

MUTAGENEZE INDUKOVANÁ TRANSPOZONY (TRANSPOZONOVÁ MUTAGENEZE)

Nejrozšířenější použití transpozonů je mutageneza za účelem lokalizace genů a jejich charakterizace.

Výhody:

- 1. vyšší frekvence mutace než při klasické mutagenezi
- 2. úplná blokáda transkripce a translace zasažených genů – dosažení plně mutantního fenotypu
- 3. silný polární účinek (zejména na operony)
- 4. ve většině případů jen jediná mutace na buňku (inzerce jediného transpozonu)
- 5. možnost přímé selekce mutant (geneticky podle markeru na transpozonu, nebo s využitím sekvence transpozonu jako sondy)
- inzerce transpozonu pro účely mutageneze **nemohou být směrovány do určitého genu**. Technika využívá jen skutečnosti, že inzerční místa transpozonu jsou víceméně náhodná. Požadované mutace jsou skrínovány mezi větším počtem inzerčních mutant normálním způsobem.
- **Vlastnosti transpozonu vhodného pro mutagenezu:**
 - a) začleňování do náhodných míst (Tn5, Tn7, Mu)
 - b) stabilita inzerce (odstranění genu pro transponázu)

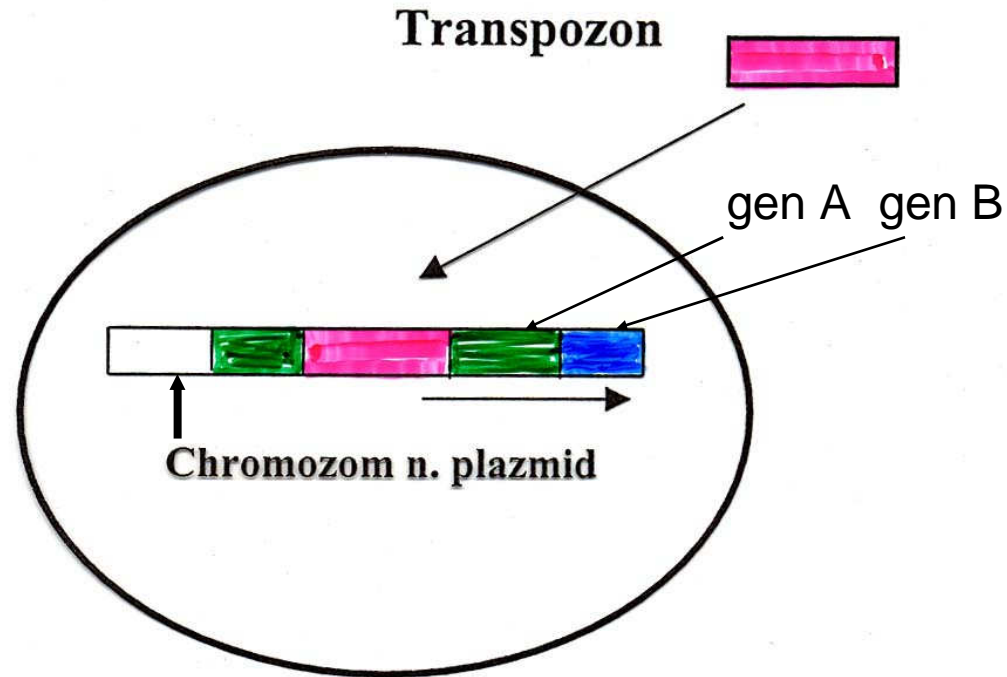
VÝHODY VYUŽITÍ TRANSPOZONŮ PŘI ANALÝZE PROKARYOTICKÉHO GENOMU

- 1. Transpozony mohou být začleněny ve velkém počtu míst na bakteriálním chromozomu a plazmidech (prakticky v každém genu nebo v jeho blízkosti).
- 2. Geny se začleněným transpozonem ztrácejí plně svou funkci (nulové mutace).
- 3. Fenotyp inzerčních mutací je vázán na rezistenci k antibiotikům podmíněnou genem transpozonu (snadná selekce mutace v novém hostiteli selekcí AntR).
- 4. Inzerční mutanty lze po transpozonové mutagenézi detekovat s vysokou frekvencí (kmeny s více mutacemi jsou vzácné).
- 5. Inzerční mutace revertují přesnou excizí transpozonu, doprovázenou ztrátou transpozonu (frekvence zpětné mutace je ale velmi nízká).

VÝHODY VYUŽITÍ TRANSPOZONŮ PŘI ANALÝZE PROKARYOTICKÉHO GENOMU

- 6. Inzerce v operonech jsou silně polární. Lze určit, zda geny jsou součástí operonu (a jejich pořadí).
- 7. Transpozony mohou vyvolat delece v okolí svého začlenění. Lze tak připravit deleční mutanty vhodné pro mapování genů.
- 8. Transpozony představují přenosné oblasti homologie. Lze pomocí nich vnést do genomu další genetické elementy rekombinací.
- 9. Inzerce se při genetickém mapování chovají jako bodové mutace (transdukční křížení).
- 10. Lze získat specifické inzerce poblíž genu zájmu, nikoliv v něm samém (vnesení promotorů a dalších sekvencí na transpozonu – reportérové geny)

Mutace vyvolané transpozony



1. Inzerční inaktivace genu, do něhož se transpozon začlenil (negativní mutace) – změna fenotypu
2. Nabytí rezistence k antibiotiku (pozitivní mutace) – změna fenotypu
3. Polární mutace ovlivňující expresi sousedních genů – změna fenotypu
4. Označení místa, do něhož se transpozon začlenil

SITUACE VHODNÉ PRO VYUŽITÍ TRANSPOZONOVÉ MUTAGENEZE

- a. hledaná mutace má obtížně selektovatelný fenotyp
 - snížení počtu klonů, které nutno prověřit (mutanty *Nif*- deficientní v symbióze s rostlinou: genotyp může být *nod*- nebo *nif*-), identifikace genů, které jsou zapínány při poškození DNA nebo po vystavení buněk specifickým faktorům (transpozony s reportérovými geny)

- b. studovaný druh (kmen) je klasické mutagenezi nepřístupný
 - mutanty v metabolických drahách, např. auxotrofní

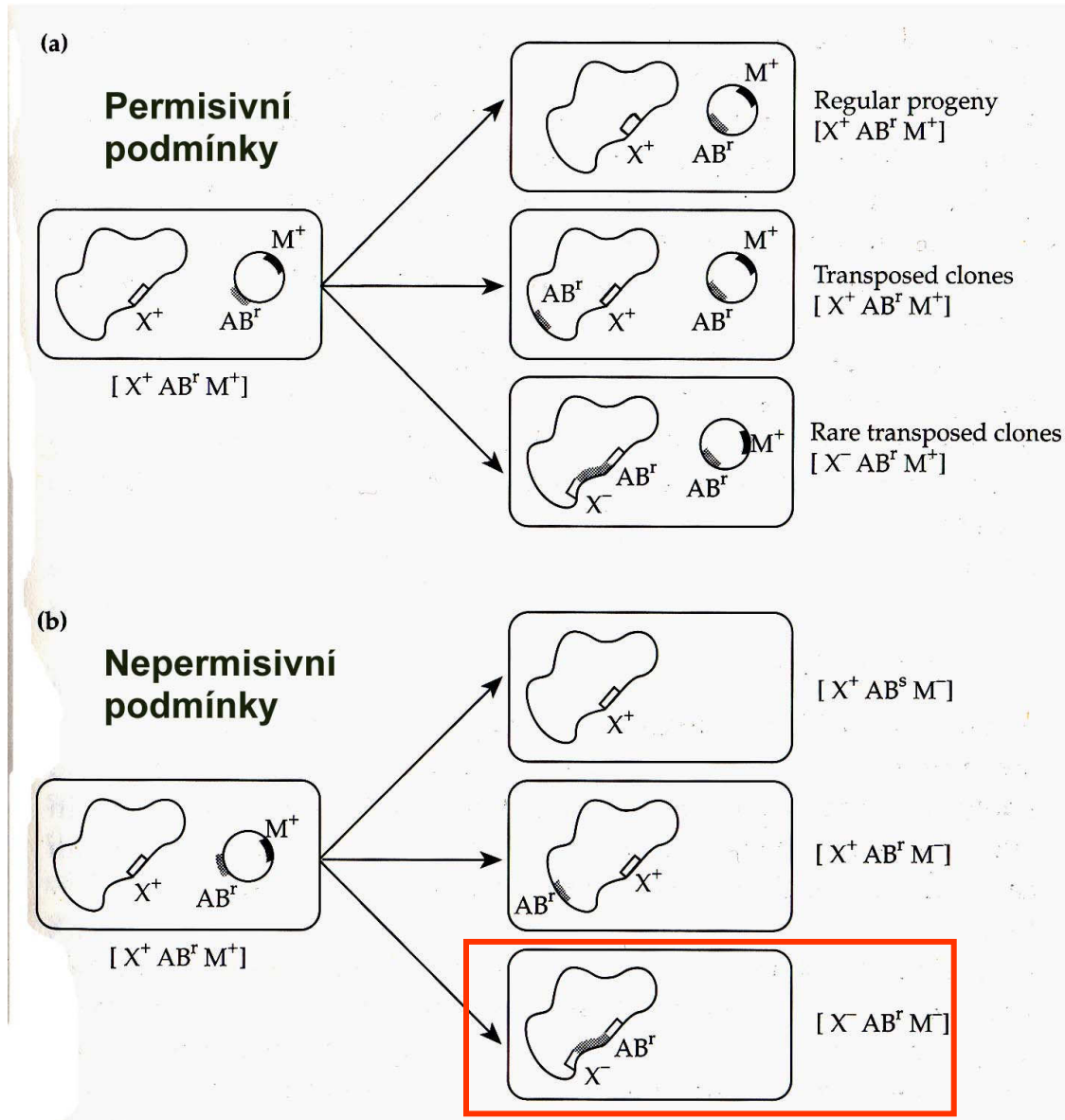
- c. kmen má několik podobných aktivit, znemožňujících přímý skrínig na fenotyp
 - gen je nejdříve klonován v jiném hostiteli (*E. coli*) a po mutagenezi je přenesen do původního kmene, kde se alely zamění homologní rekombinací („reverzní genetika“ - u druhů dosud geneticky málo prostudovaných)

SEBEVRAŽEDNÉ VEKTORY

Vektory používané pro dopravení transpozonu do buněk, v nichž mají navodit mutaci

- A. Vektory odvozené od fága lambda obsahující mutace *sus* - replikují se v buňkách *E. coli* obsahujících supresory; v buňkách *sup*- se chovají sebevražedně
- B. Vektory odvozené z promiskuitních plazmidů (konjugativních nebo mobilizovatelných) – po přenosu do cílové buňky se nereplikují
- C. Vektory s *ts* mutacemi v replikačním aparátu (při vyšší teplotě se nereplikují)
- D. Inkompatibilní plazmidy: první plazmid nese transpozon, po přenosu je z buňky vytěsněn druhým plazmidem

Použití sebevražedných vektorů k přenosu transpozonů



Vysvětlivky:

AB^r = ANT rezistence na T

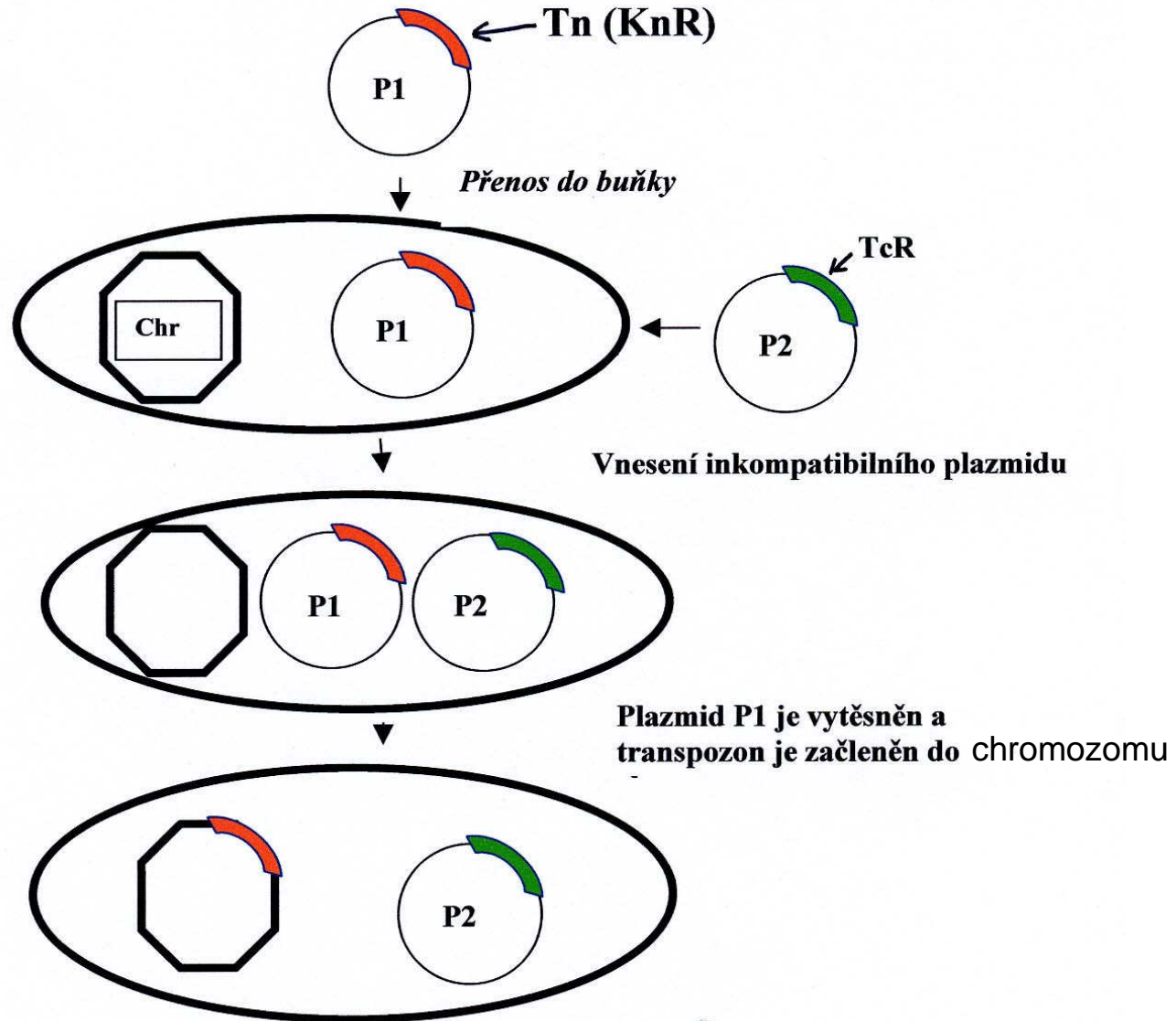
M = marker na vektoru

vektor se vyředil

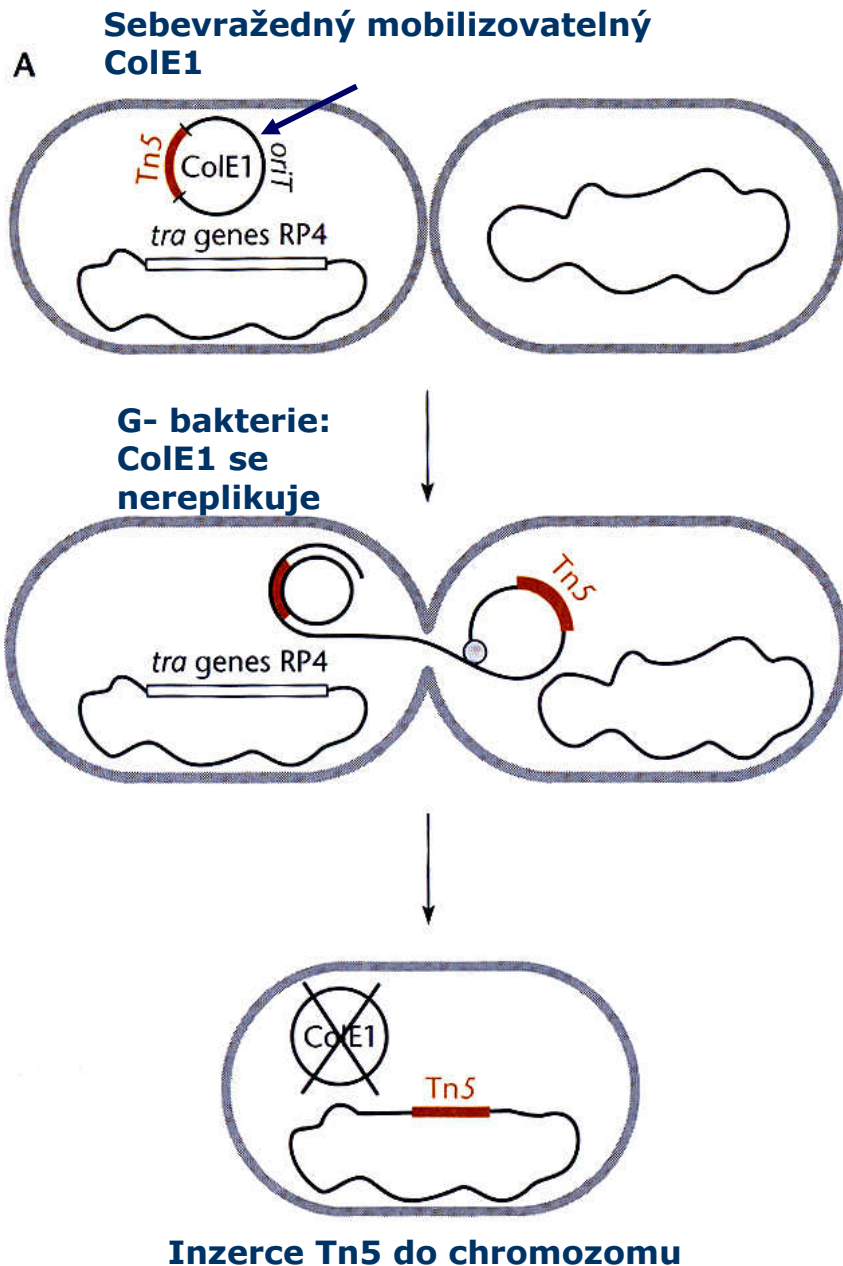
Tn začleněný mimo gen X

Tn začleněný do genu X

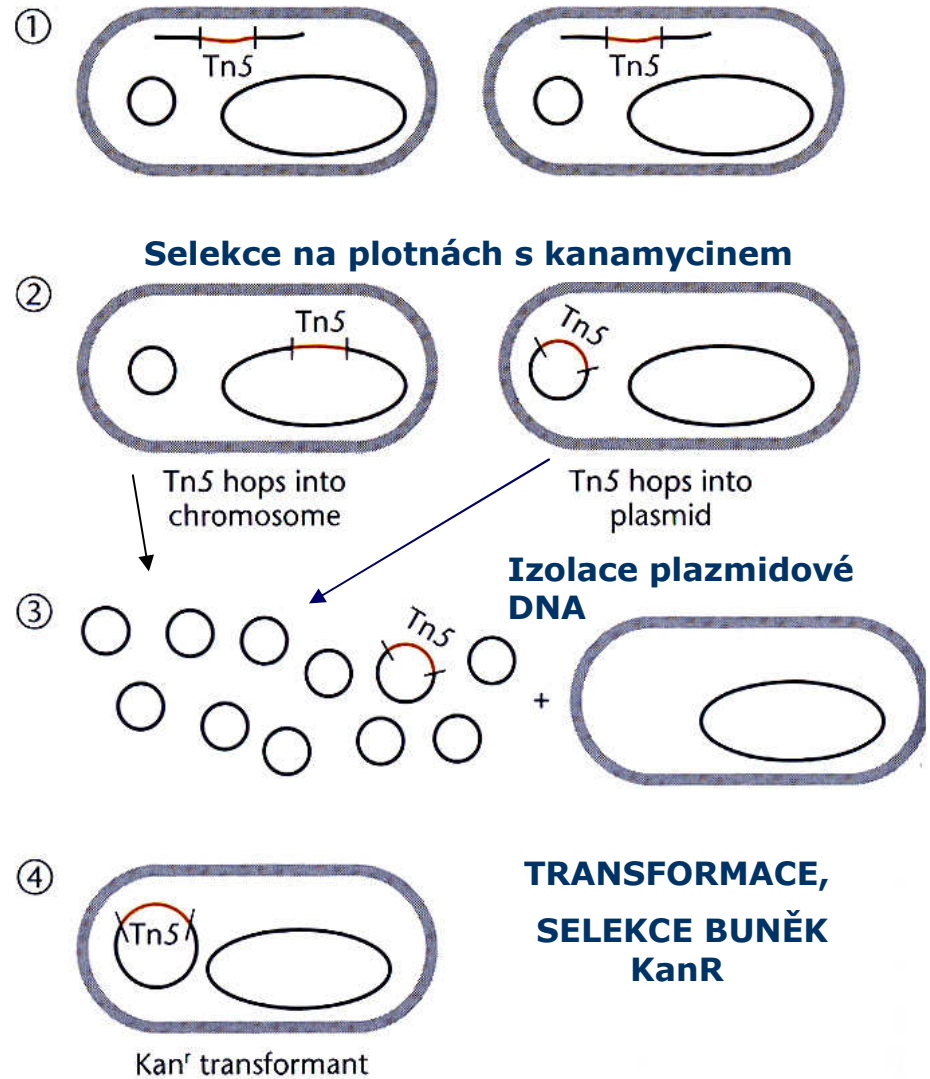
Využití inkompatibility pro vnášení transpozonů do chromozomu



MUTAGENEZE POMOCÍ TRANSPOZONU Tn5

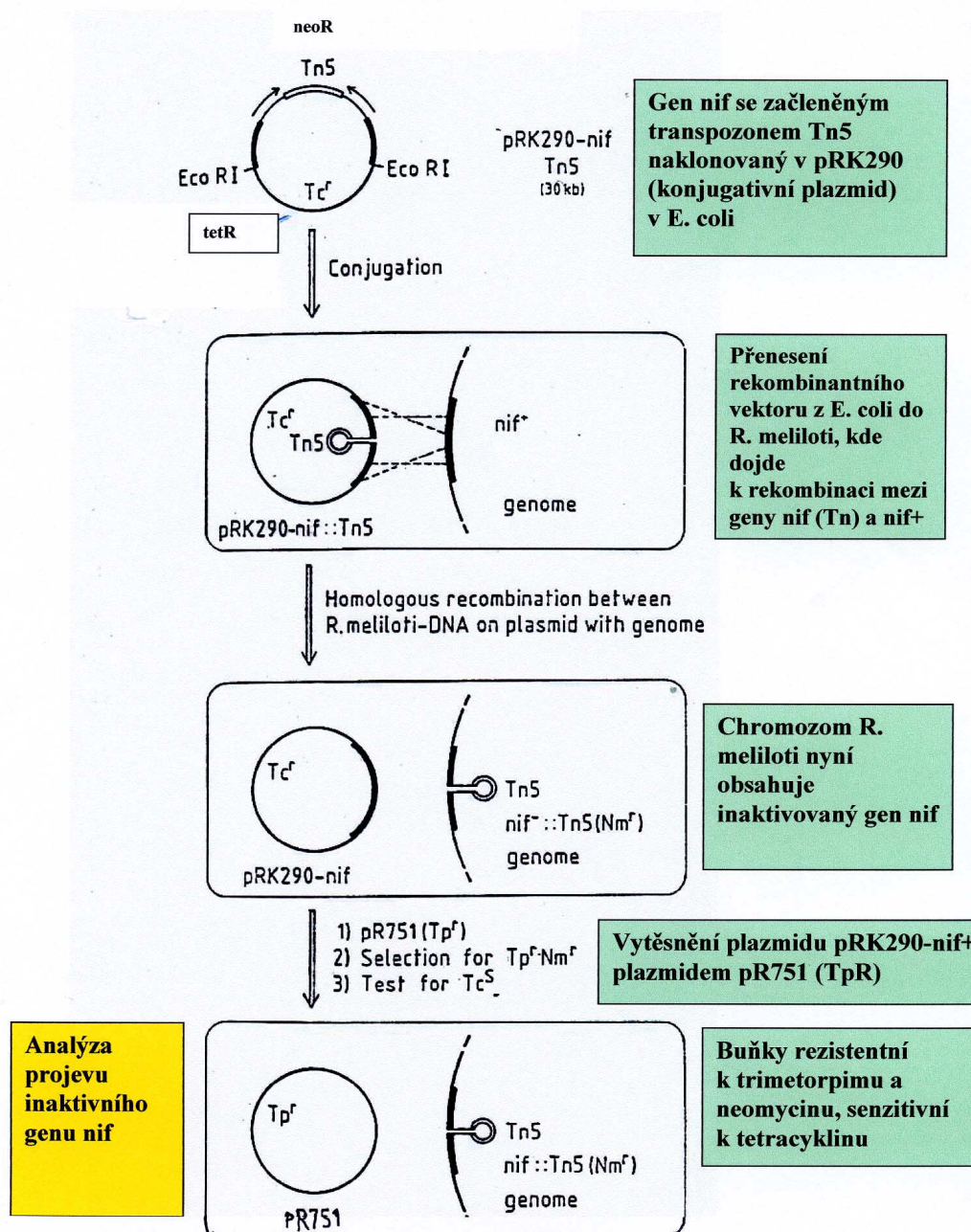


Náhodná mutagenese plazmidů - Vnesení Tn5 do buňky na sebevražedném vektoru



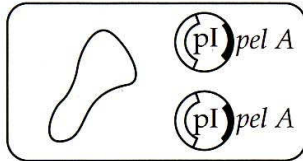
Vytváření mutací na plazmidu nebo v klonované DNA

Transpozonová mutageneza genu nif u Rhizobium meliloti



Izolace mutanty v genu pro pektátlyázu (pelA) Erwinia chrysanthemi

(a)



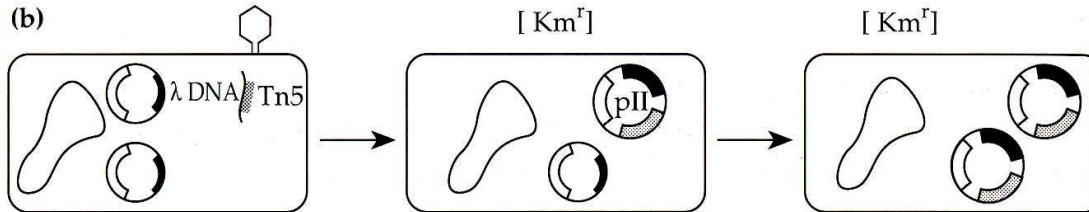
E. coli pIpelA⁺

klonování genu pelA z erwinie do *E. coli*, selekce fenotypu PelA+

vysokokopiový plazmid (pBR322)

mutagenese transpozonem Tn5 (Km^r) neseným fágem lambda

(b)

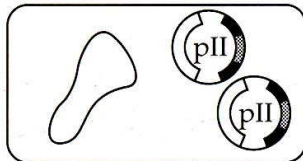


E. coli

E. coli pelA⁺ Tn5 Km^r

**Lambda
„Hopper“**

(c)

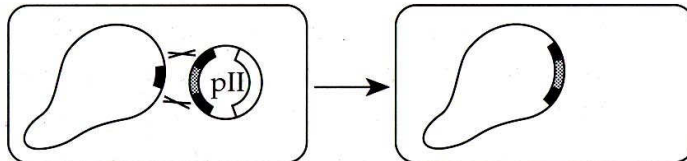


E. coli pIIpelA⁻ :: Tn5 Km^r

Selekce klonu v němž se Tn5 začlenil do plazmidu (pII) (vysoká konc. kanamycinu)

(eliminace buněk, v nichž je Tn5 začleněn do chromozomu)

(d)



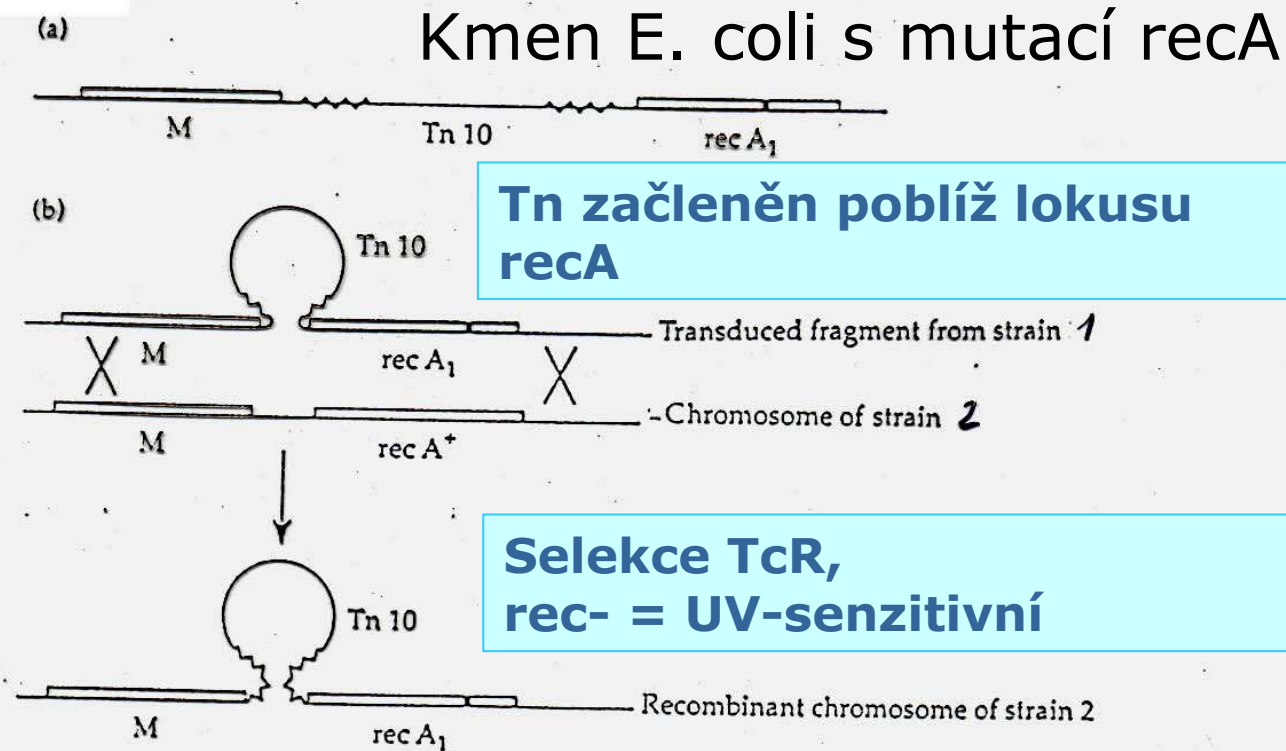
E. chrysanthemi
pelA⁺

E. chrysanthemi
pelA⁻ :: Tn5 Km^r

Selekce klonu PelA- (inzerce Tn5 do pelA)

přenos plazmidu pII do erwinie, pII se vyřadí (neschopen replikace), selekce klonů Km^r (tj těch, v nichž došlo k homologní rekombinaci a geny pelA⁺/pelA⁻ se zaměnily)

PŘENOS ALELY *recA*- PO OZNAČENÍ TRANSPOZONEM



Obr. 13.3. Příprava kmene *recA₁* (*E. coli*).

a) mapa transdukující DNA P1 z lyzátu kmene 1, nesoucího kopii Tn10 poblíž *recA₁*.
b) transdukce do kmene 2 (*recA⁺*), selekce na rezistenci k tetracyklinu. Mezi klony Tc^R lze vyhledat rekombinanty kmene 2, v nichž došlo k výměně alely *recA₁*.

STANOVENÍ FYZICKÉ LOKALIZACE GENŮ NA REPLIKONECH A MAPOVÁNÍ GENŮ

Zjištění, zda geny s určitou funkcí jsou umístěny na plazmidu nebo na chromozomu nebo zda jsou distribuovány na více replikonech není snadná úloha. „Transpozon targeting“ (cílené začlenění transpozonů) do genů napomáhá v řešení těchto úloh, jak dokresluje tento příklad:

- Předpokládalo se, že funkce týkající se onkogeneze u rostlin infikovaných *A. tumefaciens* se nacházejí na Ti plazmidu. Bylo izolováno 37 inzerčních mutantů Tn5 v kmenech obsahujících Ti plazmid a vykazujících změněnou virulenci. V každém z mutantních kmenů byly transpozony fyzicky lokalizovány na replikonech.
- Plazmidová a chromozomová DNA z těchto mutantů byla separována za užití standardních technik (rozdíl ve velikosti a nebo GC obsahu). Každá DNA byla hybridizována se značeným Tn5. Dvanáct mutací bylo chromozomálních a 25 nesených na plazmidu.

TRANSPONOVÁ MUTAGENEZE *IN VITRO*

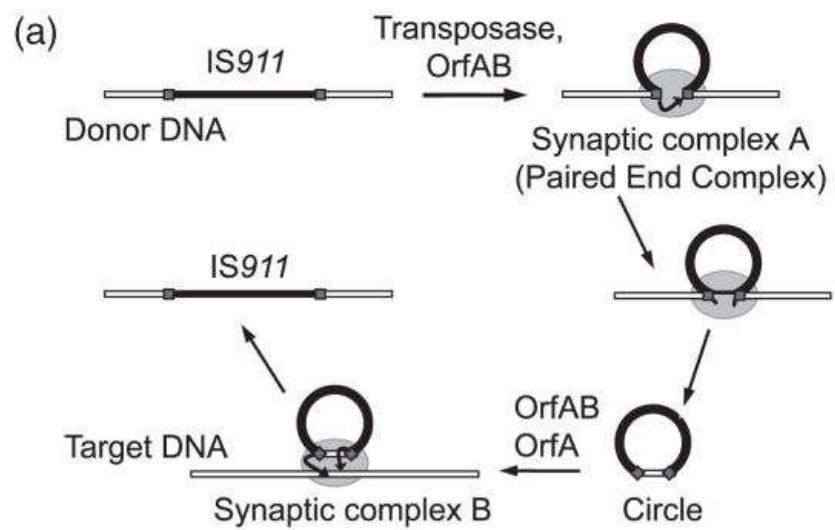
- **Nevýhody mutagenyze *in vivo*:**
 - částečná životaschopnost sebevražděných vektorů --- falešně pozitivní výsledky
 - omezená velikost cílového genu --- nutný rozsáhlý skrínig nebo selekce mutant
 - u některých bakteriálních druhů nejsou k dispozici vhodné transpozony

- **Průběh mutagenyze *in vitro*:**
- **Výchozí předpoklad: transponáza je schopna provést většinu reakcí též *in vitro***
 - k cílové DNA je přidána donorová DNA s transponem a enzym transponáza
 - lze použít mutovanou transponázu se zvýšenou účinností transpozice
 - lze použít transpozony postrádající gen pro transponázu (stabilní inserce)
 - cílovou DNA mohou být replikony nebo lineární úseky DNA, které lze pak zavést do buněk, kde se rekombinací začlení do chromozomu

- **Použití transpozomů**
- **Transpozom : transpon, na nějž byl *in vitro* navázán enzym transponáza**

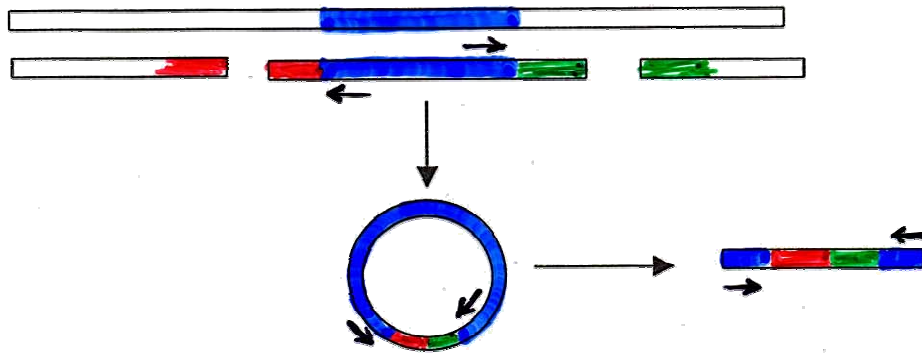
- Transpozom se připraví *in vitro* v prostředí bez Mg-iontů, čímž dojde k rozštěpení donorové DNA, ale transponáza zůstává přichycena na koncích. Tento meziprodukt se do buněk přenesou elektroporací, v nichž transponáza katalyzuje transpozici transponu do cílového místa. Enzym je brzy rozložen, takže k další transpozici nemůže docházet.

Průběh transpozice *in vitro*



Využití Tn pro izolaci genů

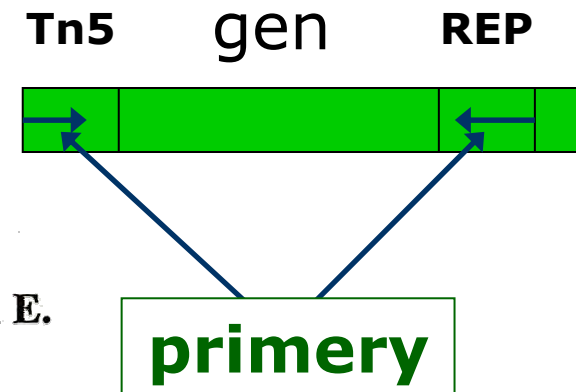
Inverzní PCR. Transpozon nese na svých koncích místa pro připojení PCR-primerů orientovaných do okolní sekvence. Štěpením chromozomové DNA RE (neštěpící Tn), ligací fragmentů vzniká „plazmid“, PCR amplifikuje sekvenci chromozomu obklopující transpozon.



Varianta PCR bez klonování a ligace

- jeden primer je odvozen z Tn5, druhý je komplementární k REP (repetitivní extragenové palindromy), které se nacházejí v počtu 500 kopií mezi chromozomovými geny u *E. coli* a dalších bakteriích (~ 1% genomu).

Po amplifikaci je amplifikován jediný úsek genomové DNA, z něhož lze připravit sondy a vyhledat gen, který je poblíž transpozonu (nebo do něhož se Tn začlenil)



MODIFIKACE TRANSPOZONŮ ROZŠIŘUJE MOŽNOSTI JEJICH POUŽITÍ

- 1. Náhrada genů pro **rezistence k antibiotikům**: deriváty Tn5 nesoucí sadu různých rezistencí k antibiotikům. Jsou vhodné v kmenech, kde rezistence ke kanamycinu není účinně exprimována.
- 2. Přidání **oriV** z plazmidu Sel01 do Tn5 přeměnila tento transpozon na plazmid, který se může replikovat v *E. coli*.
- 3. Zavedení **oriT (mob)** sekvence z RK2 dovoluje mobilizaci chromozomu, do něhož je modifikovaný transpozon inzerován, za předpokladu, že v donorové buňce je přítomen pomocný plazmid RK2. Možnost křížení kmenů konjugací.
- 4. Do blízkosti konců transpozonu lze zavést *in vitro* sekvence odpovídající **místům pro RE**. Jestliže je takto modifikovaný transpozon integrován do plazmidu, který tato restriční místa nemá, představují pak koncové sekvence transpozonu jedinečná místa pro klonování a restriční mapování.
- 5. **Fyzikální separaci transponázového genu** od zbytku elementu se vytváří minitranspozon. Když jsou tyto dvě části přítomny ve stejné buňce (na stejném nebo různých vektorech), exprese transponázy (obvykle pod kontrolou jiného, inducibilního promotoru) dovoluje transpozici minitranspozonu do cílového místa nebo míst - transponovaný element (minitranspozon) v místě začlenění se sám nemůže dále transponovat a tak představuje stabilní marker a irreverzibilní mutaci.

TABLE 4. Examples of Genetically Engineered Transposons

Element	Marker(s)	Size (kb)	Special feature(s)	Use
Tn3- <i>ApKm</i>	<i>ApKm</i>	11.7	Carries replication region of R1	Mobile origin of replication
Tn1725	<i>Cm</i>	8.9	Tn1722 with <i>Cm</i> ^r determinant of plasmid <i>Sa</i> ; <i>EcoRI</i> sites in both IR sequences	Tn-mutagenesis; Tn can be excised to leave 35 bp insert with <i>EcoRI</i> site
Tn1732	<i>Km</i>	6.7	Tn1722 with <i>Km</i> ^r determinant of Tn2680	As for Tn1725
Tn1737 <i>Km</i>	<i>Km (lac)</i>	9.8	Tn1722 with <i>Km</i> ^r determinant and promoterless <i>lacZ</i> gene at one end	Promoter probe; β -galactosidase production requires external promoter; type I operon fusions formed
Tn1737 <i>Cm</i>	<i>Cm (lac)</i>	11.1	Tn1722 with <i>Cm</i> ^r determinant and promoterless <i>lacZ</i> gene at one end	Promoter probe; alternative to Tn1737 <i>Cm</i> .
Tn5- <i>lac</i>	<i>Km (lac)</i>	12	Tn5 with promoterless <i>lacZ</i> gene replacing most of IS50L	Promoter probe; type I operon fusions formed
Tn50R <i>Flac</i>	<i>Km (lac)</i>		Tn5 with <i>lacZ</i> gene lacking transcription and translation signals replacing most of IS50L	Generates protein fusions; can be used to investigate translation control of gene expression
Tn <i>phoA</i>	<i>Km (phoA)</i>	7.7	Tn5 with alkaline phosphatase gene (<i>phoA</i>) lacking transcription and translation signals replacing most of IS50L	Generates protein fusions; used to study structure of membrane proteins and mechanisms of secretion of exported proteins
Tn5 <i>oriT</i>	<i>Km (oriT)</i>	6.5	Tn5 with conjugal transfer origin from RK2	Mobile transfer origin; chromosome insertions generate conditional Hfr strains (require IncP plasmid for transfer)
Tn5 <i>luxAB</i>	<i>Km (lux)</i>		Tn5 with <i>luxAB</i> genes lacking transcription signal replacing most of IS50L	Promoter probe; alternative to Tn5 <i>lac</i> ; operon fusions detected by bioluminescence
Tn10 <i>kan</i>	<i>Tc</i>	8.2	Carries <i>Km</i> ^r determinant of Tn5	Alternative to Tn10
Mup <i>ApI</i>	<i>Ap</i>	37.5	Mu derivative formed by acquisition of Tn3 followed by deletion of nonessential Mu and Tn3 sequences	Plaque forming, marked alternative to Mu
Mud11	<i>Ap (lac)</i>	37	Derivative of Mu with promoterless <i>lacZ</i> gene near S end of phage	Forms type I operon fusions to express β -galactosidase activity
Mud1770-1	<i>ApKm (lac)</i>		Derivative of Mud11 with <i>Km</i> ^r gene	As Mud11 with alternative selection
Mud11678	<i>Ap (lac)</i>		Mini Mu, i.e., deleted derivative of Mud1770-1	As Mud11, but insertion smaller
Tn917 <i>cam</i>	<i>EryCm</i>	6.5	Contains promoterless <i>cat</i> gene as a promoter probe	Forms type I operon fusions to express <i>Cm</i> resistance

Data from Berg et al. (1989).

Table 3. Tn5 derivatives carrying portable promoters, alternative marker genes, and useful sites

Use	Designation in original reference	Antibiotic resistance and novel sequences	Length (kb)
Outward reading promoters	Tn5-tac1	Km ^r , <i>ptac</i>	4.6
	Tn5-B50	Tc ^r , <i>pnpIII</i>	5.0
	Tn5-B60	Km ^r , <i>ptac</i>	5.0
	Tn5-B61	Gm ^r , <i>ptac</i>	5.5
Replication/mobilization origins	TnV	Km ^r , <i>ori</i> pSC101	~6
	Tn5- <i>oriT</i>	Km ^r , <i>oriT</i> (RK2)	6.5
	Tn5-Mob	Km ^r , <i>oriT</i> (RP4)	7.8
	Tn5-B11	Gm ^r , <i>oriT</i> (RP4)	8.4
	Tn5-B12	Gm ^r , Sp ^r , <i>oriT</i> (RP4)	10.2
	Tn5-B13	Tc ^r , <i>oriT</i> (RP4)	9.4
Sequencing primer sites	Tn5seq1	Km ^r , pT7, pSP6	3.2
	Tn5 <i>supF</i>	<i>supF</i>	0.3
Novel antibiotic resistance genes	Tn5-Tc2	Tc ^r	5.1
	Tn5-Cm	Cm ^r	3.9
	Tn5-Gm	Gm ^r	7.5
	Tn5-Tp	Tp ^r	5.2
	Tn5-Sm	Sm ^r	5.2
	Tn5-Ap	Ap ^r	5.0
	Tn5.7	Tp ^r , Sm ^r , Sp ^r	7.6
	Tn5-233	Gm ^r /Km ^r , Sm ^r /Sp ^r	6.6
	Tn5-235	Km ^r , <i>lacZY</i>	10.0
	Tn5-GmSpSm	Gm ^r , Sp ^r , Sm ^r	6.8
	Tn5-751	Km ^r , Tp ^r	9.0
	Mini-Tn5 Sm/Sp	Sm ^r , Sp ^r	2.1
	Mini-Tn5 Tc	Tc ^r	2.2
	Mini-Tn5 Cm	Cm ^r	3.5
	Mini-Tn5 Km	Km ^r	2.3
	Other marker genes	Tn5 <i>Bgl</i> ⁺ ^a	Km ^r , <i>bgl</i>
Tn5 <i>Amy</i> ⁺ ^b		Km ^r , <i>amy</i>	8.7
Tn5- <i>tox</i> ^c		Km ^r , <i>tox</i>	10.5
Tn5- <i>Lux</i> ^d		Km ^r , <i>luxAB</i>	6.6
Mini-Tn5 <i>bar</i> ^e		<i>bar</i>	2.5
Mini-Tn5 <i>mer</i> ^f		<i>mer</i>	4.5
Mini-Tn5 <i>ars</i> ^g		<i>ars</i>	5.0
Restriction mapping		Tn5 <i>cos</i>	Km ^r , Nm ^r
Plasmid curing	Tn5- <i>rpsL</i>	Km ^r , Nm ^r	7.6
	Tn5-B12S	Km ^r , Nm ^r , <i>sacBR</i>	9.9
	Tn5-B13S	Km ^r , Nm ^r , Tc ^r , <i>sacBR</i>	13.2
Multiple unique restriction sites	Tn5-K20	Km ^r , Nm ^r , Tc ^r	9.5
	Tn5-K28	Sm ^r , Tc ^r	7.4

^a*Bgl*⁺, ability to ferment cellobiose.

^b*Amy*⁺, ability to degrade starch.

^c*tox*, delta endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis*.

^d*Lux*, bioluminescence.

^e*bar*, resistance to the herbicide bialaphos; vector designated as pUT/PIT by Herrero et al. (48).

^f*mer*, resistance to mercuric salts and organomercurial compounds; vector designated as pUT/Hg by Herrero et al. (48).

^g*ars*, resistance to arsenite; vector designated as pUT/Ars by Herrero et al. (48).

BAKTERIOFÁG Mu - GENETICKÁ MAPA

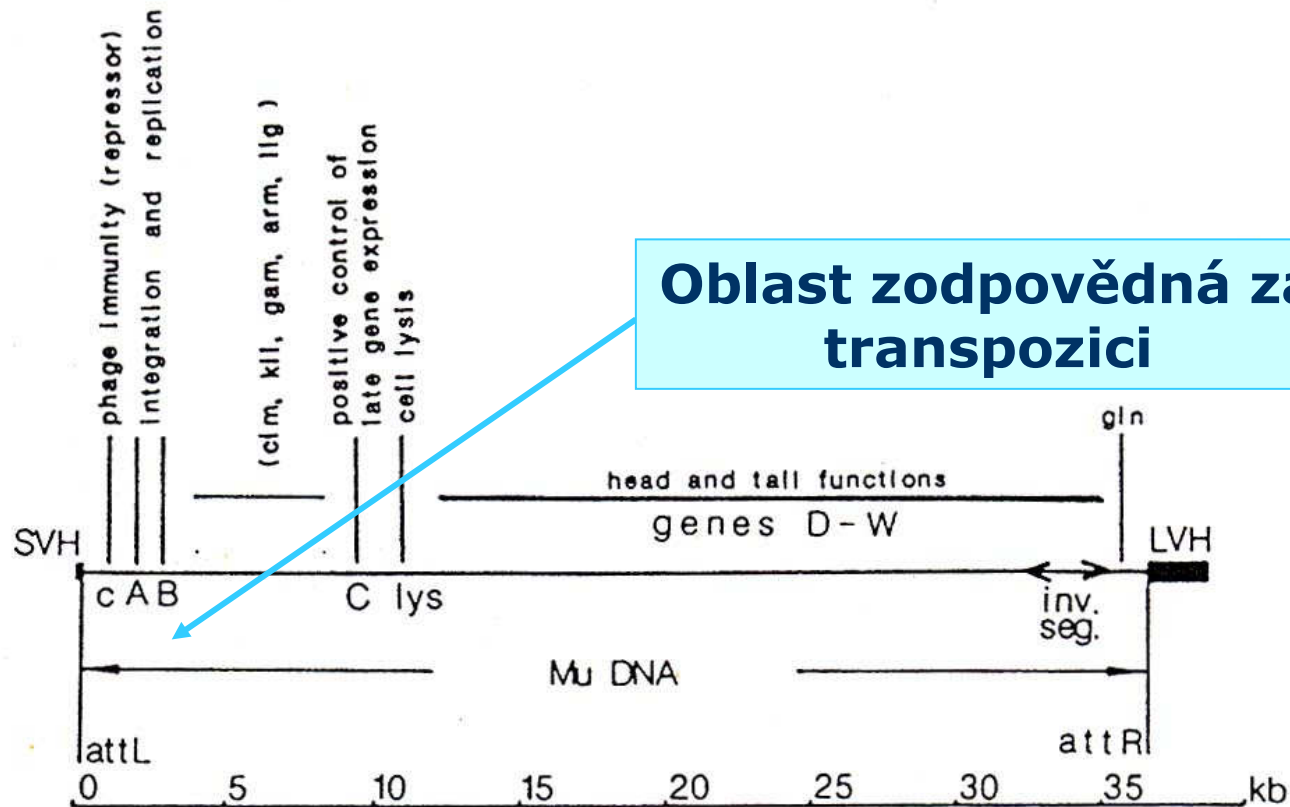


Fig. 12. A schematic representation of bacteriophage Mu. SVH, short (150 bp), variable host sequence; LVH, long (approx. 1.5 kb), variable host sequence; *attL*, *attR*, ends of Mu required for transpositional integration and replication; *inv. seg.*, 3 kb invertible segment (also called G-loop) determining tail-fiber production and, hence, phage host range; *gln*, gene for invertase that mediates inversion of *inv. seg.*

Fág Mu infikuje široké spektrum G- bakterií

MINITRANSPOZONY = INZERČNĚ-DELEČNÍ DERIVÁTY FÁGA Mu

Table 5.1 Properties of Commonly Used Mud Derivatives

Element ^a	AKA ^b	Fusion ^c	kb ^d	Marker ^e	Genes ^f	Reference
Mud1 (Ap ^r , lac)	Mud1	O	37.2	Ap	cts A ⁺ B ⁺	1
Mud301 (Ap ^r , lac)	Mud2	G	35.6	Ap	cts A ⁺ B ⁺	2
Mud1-8	MudA	O	37.2	Ap	cts A(Am) B(Am)	3
Mud2-8	MudB	G	35.6	Ap	cts A(Am) B(Am)	3
MudI1734	MudJ	O	11.3	Km	cts Δ(AB)	4
MudII1734	MudK	G	9.7	Km	cts Δ(AB)	4

^aOriginal designation.

^b"Also known as"; alternate designation.

^cO, operon (transcriptional) fusion; G, gene (translational; protein) fusion.

^dLength of element DNA in kilobases.

^eSelectable antibiotic resistance marker

^fGenotype of repressor (c) and transposase (AB) genes.

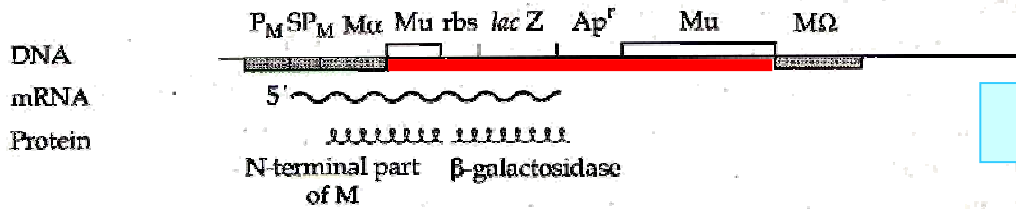
GENOVÉ FÚZE *IN VIVO*

- **Využití modifikovaných transpozonů pro přípravu genových fúzí**
- **Mud(ApR, lacZ) je modifikovaný fág Mu, u něhož byly deletovány geny pro lytické funkce a nahrazeny genem bla (AmpR)(selekce) z Tn3 a lacZ (reportér) z E. coli K12. Byly připraveny dvě serie Mud (Ap, lacZ):**
- 1 . U první serie byly zachovány translační signály (rbs) genu *lacZ*, ale byl deletován promotor tohoto genu. Gen *lacZ* může být exprimován, když se Mud inzertuje distálně od jiného promotoru ve správné orientaci. Pozorování změn hladiny exprese b-galaktozidázy po změnách podmínek prostředí umožňuje studovat způsob regulace daného genu (nebo operonu). Tento způsob, zvaný operonové fúze, byl intenzívně využíván při studiu exprese genů, jejichž fenotyp se obtížně monitoruje.

GENOVÉ FÚZE *IN VIVO*

- 2. U druhé serie Mud je gen *lacZ* zbaven místa rbs a též prvních nukleotidů kódující sekvence. Gen může být exprimován jen tehdy, když je transpozon Mud inzerován ve správném čtecím rámci ve směru transkripce od kompletních expresních signálů jak pro transkripci, tak pro translaci (promotor a rbs). Transpozon v tomto případě navozuje translační fúze.
- 3. Pro vyhledávání genů, jejichž produkty jsou **exportovány do periplazmy nebo do prostředí**, byl zkonstruován TnPho. Tento transpozon nese gen *pho*, který kóduje alkalickou fosfatázu (protein *E. coli* exportovaný do periplazmatického prostoru). Je aktivní jen jako dimer. Translací vzniká dlouhý prekurzor se signálním peptidem, který je při transportu do periplazmatického prostoru odštěpen. **Selekce pomocí XP (5bromo4chloro3indolyl fosfát)**

(a) (i)



operonová fúze pomocí Mud

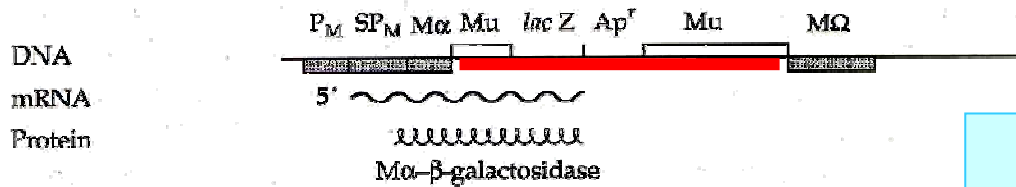
Transkripční fúze

(ii)



operonová fúze pomocí Mud
(v obrácené orientaci)

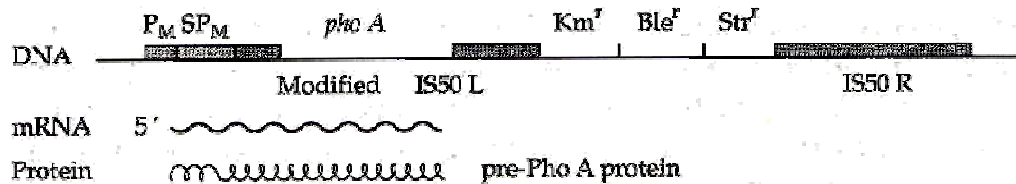
(b)



genová fúze
(vznik fúzního proteinu)

**Translační
(proteinová) fúze**

(c)



TnPhoA
M = sekretovaný protein

MudI = operonové fúze, MudII = genové fúze

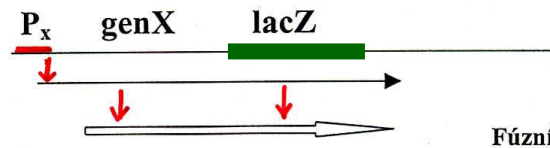
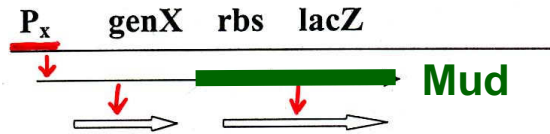
- **Reportérové transkripční (operonové) a translační (genové) fúze mají řadu využití, např. mohou být použity ke stanovení, zda regulace genové exprese probíhá na transkripční nebo translační úrovni.**

- **Když je gen regulován na transkripční úrovni,** bude β -galaktozidáza exprimována jak v případě operonových tak i genových fúzí a indukována nebo reprimována v podobném rozsahu jako gen, do něhož je transpozon začleněn.

- **Jestliže je gen regulován na úrovni translace,** nebude v případě operonové fúze β -galaktozidáza ani indukována ani reprimována, ale v případě genové fúze bude exprese β -galaktozidázy regulována.

Využití transpozonových fúzí ke sledování způsobu regulace genů

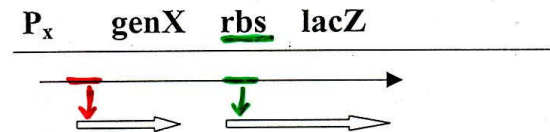
A. Regulace genu X na úrovni transkripce



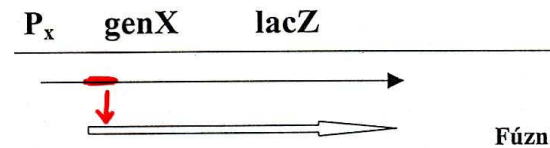
Fúzní protein

= indukce a represe genu lacZ bude v obou případech probíhat stejně

B. Regulace genu X na úrovni translace



= tvorba B-galaktosidázy nebude indukována ani reprimována



Fúzní protein

= tvorba fúzního proteinu a tedy i aktivita B-galaktosidázy budou ovlivněny translačními signály působícími na gen X

Exprese lacZ je řízena signály pro transkripci genu X

Transkripční fúze

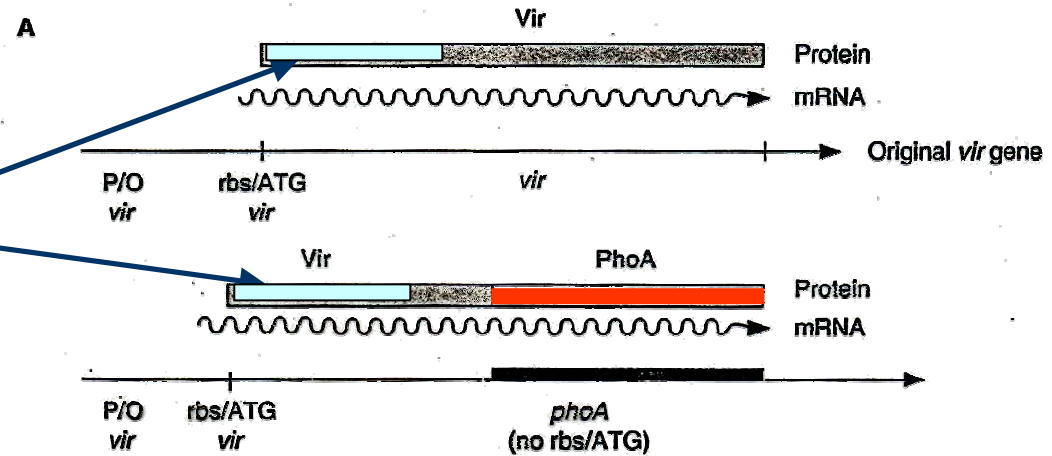
Translační fúze

MudI

MudII

Tvorba galaktosidázy je ovlivněna translačními signály genu X

Signální sekvence genu *vir*



Sekretovaný protein
- **pho je aktivní**

periplazmatický protein
- **pho je aktivní**

cytoplazmatický protein
- **pho je inaktivní**

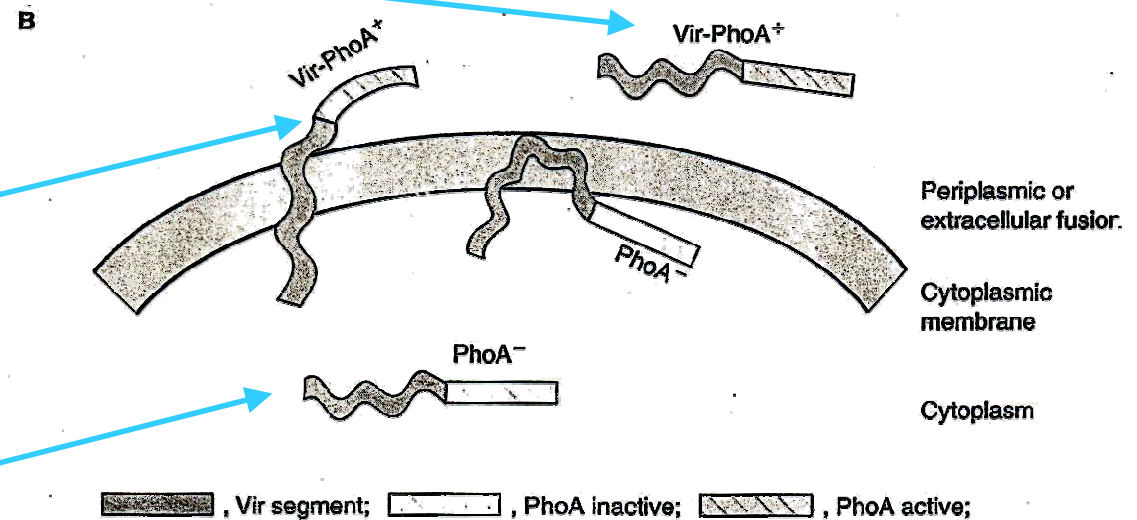
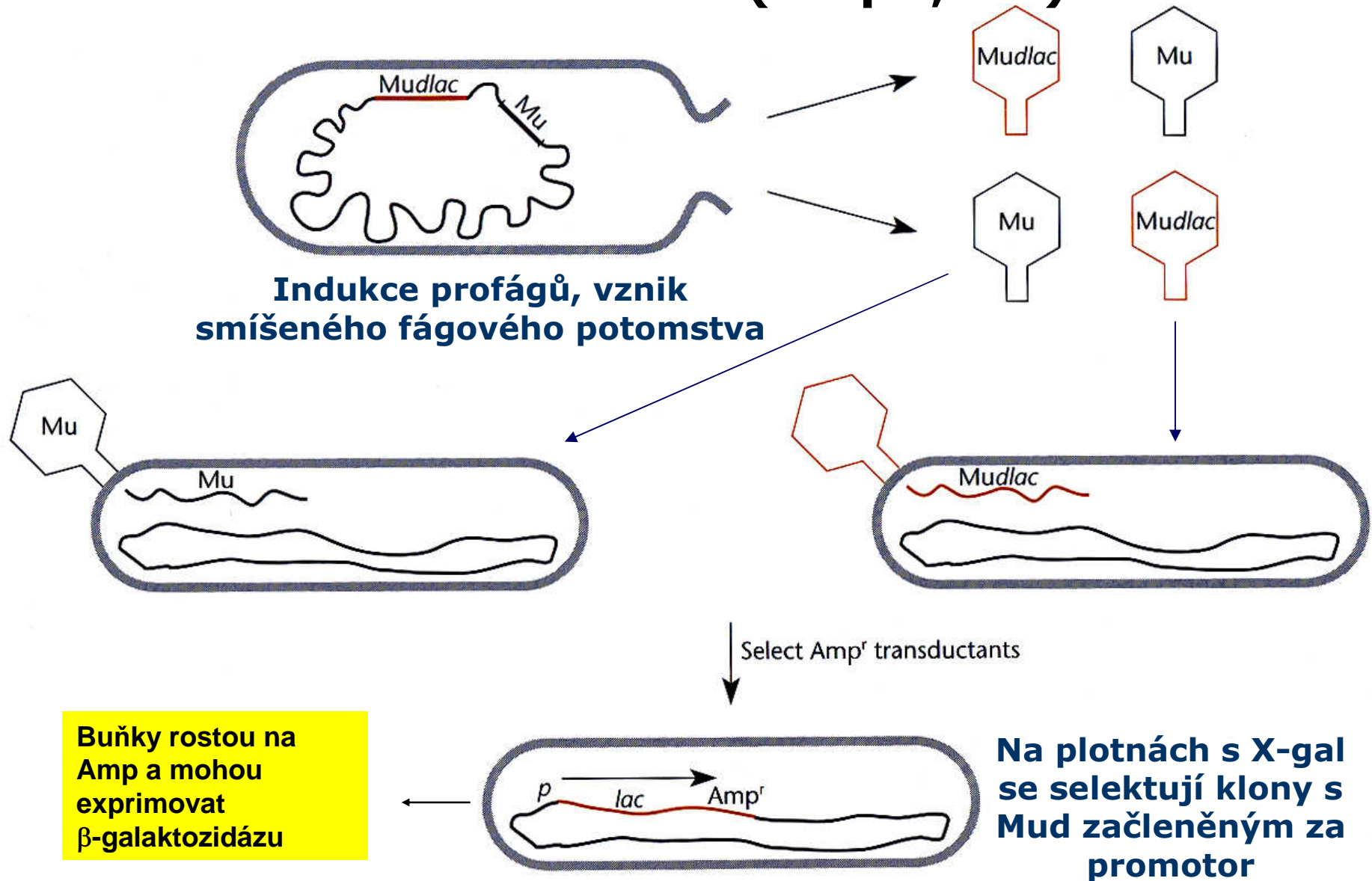
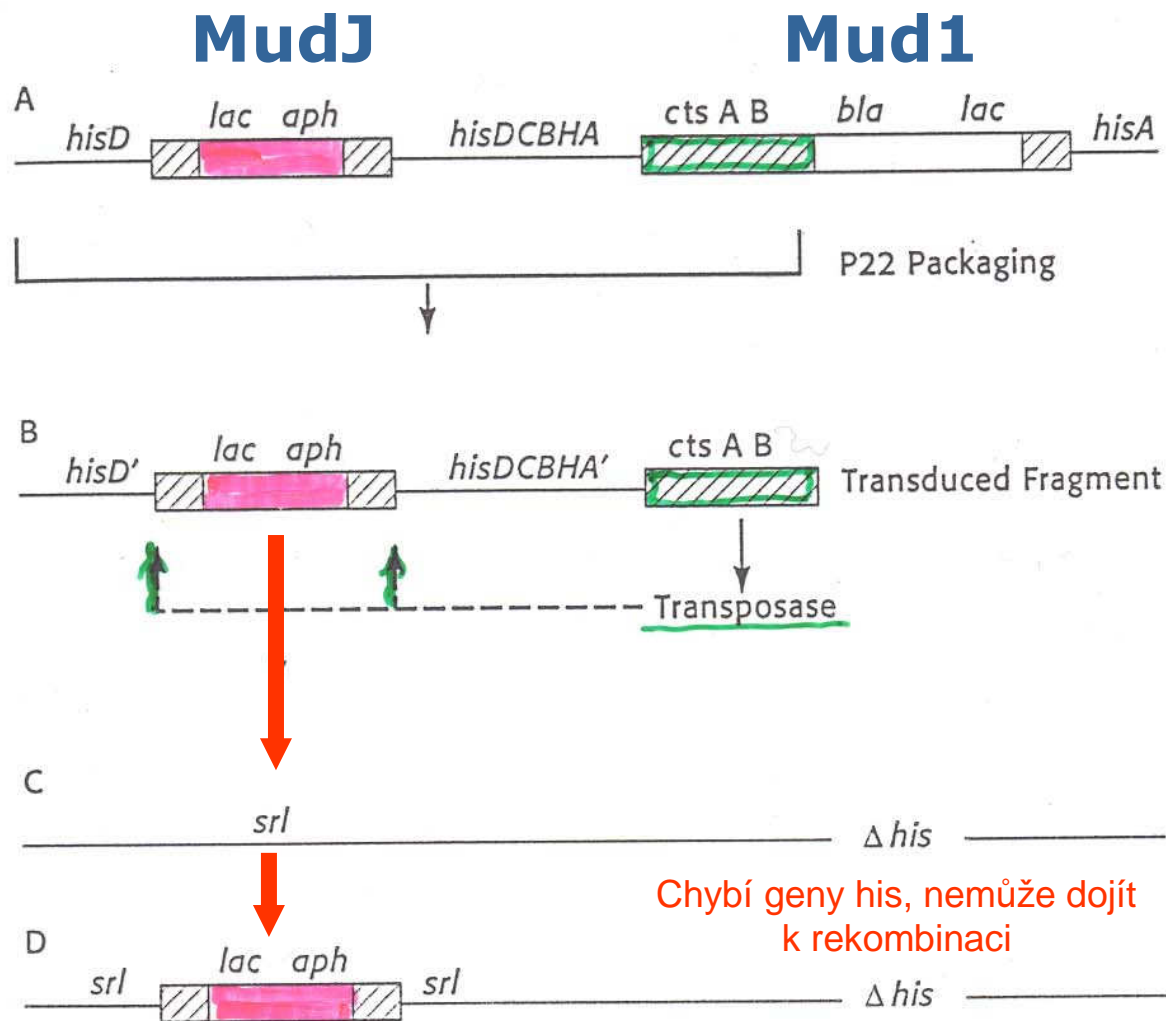


Figure 6-8 Using protein fusions with alkaline phosphatase (PhoA fusions) to identify genes encoding bacterial surface or extracellular proteins. A, PhoA translational fusion. B, Various types of PhoA fusions. PhoA is active outside the cytoplasm (PhoA⁺) and inactive inside the cytoplasm (PhoA⁻).

IZOLACE GENOVÝCH FÚZÍ PO NÁHODNÉM ZAČLENĚNÍ Mud(Amp^R; lac)



DOČASNÁ CIS-KOMPLEMENTACE; ZPŮSOB, JAK ZAČLENIT TRANSPOZON STABILNĚ DO REPLIKONU



Kmen *Salmonella typhimurium*

zdroj MudJ

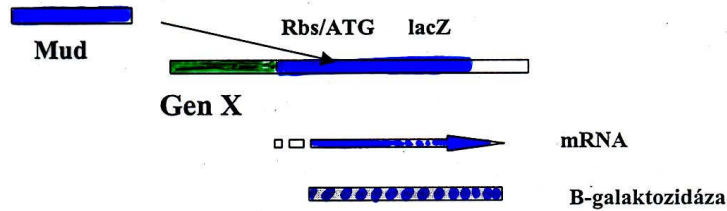
Nespecifická transdukce pomocí fága P22

Chromozom recipienta

stabilní začlenění

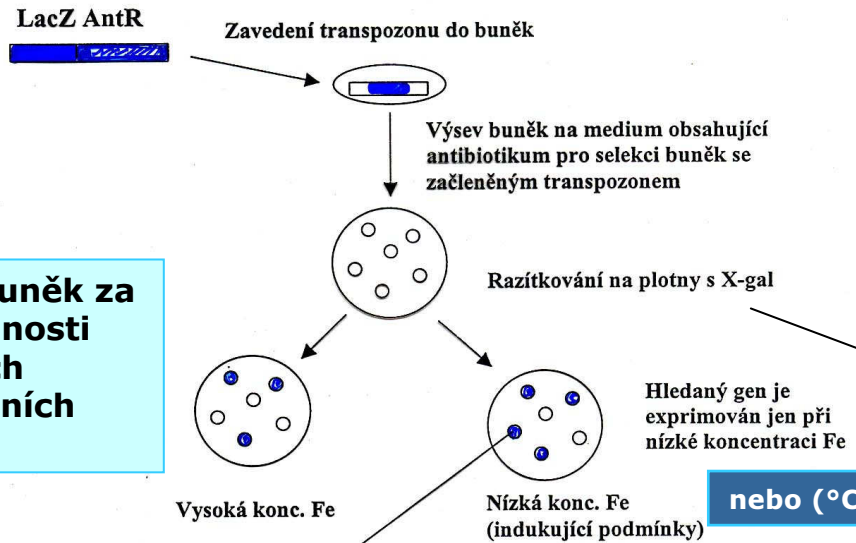
Frekvence mutací v konkrétním genu 1:3 000

Vyhledání neznámého genu, jehož regulace je specificky řízena



Tvorba B-galaktosidázy je regulována signály řídicími normálně tvorbu produktu genu X

Vnesení Mud do buňky a jeho náhodné začlenění do genu X

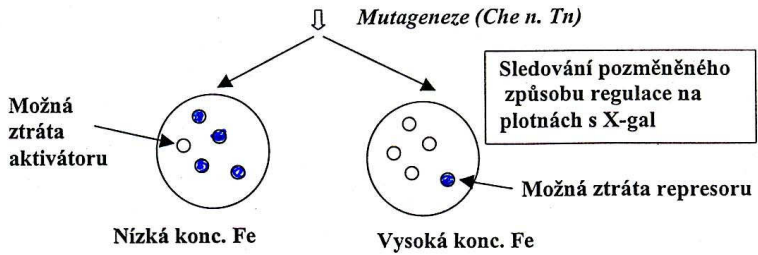


Růst buněk za přítomnosti různých indukčních agens

vyběr klonů, které vykazují změnu v regulaci a expresi lacZ za různých podmínek (např. různá konc. Fe)

Kolonie vybraná pro další analýzu

Mud je začleněn do genu, který je aktivován jen při nízké koncentraci Fe



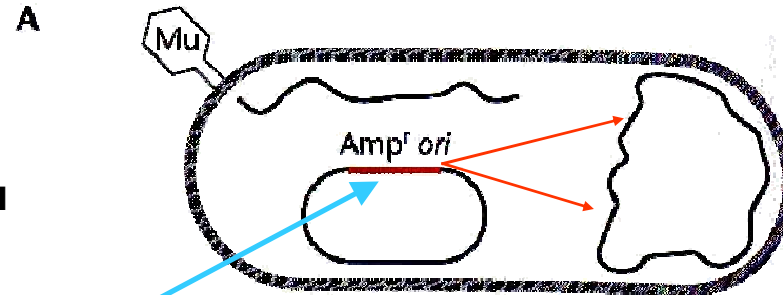
Objasnění způsobu regulace

KLONOVÁNÍ

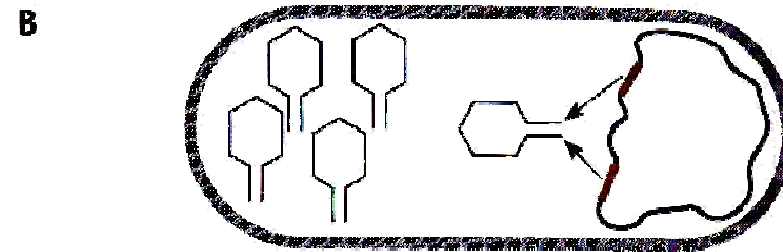
Klonování neporušeného genu, jehož exprese je ovlivněna změnou podmínek

KLONOVÁNÍ *IN VIVO* POMOCÍ MINI-MU

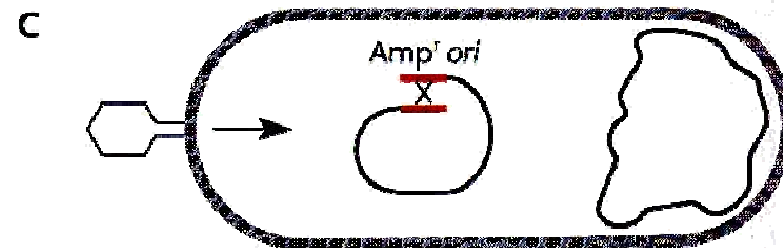
A. Po infekci buněk pomocným fágem Mu se mini-Mu z plazmidu transponuje do náhodných míst na chromozomu.



B. Do fágových hlav jsou zabalovány dva sousední mini-Mu spolu s částí chromozomu

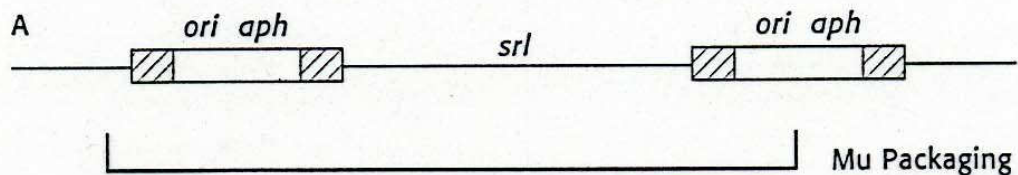


C. Po přenosu do další buňky dochází k rekombinaci mezi mini-Mu za tvorby kružnicové DNA, která má charakter plazmidu, v němž je „naklonován“ úsek chromozomu

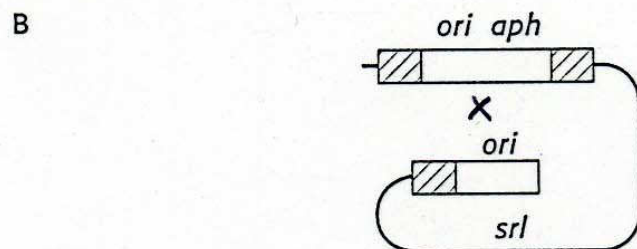


Klonování pomocí Mud5005

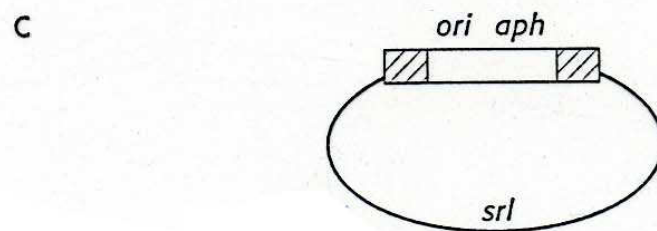
Pomocný fág
(je-li nutné)



Výsledek
náhodné
transpozice

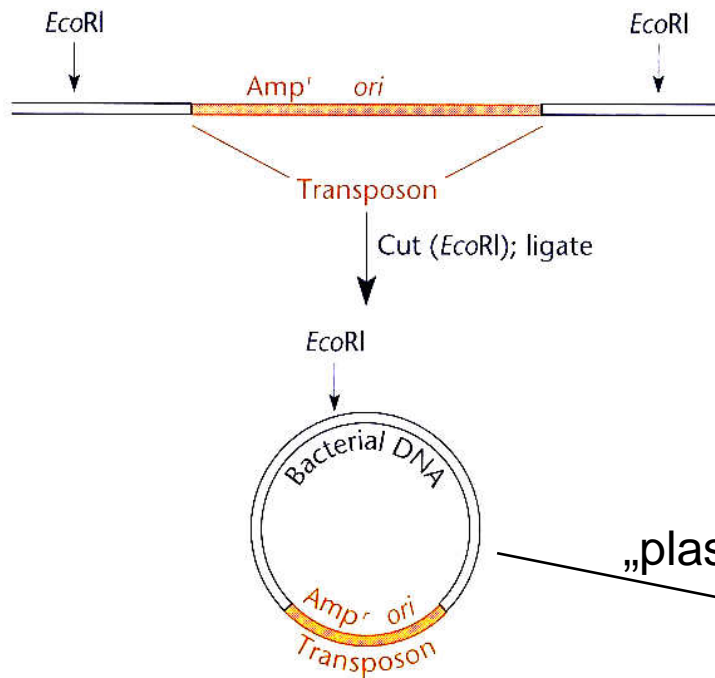


Homologní
rekombinace mezi
sekvencemi Mud
v recipientu



Kružnicový plazmid
s naklonovaným
inzertem dlouhým
až 23 kb

Klonování genů mutovaných transpozony



Využití

Klonování dosud neznámých genů, jejichž mutace vedou ke změně fenotypu, zvláště u bakterií, které se obtížně kultivují nebo udržují v laboratoři (analýza projevu genů se provádí po přenosu do *E. coli*)

Figure 9.21 Cloning genes mutated by insertion of a transposon. A transposon used for mutagenesis of a chromosome contains a plasmid origin of replication (*ori*), and the chromosome is cut with the restriction endonuclease *EcoRI* and religated. If the ligation mix is used to transform *E. coli*, the resulting plasmid in the *Amp^r* transformants will contain the sequences that flanked the transposon insertion in the chromosome. Chromosomal sequences are shown in black, and transposon sequences are shown in gold.

Přenos do *E. coli*

↓
Příprava sondy pro vyhledání wt genu v původním hostiteli

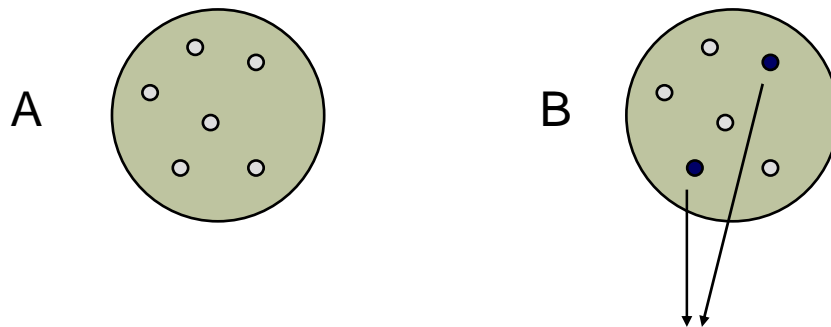
Identifikace genů *din* aktivovaných po poškození DNA

1. Přenos Mud (AmpR, lac) do *E. coli*



2. Izolace transduktantů AmpR

Razítkování jednotlivých transduktantů
na plotny s X-gal (A) a na plotny s X-gal
+ činidlem poškozujícím DNA (B)



Modré kolonie = transpozon se
začlenil do genu aktivovaného po
poškození DNA