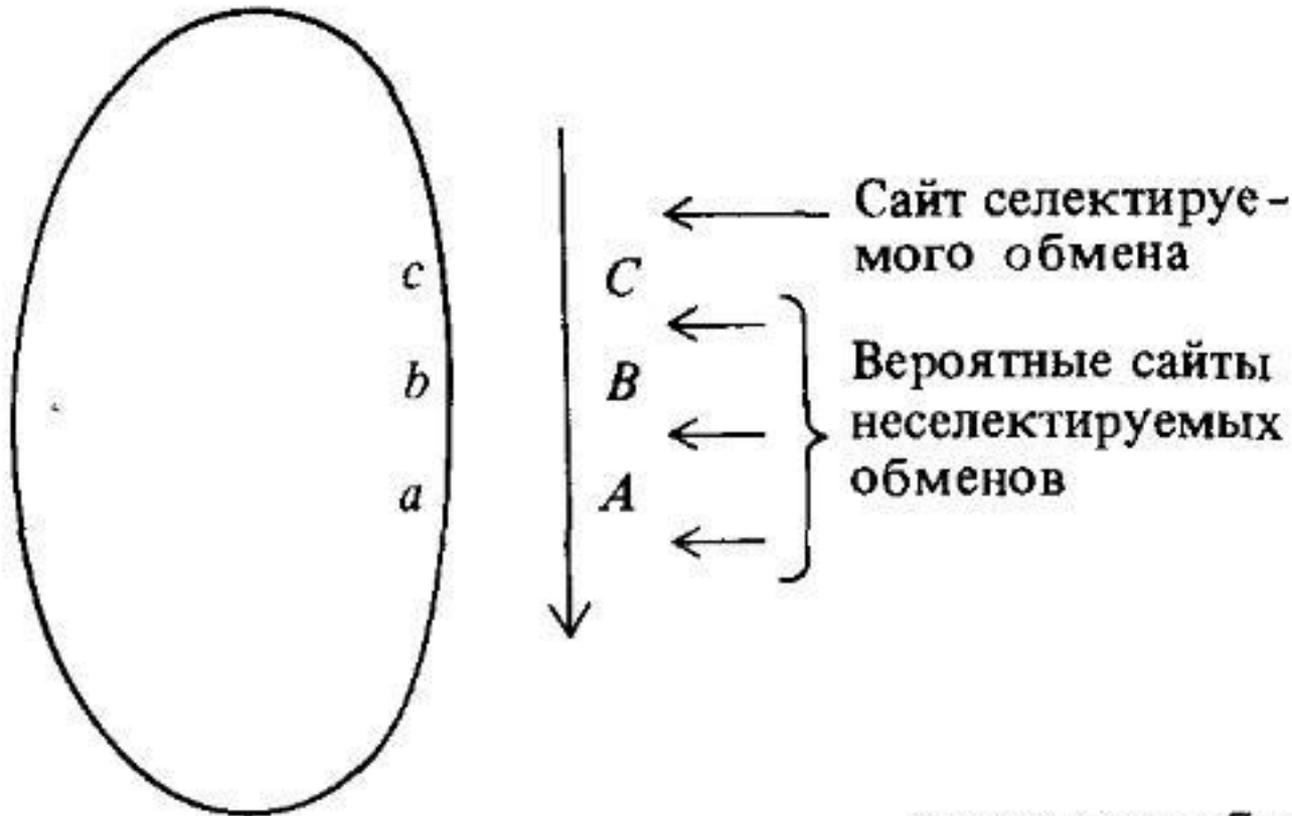
1 мин = 20 % кроссинговера

1% кроссинговера = 1600 н.п.

Длина всей карты = 100 мин

Поэтому гены, расположенные на расстоянии **более 5 мин.** картировать кроссинговером нет смысла – он происходит практически всегда

Картирование методом рекомбинации

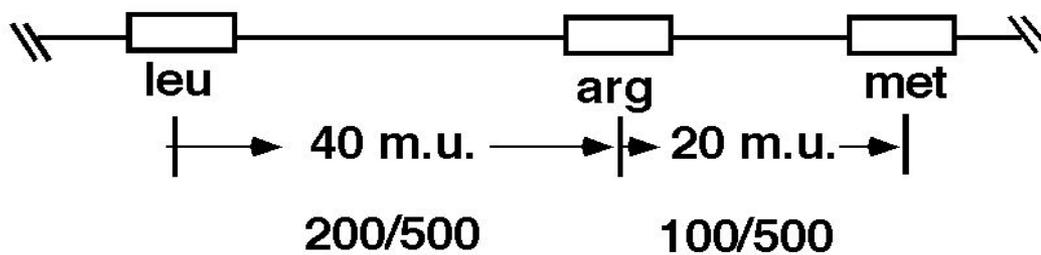
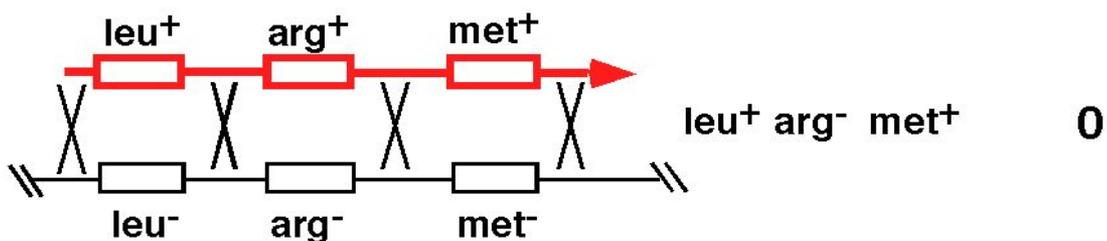
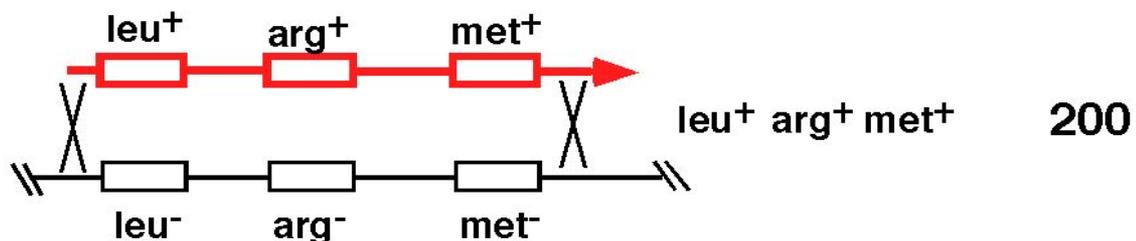
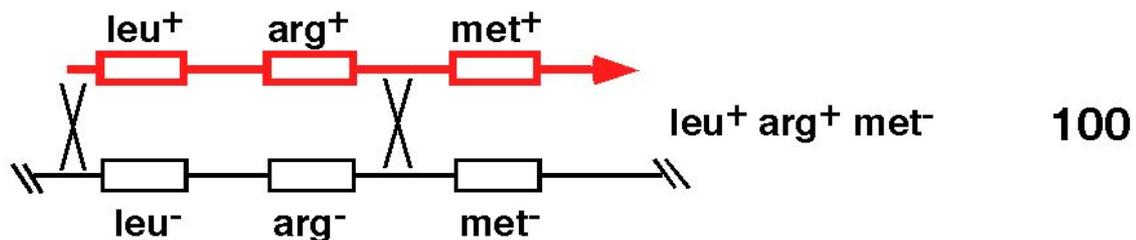
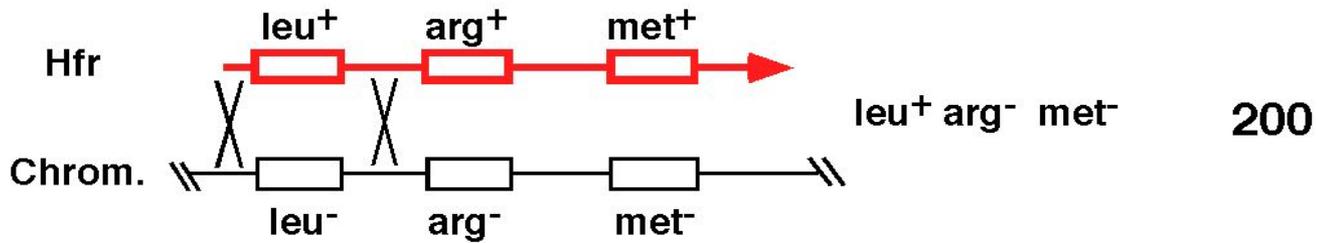


$$\text{Частота рекомбинации между } B \text{ и } C = \frac{\text{число рекомбинантов } bC}{\text{число рекомбинантов } C} \times 100$$

Отбирается дистальный маркер *C* (передающийся после нужных генов)
Реципрокных классов нет, поэтому расстояния не аналогичны расстояниям у диплоидных организмов

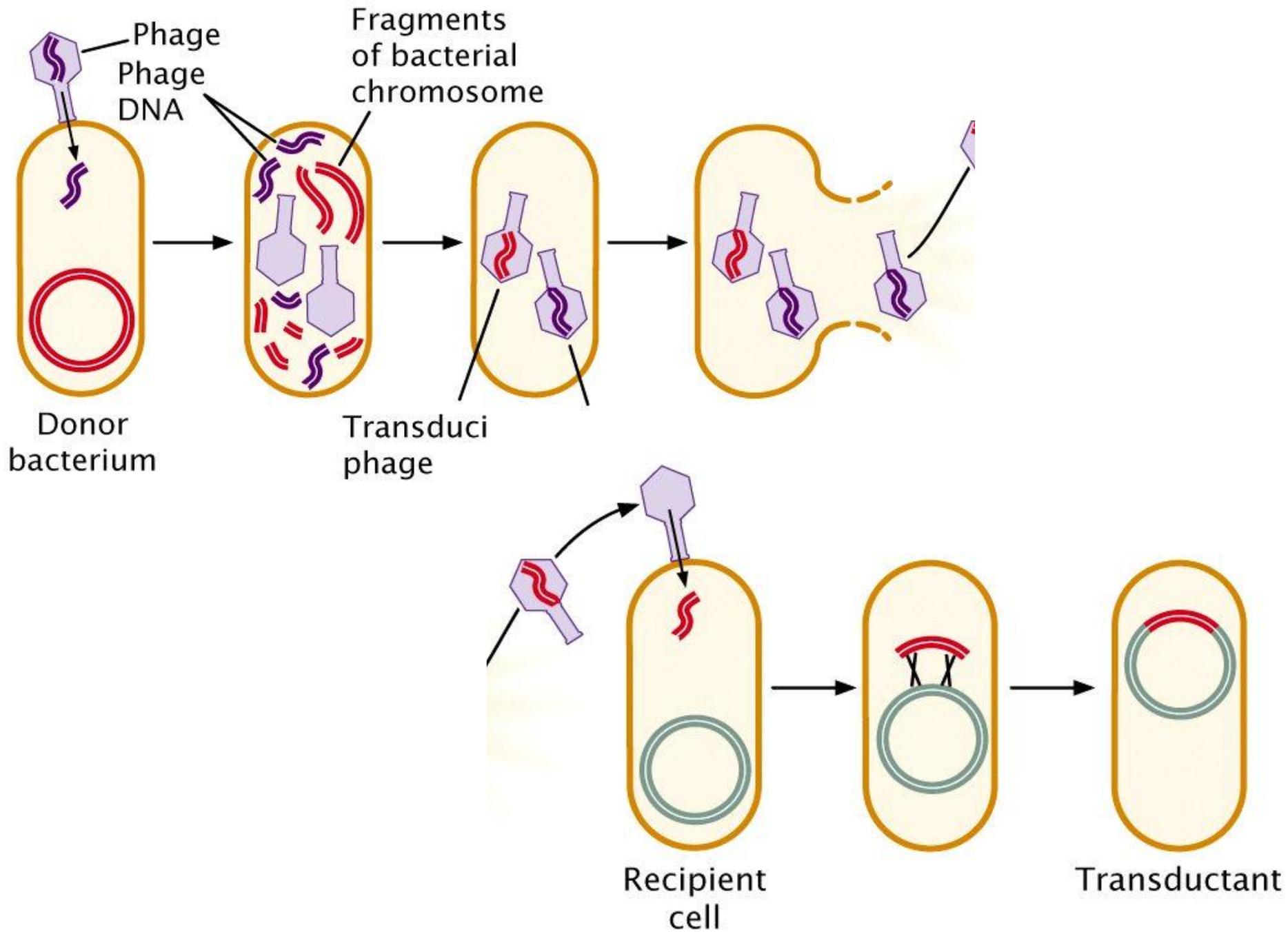
***leu*⁺ –**

дистальный
маркер



Трансдукция

Перенос вирусами



Определение расстояний на карте
при трансдукции

Чем чаще гены передаются
вместе – тем **ближе** они друг
к другу

Задача на трансдукцию

*Практика Региональный этап
2012-13. 11 кл. Микробиология и
генетика (Асеев)*

Она же – задача 450 из Глазера

Практика Региональный этап 2012-13. 11 кл. Микробиология и генетика (Асеев)

Для изучения возможности переноса генов между бактериями с помощью бактериофагов вы взяли препарат умеренного бактериофага Р1, (его геном состоит из двунитевой ДНК, размер генома фага составляет 93 тысячи п.н.) и два штамма кишечной палочки

Штамм 1 – ауксотрофный (неспособный синтезировать самостоятельно) по лейцину и треонину, и **чувствительный** к азиду натрия.

Штамм 2 – прототрофный (способный самостоятельно синтезировать) и **устойчивый** к азиду натрия.

А) Какой из этих штаммов вы будете использовать в качестве донора генетической информации, а какой в качестве реципиента, и почему? 1 балл.

ОТВЕТ на вопрос А

Донором будет второй штамм, потому что он несёт доминантные гены прототрофности по лейцину и треонину, и доминантный же ген устойчивости к азиду.

Чтобы увидеть изменение фенотипа, надо перенести доминантные гены в штамм с рецессивными генами (реципиент – первый штамм)

Решение – МВ

Генотип штамма 1 **leu⁻ thr⁻ azi^S**

Генотип штамма 2 **leu⁺ thr⁺ azi^R**

Донором должен быть носитель генов, которые можно выявить на селективной среде. Селективная среда в данном случае должна быть без лейцина и треонина и с добавлением азидата натрия.

На штамме-доноре Вы получили отличный урожай новых фагов, которыми заразили штамм-реципиент.

Б) Почему зараженные бактерии не умирают, а получают новые гены? 1 балл.

ОТВЕТ на вопрос Б.

Бактериофаг P1 иногда может ошибаться и упаковывать в свой капсид часть ДНК из генома хозяина. После заражения таким фагом бактерия-реципиент получает эту ДНК с генами, доставшимися от штамма-донора. Кроме того, P1 – умеренный фаг, поэтому он как правило не убивает сразу зараженную клетку.

После этого вы поместили зараженные фагом клетки штамма-реципиента на среду без лейцина и треонина, и обнаружили, что все выросшие на ней клоны чувствительны к азиду натрия.

В) Объясните, почему нет клонов, устойчивых к азиду натрия? 1 балл.

ОТВЕТ на вопрос В.

Размер капсида фага, рассчитанного примерно на 93 т.п.н, слишком мал, чтобы туда поместился фрагмент ДНК из генома штамма-донора, содержащий все три маркерных гена сразу, помещается только фрагмент от leu до thr.

Примечание – МВ

Часть вирусов могла прихватить и ген устойчивости к азиду, но в данном случае мы **использовали селекцию по двум другим маркерам**, а значит, вирусов, захвативших все три гена, не было.

После этого Вы поместили зараженные фагом клетки штамма-реципиента на среду только без лейцина, и обнаружили, что 50% выросших клонов устойчивы к азиду, а ещё 2% выросших клонов могут расти без треонина.

Другую часть зараженных фагом клеток штамма-реципиента Вы высеяли на среду только без треонина, и обнаружили, что 3% выросших клонов к тому же могут расти без лейцина, однако клонов, устойчивых к азиду, нет.

Г) Как гены *leu*, *thr* и *azi* располагаются друг относительно друга? Какие из них расположены близко к друг другу, а какие далеко друг от друга? Нарисуйте схему этого участка генома кишечной палочки. 1 балл

Решение (вопрос Г) – МВ

Среда без лейцина – отбор реципиентов, получивших leu+

Из них 50% - aziR

И только 2% - thr+

Это говорит о том, что гены **leu** и **azi** находятся **рядом**, а ген thr – далеко от них.

Среда без треонина – отбор реципиентов, получивших thr+

Среди них – 3% leu+ , остальные thr+ leu⁻

И все thr+ – aziS Т.е. большинство thr+ leu⁻ aziS и 3% tre+ leu+ aziS

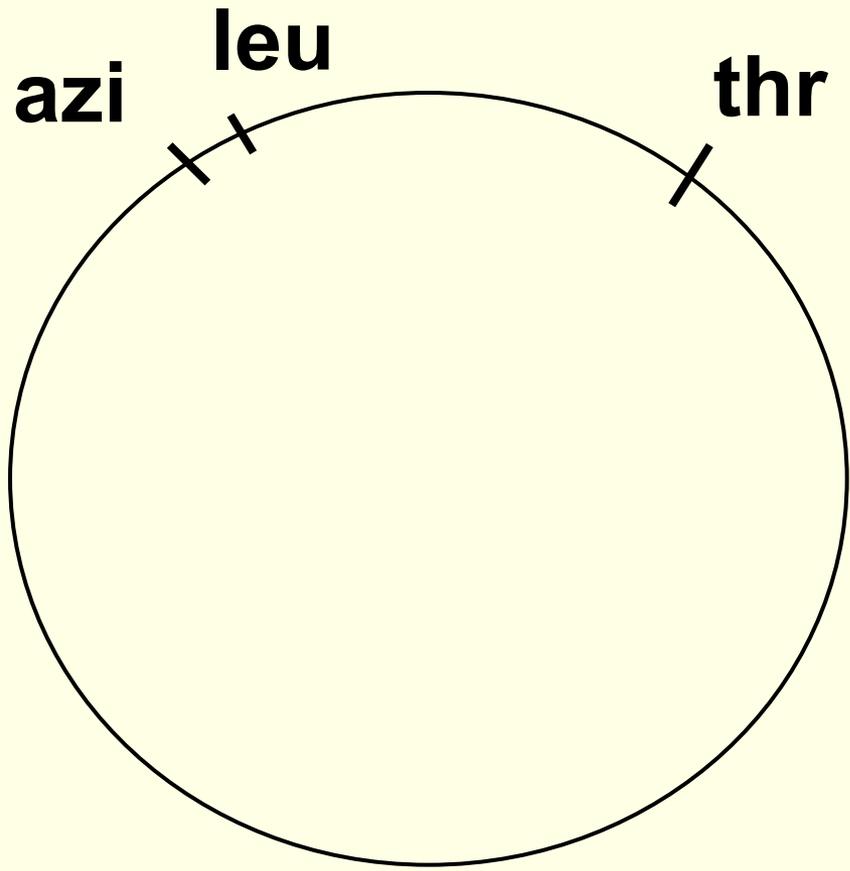
Это говорит о том, что ген **thr** **редко** передается вместе с **leu** и **никогда** – вместе с **azi**

Строим карту. Дальше всех должны находиться azi и tre.

Между ними, намного ближе к azi – ген leu

Таким образом, карта будет выглядеть так: azi leu _____ tre

> 93 kb



Полная длина генетической карты кишечной палочки, полученная методом прерывания конъюгации, составляет 100 минут, при этом гены, отвечающие за синтез лейцина и треонина передаются с интервалом примерно 2 минуты.

Д) Определите и обоснуйте на основе этой информации примерный размер генома кишечной палочки в парах оснований.

ОТВЕТ на вопрос Д.

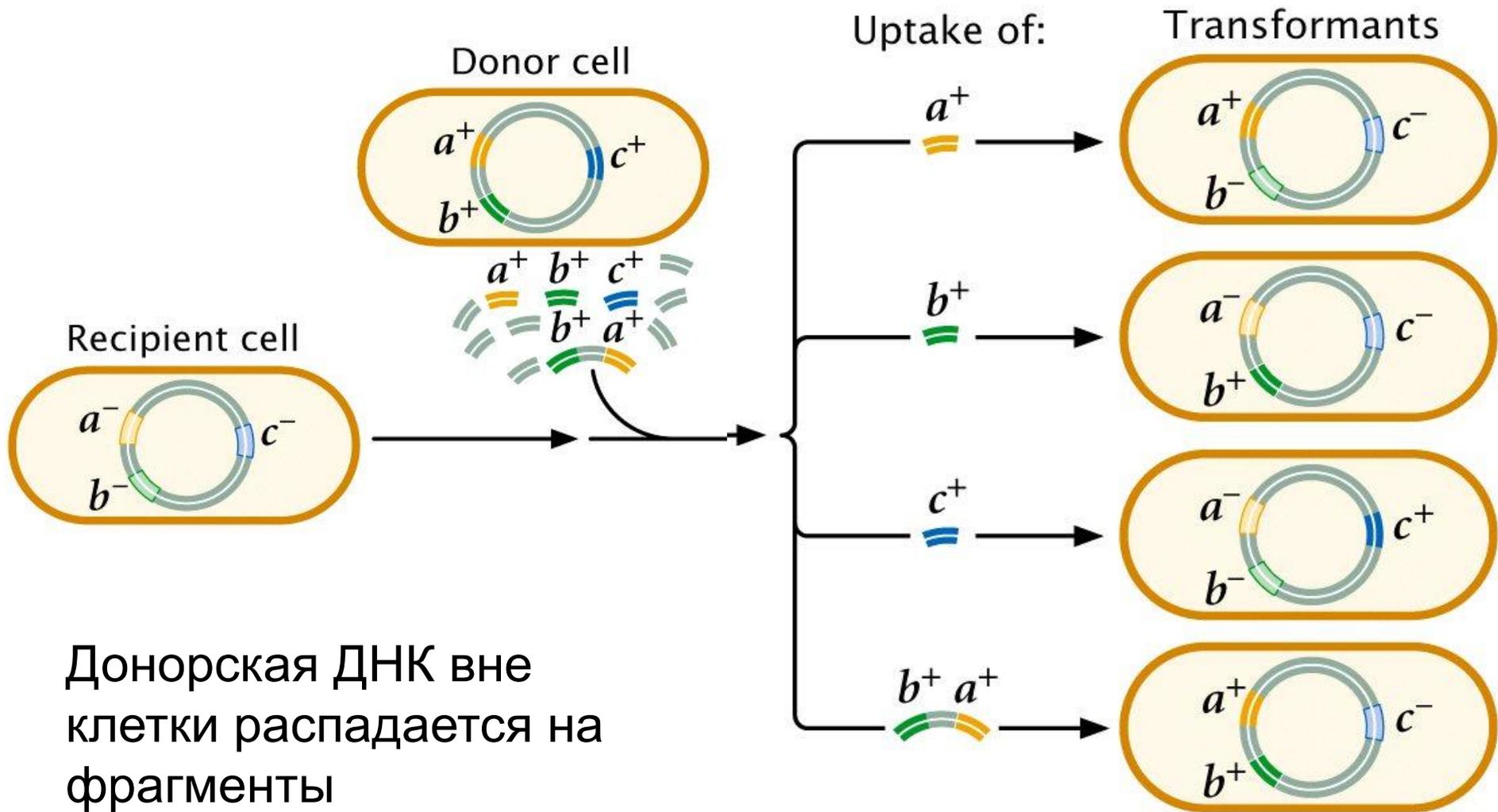
Расстояние между генами leu и tre (2 минуты), которые умецаются вместе в капсил фага P1, в 50 раз меньше, чем полный размер генома (100 минут).

Значит и геном кишечной палочки приблизительно в 50 раз больше, чем геном фага P1.

$93 \text{ тыс.} \times 50 = 4\,650 \text{ тыс.}$,

то есть, примерно 4,65 миллионов п.н.

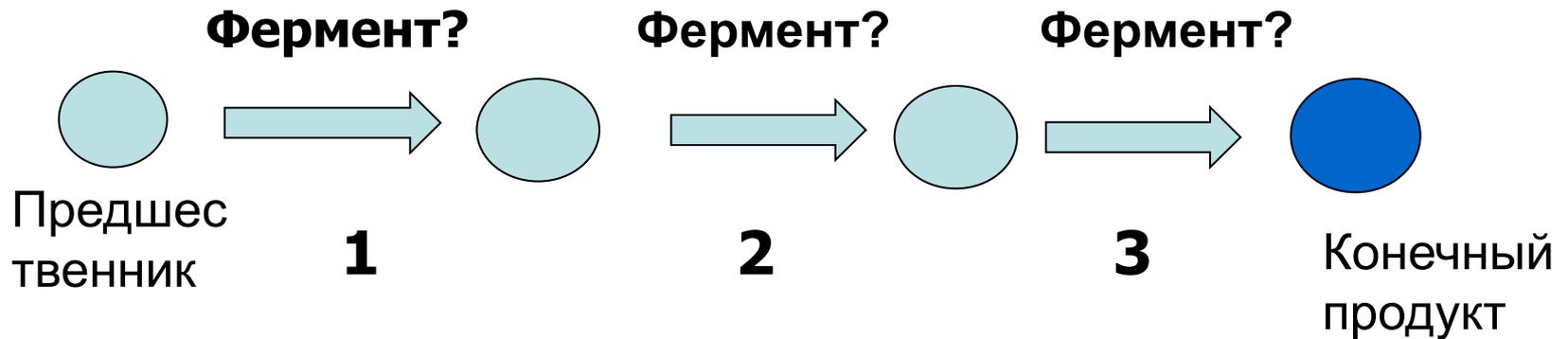
Трансформация



Чем **ближе** два гена друг к другу – тем **чаще** они будут передаваться вместе

$$R_f = \frac{\text{число трансформантов с одним геном}}{\text{общее число всех трансформантов}}$$

Задачи на порядок генов в пути биосинтеза вещества



Путь биосинтеза – это порядок химических реакций

(НЕ то же, что порядок генов в опероне)

№ 454*. Три независимо полученных гистидинзависимых мутанта были обозначены как *hisA*, *hisC* и *hisD*. Клеточные суспензии мутантов были высеяны штрихами на чашку с агаризованной глюкозо-солевой (минимальной) средой с добавлением ограниченного количества гистидина, достаточного для обеспечения слабого роста клеток *his*-мутантов.

Штрихи расположены на среде в виде треугольника таким образом, чтобы они не соприкасались друг с другом (рис. 7.1)

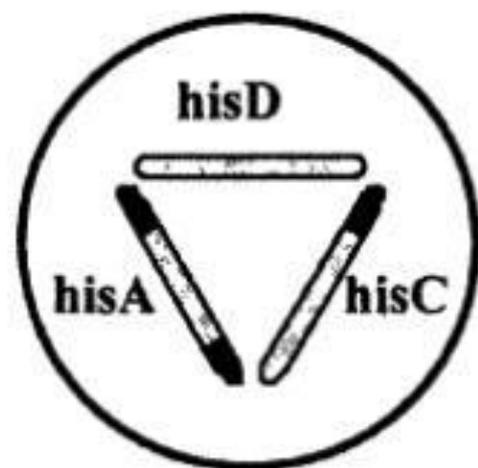
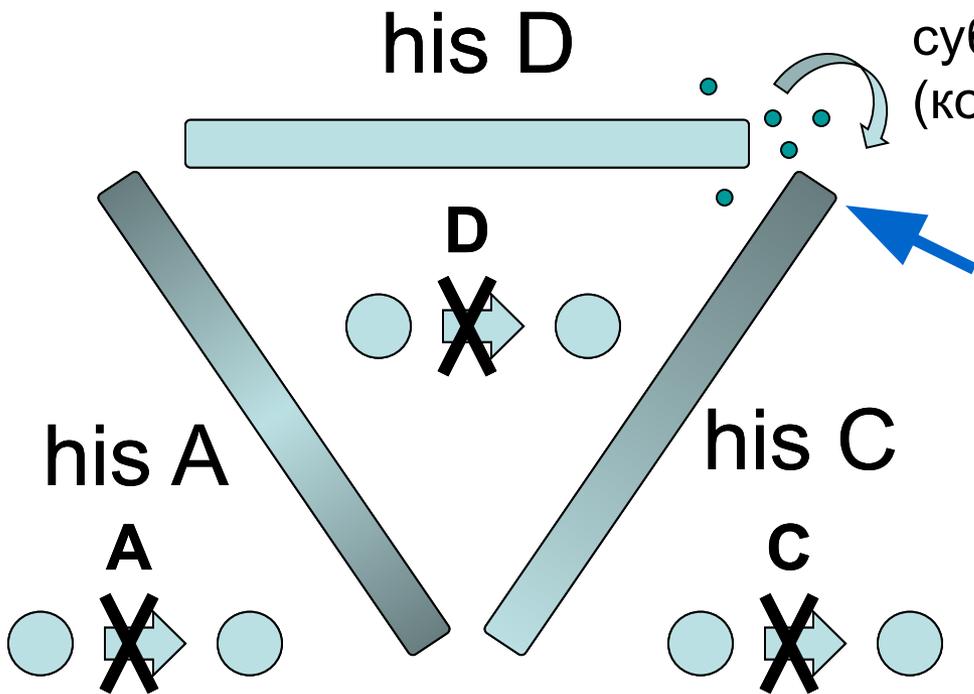
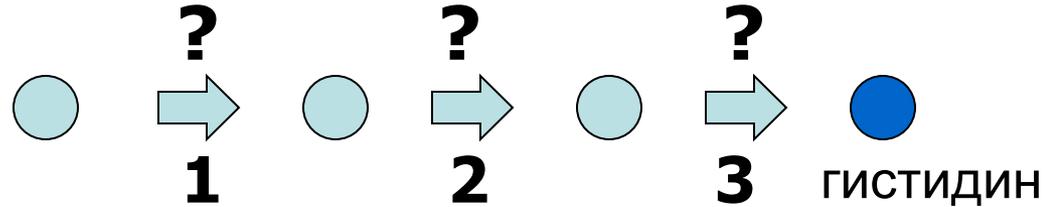


Рис. 7.1
к задаче № 454

На обоих концах штриха *hisA* и на одном конце штриха *hisC*, обращенном к *hisD*, отмечен обильный рост (зачернен).

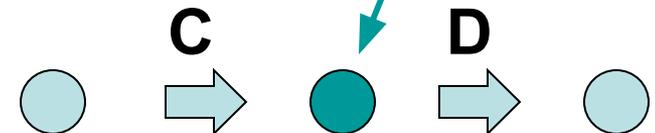
Объясните природу обильного роста клеток. Зачем необходимо добавлять ограниченное количество гистидина в среду? В каком порядке в пути биосинтеза гистидина расположены энзиматические этапы, блокированные мутациями *hisA*, *hisC* и *hisD*?

454. Ход решения

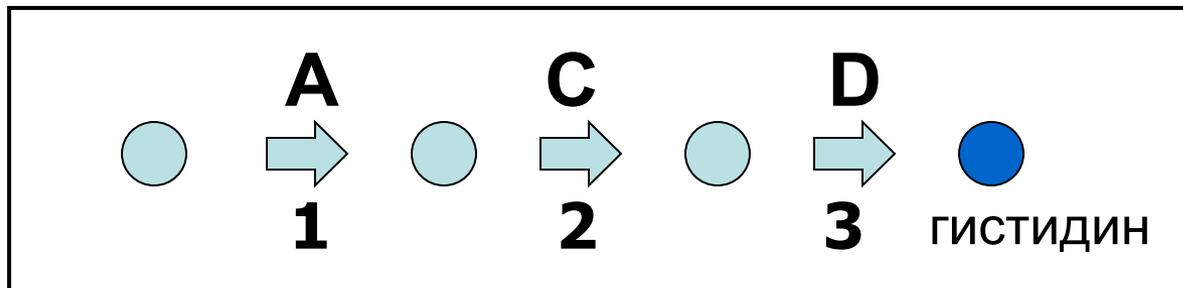
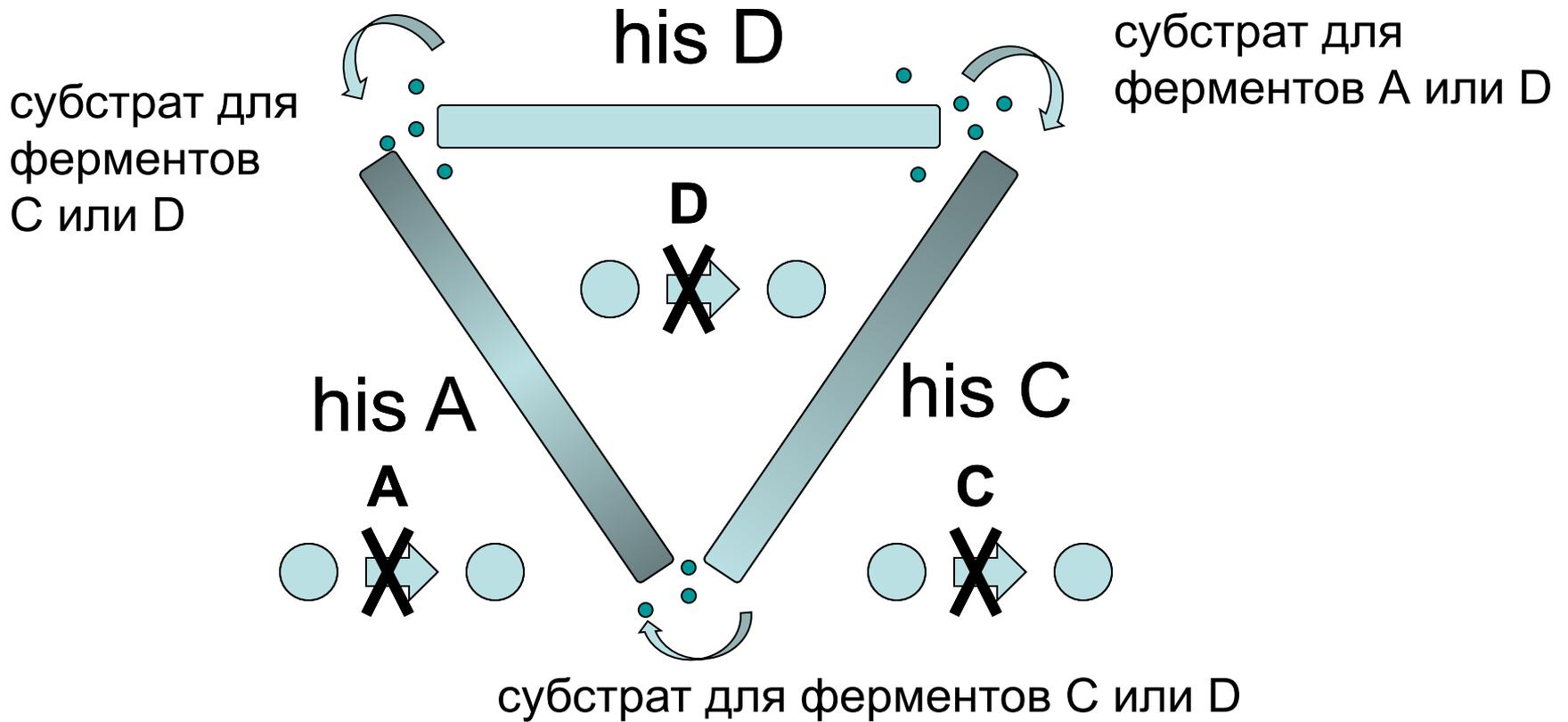


Мутант по ферменту С получает от мутанта по ферменту D недостающий предшественник для синтеза гистидина

Вывод: Там, где есть рост, блокирован фермент, работающий **раньше**



454. Ход решения и ответ



Аналогичная задача с четырьмя
генами (домашнее задание)

Глазер № 456

№ 456. Четыре независимо полученных аргининзависимых мутанта были обозначены как *argE*, *argG*, *argH* и *argI*. Клеточные суспензии мутантов были высеяны штрихами на чашку с агаризованной глюкозо-солевой (минимальной) средой с добавлением ограниченного количества аргинина, достаточного для обеспечения слабого роста клеток *arg*-мутантов.

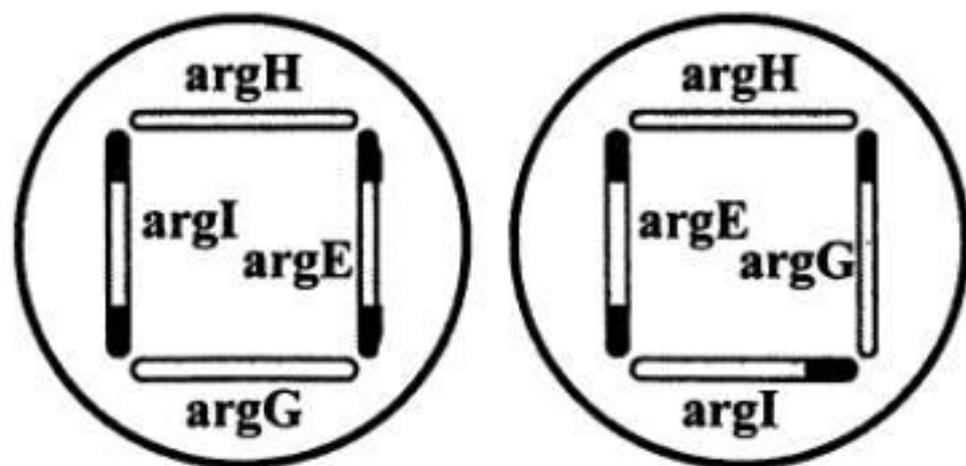
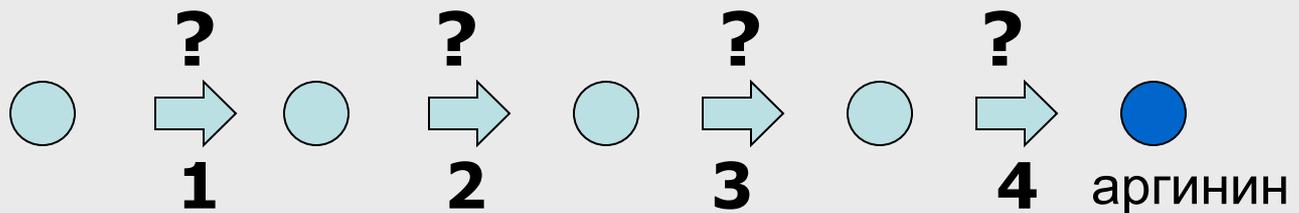
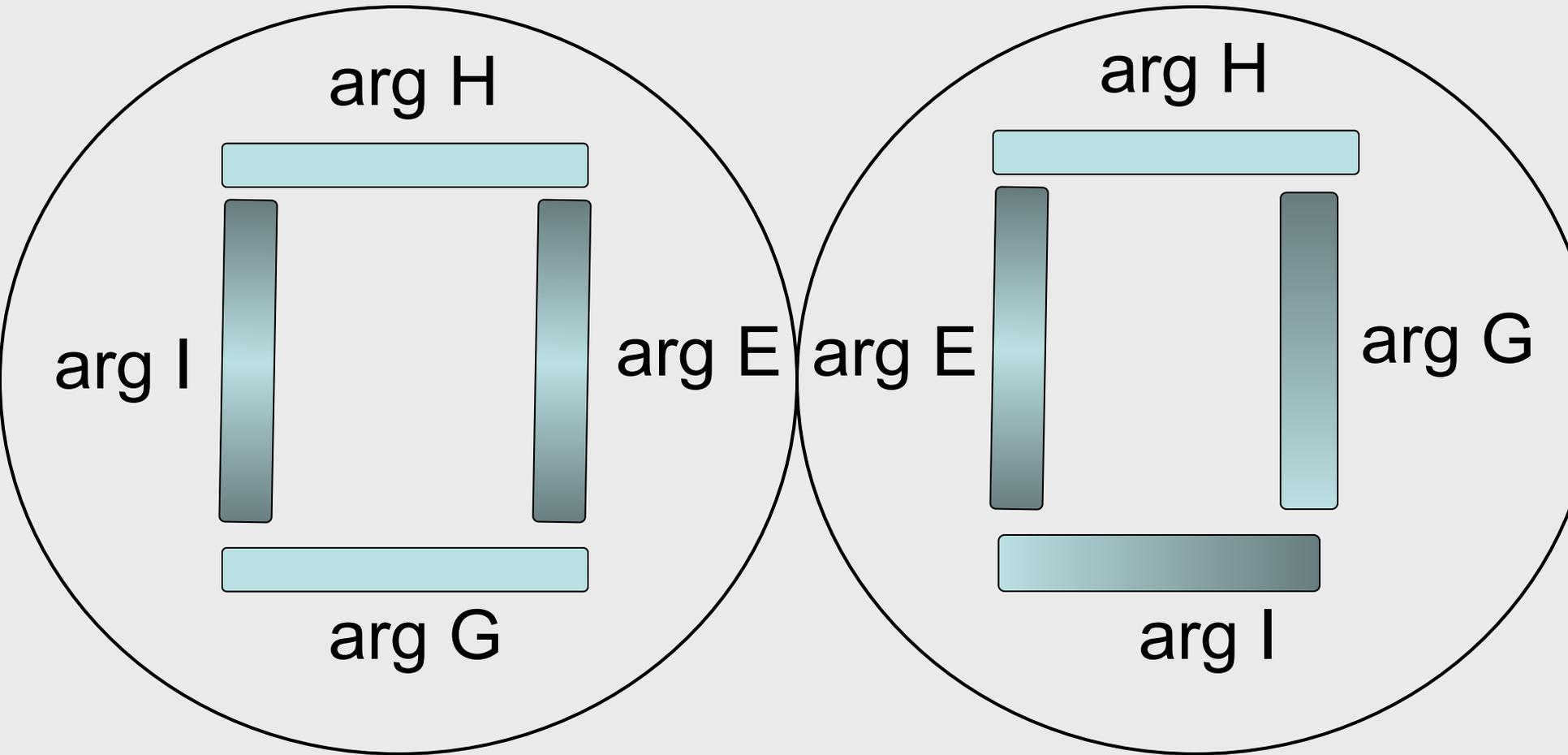


Рис. 7.3 к задаче № 456

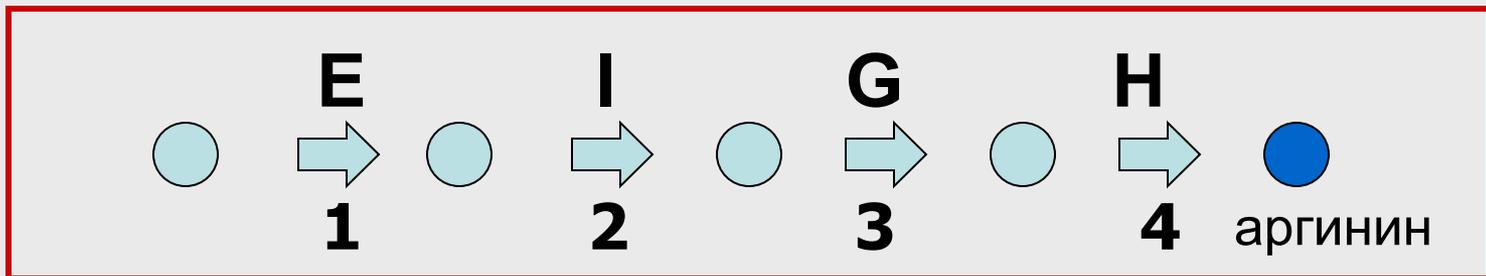
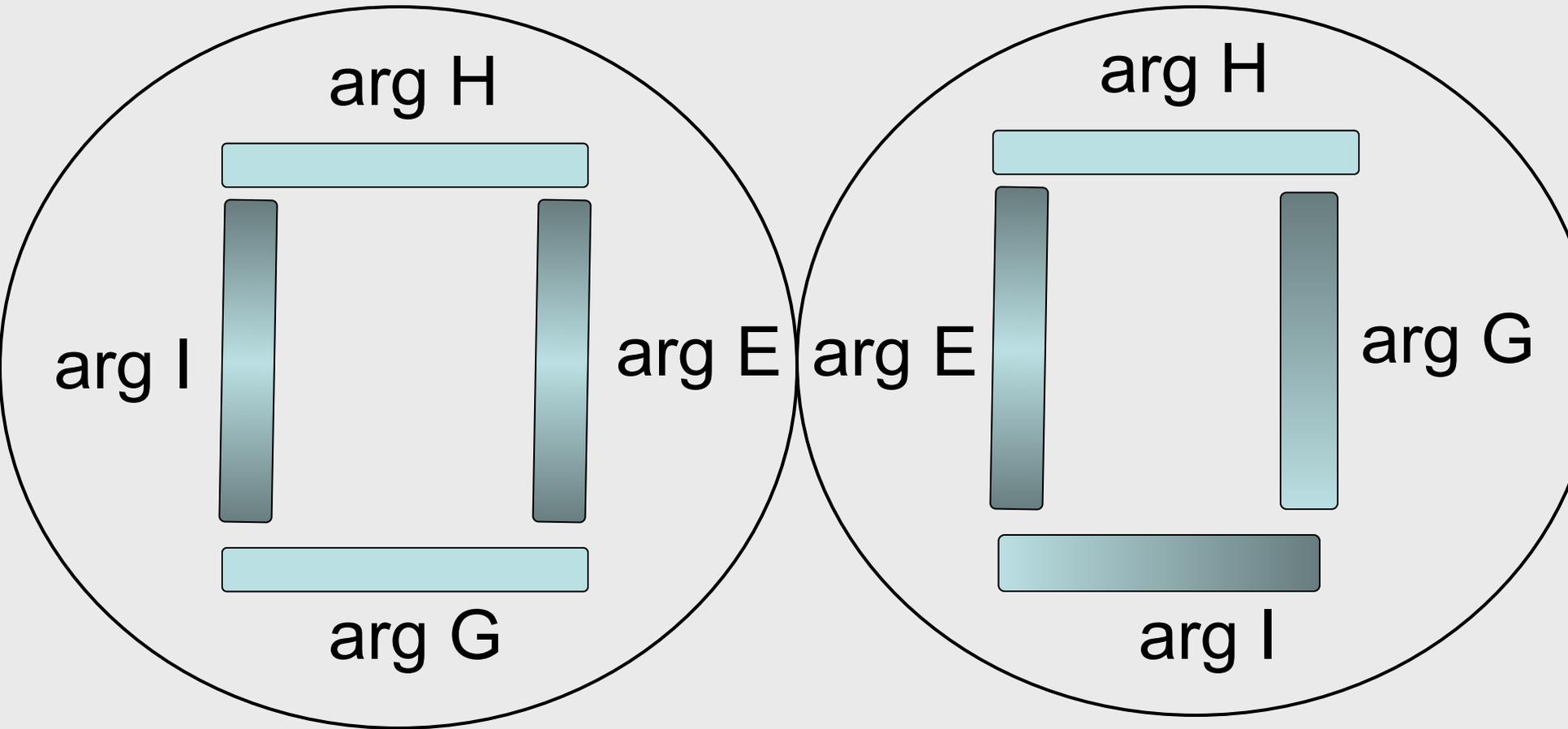
Штрихи расположены на среде в виде четырехугольника таким образом, чтобы они не соприкасались друг с другом (рис. 7.3). На некоторых концах штрихов отмечен обильный рост (зачернен).

Объясните природу обильного роста клеток. Зачем необходимо добавлять ограниченное количество аргинина в среду? В каком порядке в пути биосинтеза аргинина расположены энзиматические этапы, блокированные мутациями *argE*, *argG*, *argH* и *argI*?

456. Схема

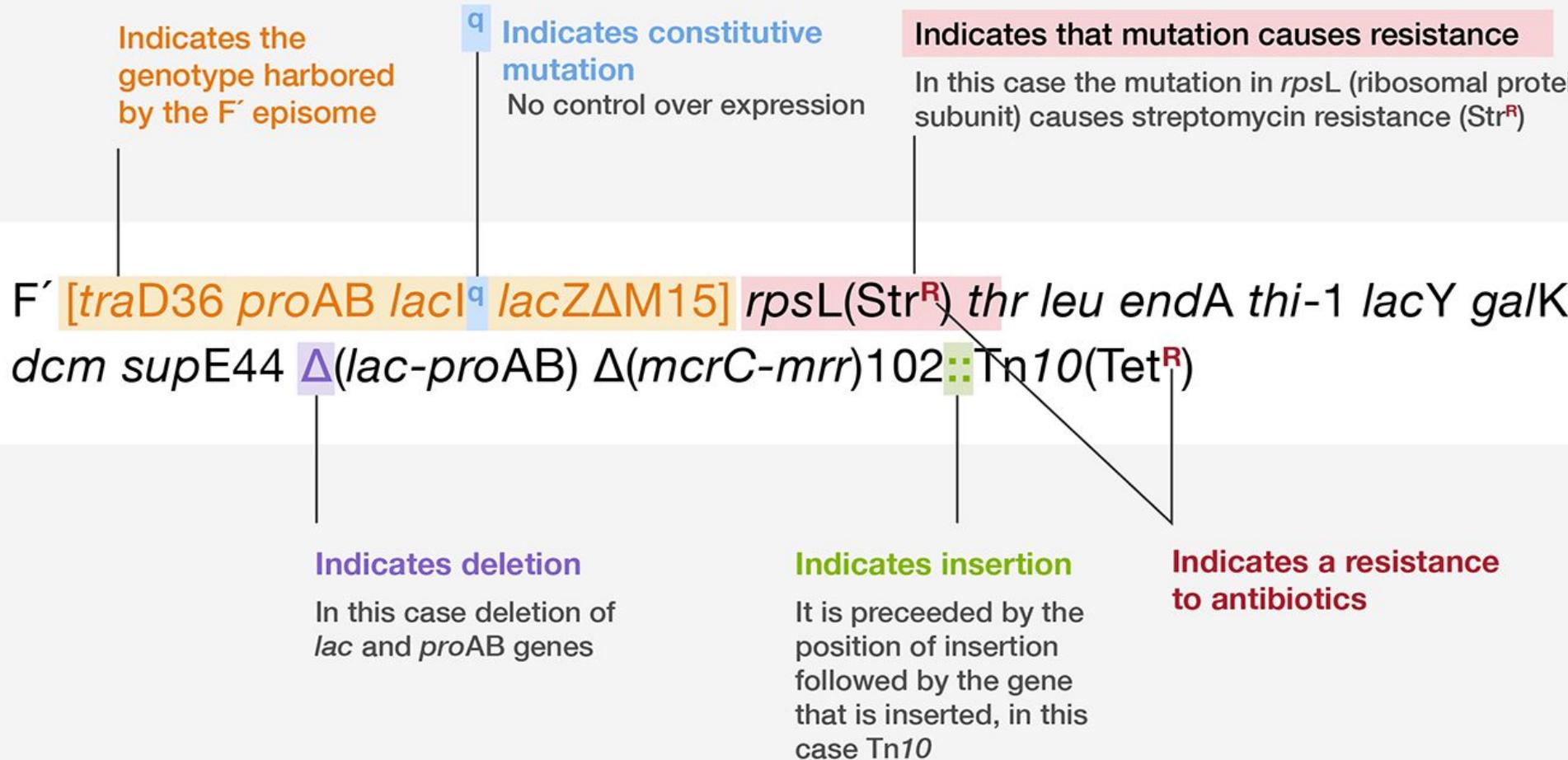


456. ОТВЕТ



Лишние слайды

Пример записи генотипа бактериального штамма



Genotype of bacterial strain [INV110](#)