

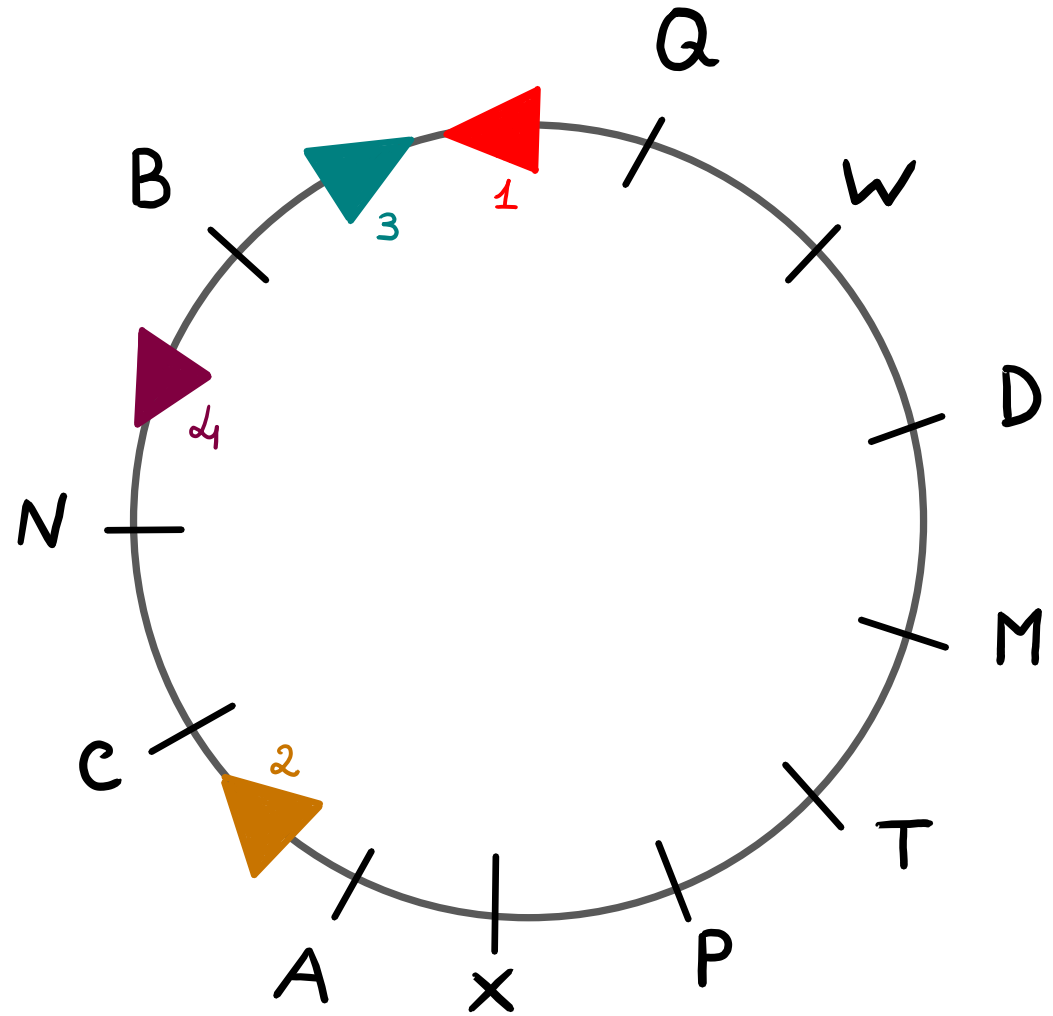
***ESERCITAZIONE
GENETICA 20-05:
Genetica Batterica***

agostini.1917634@studenti.uniroma1.it

1) In *E. coli*, quattro ceppi *Hfr* donano i marcatori mostrati nell'ordine dato:

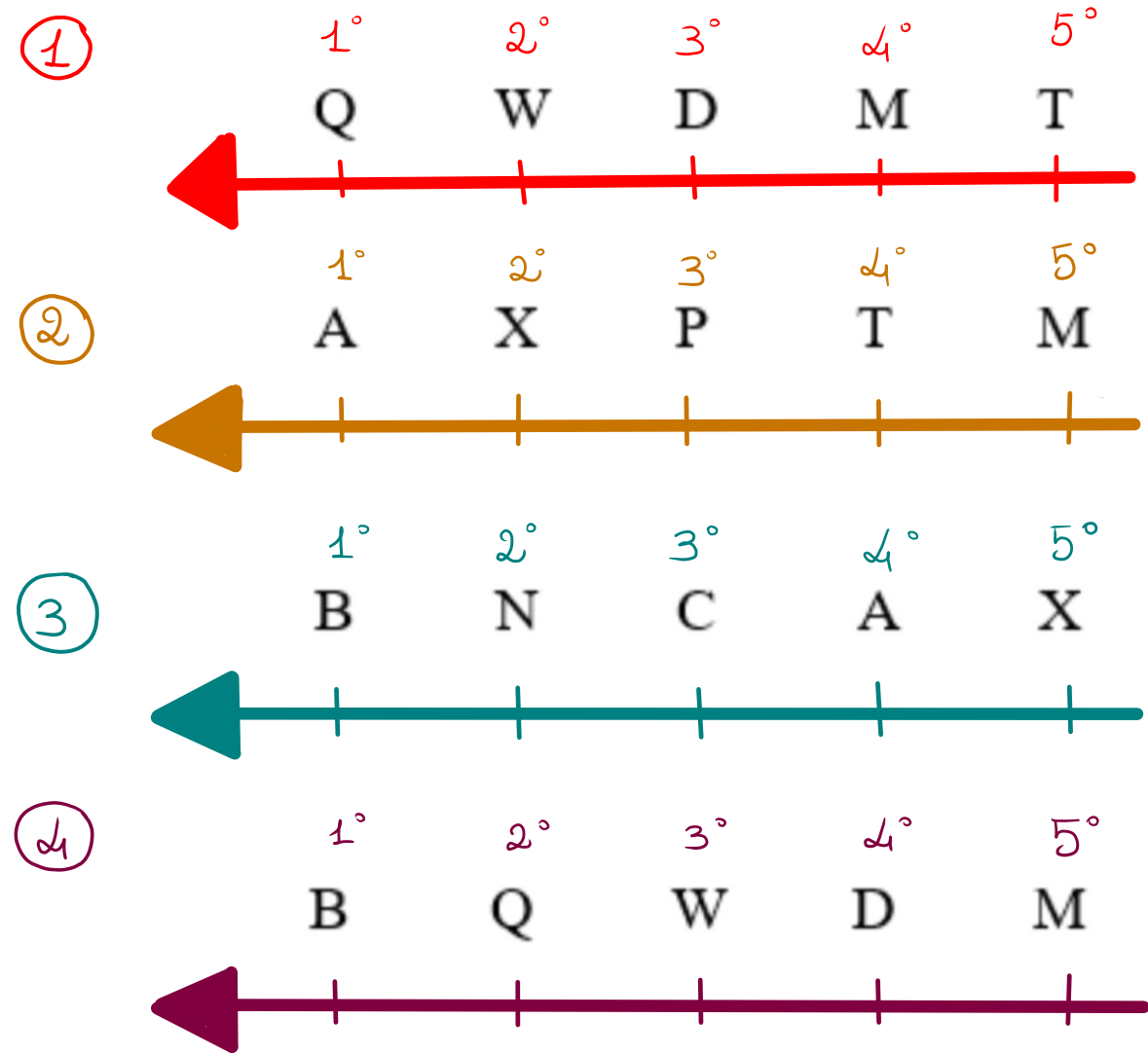
ceppo 1	Q	W	D	M	T
ceppo 2	A	X	P	T	M
ceppo 3	B	N	C	A	X
ceppo 4	B	Q	W	D	M

Tutti questi ceppi *Hfr* derivano dallo stesso ceppo F^+ . Qual e' l'ordine di questi marcatori sul cromosoma circolare dell' F^+ originale?



Inserisco i marcatori sul cromosoma circolare nell'ordine fornito dall'esercizio.

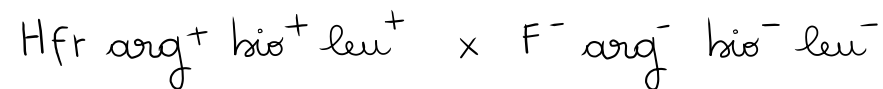
Disegno le FRECCE in modo tale che la base della freccia sia vicino al primo gene trasferito



3) Vengono incrociati due ceppi di E. coli: Hfr arg+ bio+ leu+ x F- arg- bio- leu-. Si sa che arg+ entra nel ricevente per ultimo, quindi si selezionano i ricombinanti arg+ su terreno contenente solo bio e leu. I ricombinanti vengono poi saggiati per la presenza di bio+ e leu+, e di ciascun tipo si trovano:

arg+ bio+ leu+	320 individui
arg+ bio+ leu-	8 individui
arg+ bio- leu+	0 individui
arg+ bio- leu-	48 individui

- a) Qual è l'ordine dei geni?
b) Quali sono le distanze di mappa in unità di ricombinazione?



Per capire l'ordine dei geni considero la classe MENO NUMEROSA:

$$arg^+ bio^- leu^+ = 0$$

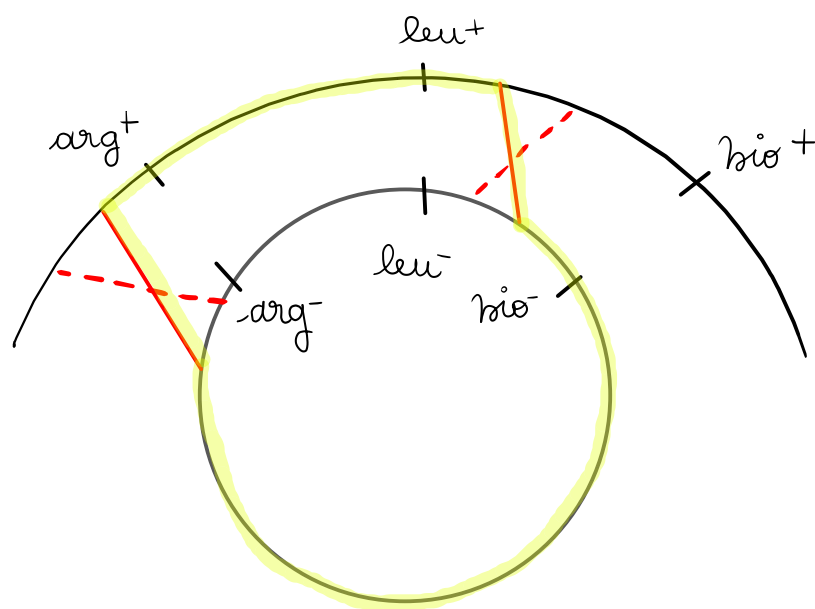
Essendo la classe più RARA, la MENO PROBABILE, deve essere stata originata da 4 CROSSING OVER (che avvengono raramente) e non da 2 (più frequenti).

L'ORDINE CORRETTO SARÀ QUELLO CON CUI SI OTTIENE LA CLASSE PIÙ RARA CON IL MAGGIOR NUMERO DI SCAMBI (4)

a) Dal testo sappiamo che arg è esterno perché entra nel ricevente per ultimo. Per cui al centro possono esserci o leu o bio:

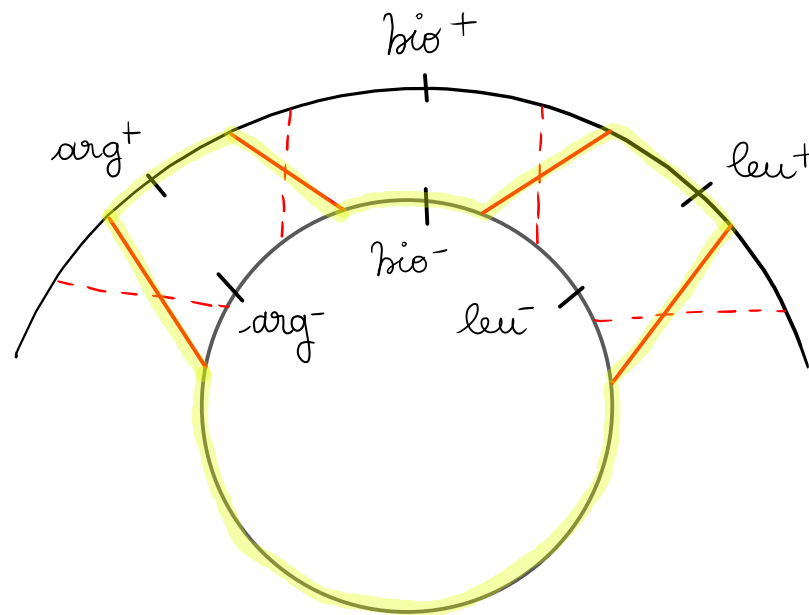
- se leu fosse il centrale, disegnando al centro e facendo avvenire 4 SCAMBI si deve originare arg+ bio- leu+
- se bio fosse il centrale, disegnando al centro e facendo avvenire 4 SCAMBI si deve originare arg+ bio- leu+

leu è il gene centrale?



NO, otterrei la classe meno frequente con solo 2 SCAMBI

bio è il gene centrale?



SÌ, ottengo la classe meno frequente con 4 SCAMBI

arg bio leu equivale a leu bio arg

→ questa classe NON la trovo, ho selezionato per arg+

$$d_{arg-bio} = \frac{\text{RICOMBINANTI tra } arg^- bio^+}{\text{TOT}} \times 100 = \frac{arg^+ bio^- + arg^- bio^+}{\text{TOT}} \times 100 = \frac{48 + 0}{376} \times 100 = 0,127 \times 100 = 12,7 \mu.m.$$

$$d_{bio-leu} = \frac{\text{RICOMBINANTI tra } bio^- leu^+}{\text{TOT}} \times 100 = \frac{bio^+ leu^- + bio^- leu^+}{\text{TOT}} \times 100 = \frac{8 + 0}{376} \times 100 = 0,021 \times 100 = 2,1 \mu.m.$$

4) In un esperimento di trasduzione con fagi P1, i batteri donatori erano $synP^+ supM^+ trpZ^+$, mentre i riceventi erano $synP^- supM^- trpZ^-$. Una selezione per i batteri $supM^+$ ha dato i seguenti risultati:

48	$M^+ P^+ Z^+$
120	$M^+ P^- Z^-$
500	$M^- P^- Z^-$
0	$M^- P^+ Z^+$

a) Qual è l'ordine dei marcatori?

b) Qual è la frequenza di cotrasduzione di M e P? E di M e Z?

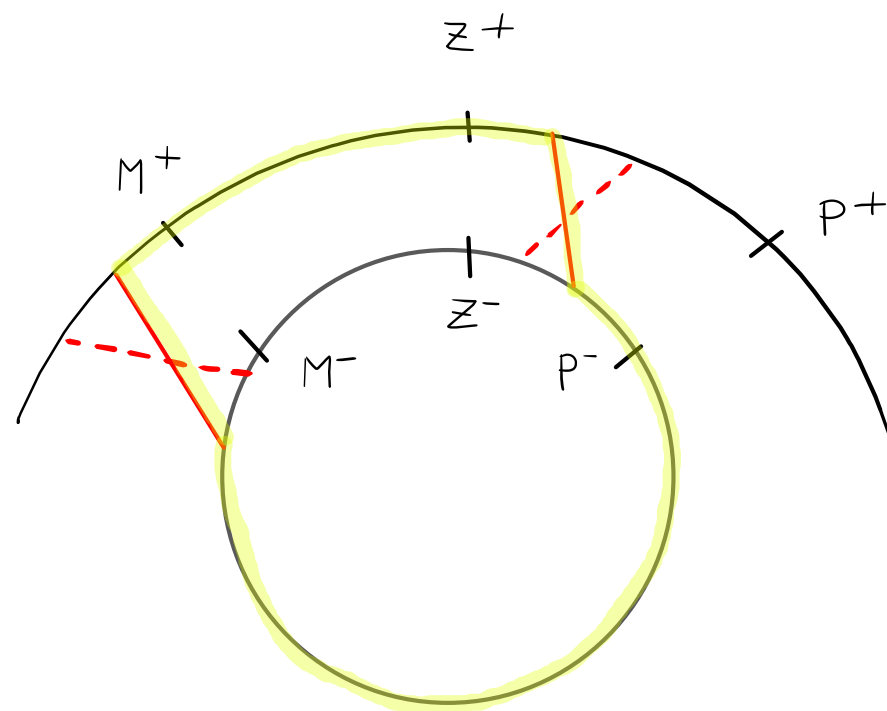
$$synP^+ supM^+ trpZ^+ \rightarrow synP^- supM^- trpZ^-$$

Anche in questo caso dobbiamo ottenere la classe meno frequente con il maggior numero di scambi.

→ Il gene CENTRALE sarà quello con cui otteniamo $M^+ P^- Z^+$ con 4 SCAMBI

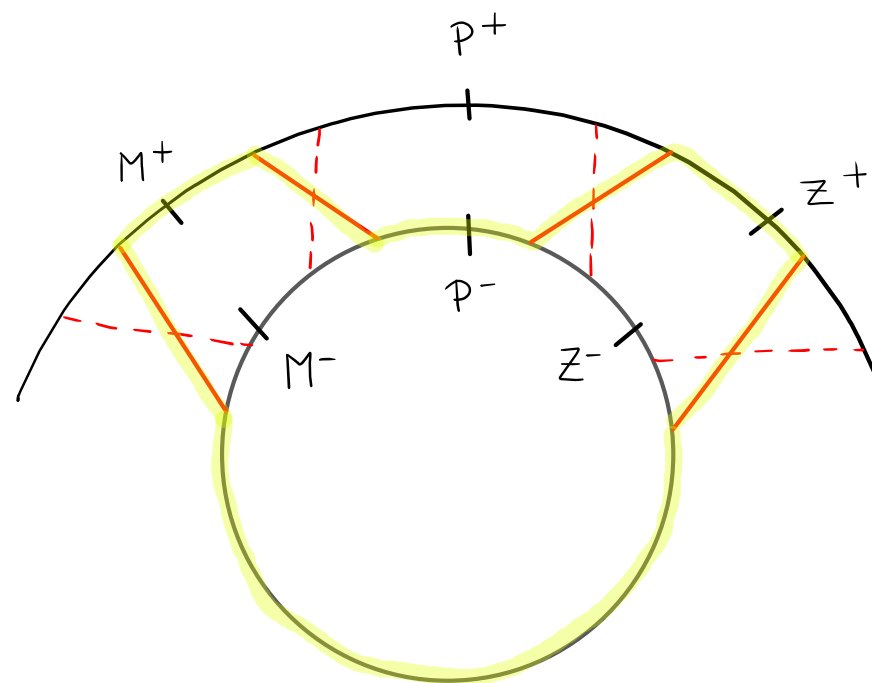
a)

Z^+ è il marcatore centrale?



NO, otterrei la classe meno frequente con solo 2 SCAMBI

P è il marcatore centrale?



SÌ, ottengo la classe meno frequente con 4 SCAMBI

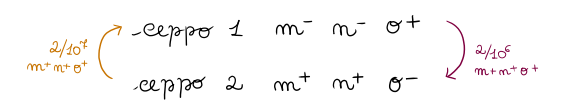
b)

$$\text{frequenza cotrasduzione } M-P = \frac{n^{\circ} M^+ P^+}{TOT} = \frac{48 + 120}{668} = 0,251 \rightarrow \text{I marcatori } M^+ \text{ e } P^+ \text{ vengono trasdotti insieme nel } 25,1\% \text{ dei casi}$$

$$\text{frequenza cotrasduzione } P-Z = \frac{n^{\circ} P^+ Z^+}{TOT} = \frac{48}{668} = 0,071 \rightarrow \text{I marcatori } P^+ \text{ e } Z^+ \text{ vengono trasdotti insieme nel } 7,1\% \text{ dei casi}$$

$$\text{frequenza cotrasduzione } M-Z = \frac{n^{\circ} M^+ Z^+}{TOT} = \frac{48 + 0}{668} = 0,071 \rightarrow \text{I marcatori } M^+ \text{ e } Z^+ \text{ vengono trasdotti insieme nel } 7,1\% \text{ dei casi}$$

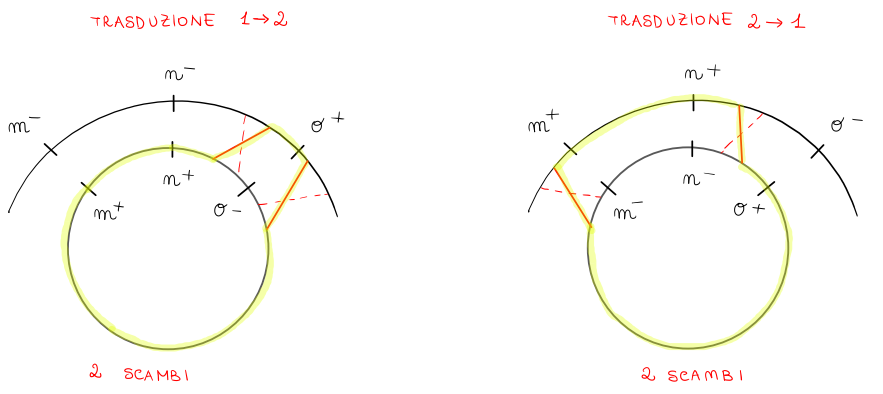
5) Il ceppo batterico n.1 ha costituzione $m^- n^- o^+$ e il ceppo 2 $m^+ n^+ o^-$. Vengono usati fagi trasducenti per effettuare trasduzione generalizzata dal ceppo 1 al 2 e viceversa. Si ottengono i seguenti risultati dopo piastratura dei batteri riceventi:
 trasduzione da 1 a 2: $2/10^6$ cellule di tipo selvatico;
 trasduzione da 2 a 1: $2/10^7$ cellule di tipo selvatico.
 In base a questi risultati determinate l'ordine dei geni spiegando il vostro ragionamento.



La trasduzione dal ceppo 1 al ceppo 2 produce più cellule di tipo selvatico della trasduzione dal ceppo 2 al ceppo 1 ($2/10^6 > 2/10^7$).
 Poiché 2 SCAMBI sono PIÙ FREQUENTI di 4 SCAMBI, l'ordine corretto dei geni è quello che consente di ottenere cellule selvatiche con 2 CROSSING OVER nella trasduzione $1 \rightarrow 2$ e con 4 CROSSING OVER nella trasduzione $2 \rightarrow 1$.

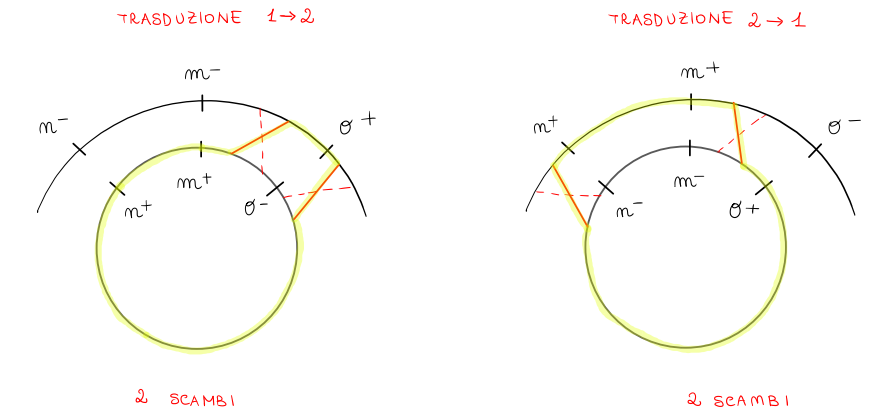
Si fanno quindi varie prove fino ad individuare il gene che, se centrale, soddisfa questa necessità

n gene centrale?



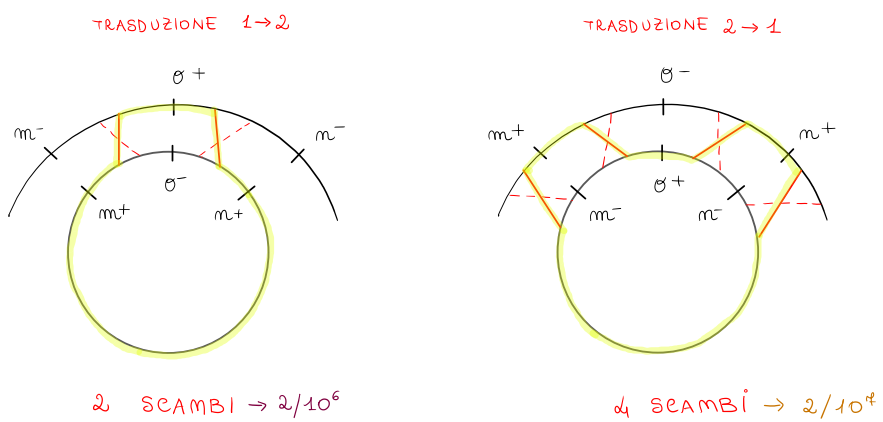
NO, ottengo i selvatici con 2 SCAMBI sia nel 1° che nel 2° caso \rightarrow non giustifica la diversa frequenza dei selvatici nei due casi di trasduzione

m gene centrale?



NO, ottengo i selvatici con 2 SCAMBI sia nel 1° che nel 2° caso \rightarrow non giustifica la diversa frequenza dei selvatici nei due casi di trasduzione

o gene centrale?



SÌ, o è il gene centrale perché così ottengo la classe più frequente con meno scambi e quella meno frequente con più scambi

6) Un ceppo batterico, A⁻ B⁻ C⁻, viene trasformato con diversa efficienza, utilizzando DNA isolato da batteri della seguente costituzione genetica.

Genotipo del donatore	Frequenza di recupero delle cellule trasformate
A ⁺	10 ⁻³ A ⁺
B ⁺	5x10 ⁻⁴ B ⁺
C ⁺	4x10 ⁻⁴ C ⁺
A ⁺ B ⁺	5x10 ⁻⁷ A ⁺ B ⁺
A ⁺ C ⁺	2x10 ⁻⁴ A ⁺ C ⁺
B ⁺ C ⁺	4x10 ⁻⁴ B ⁺ C ⁺

Cosa si può concludere riguardo alla distribuzione dei tre loci sul cromosoma batterico?

Considero A e B

$$A^+ = 10^{-3} \quad B^+ = 5 \times 10^{-4}$$

$$A^+B^+ = 5 \times 10^{-7} \quad \longrightarrow \text{A e B LONTANI}$$

La probabilità che A e B entrino insieme è pari al prodotto della probabilità che entri A × la probabilità che entri B (10⁻³ × 10⁻⁴ = 10⁻⁷)

Considero B e C

$$B^+ = 5 \times 10^{-4} \quad C^+ = 4 \times 10^{-4}$$

$$B^+C^+ = 4 \times 10^{-4} \quad \longrightarrow \text{B e C VICINI}$$

L'ordine di grandezza della frequenza con cui co-trasformano è simile tra i geni singoli e i geni insieme → VICINI

Considero A e C

$$A^+ = 10^{-3} \quad C^+ = 4 \times 10^{-4}$$

$$A^+C^+ = 2 \times 10^{-4} \quad \longrightarrow \text{A e C VICINI}$$

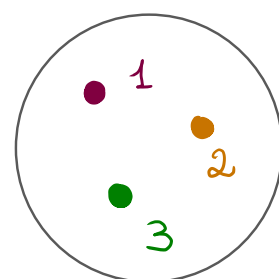
L'ordine di grandezza della frequenza con cui co-trasformano è simile tra i geni singoli e i geni insieme → VICINI

⇒ c è al centro, l'ordine dei 3 loci è A C B

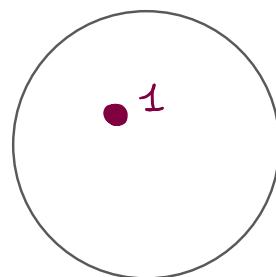
La TRASFORMAZIONE è l'acquisizione, da parte del batterio, di DNA dall'ambiente esterno.

L'esercizio si risolve partendo dal presupposto che se due geni sono vicini la probabilità che entrino insieme è simile alla probabilità con cui entra un gene singolo

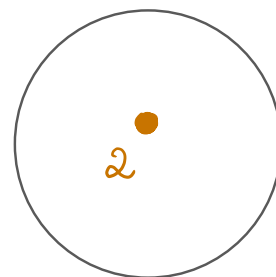
7) Tre colonie batteriche che crescono su una piastra di terreno minimo contenente leucina e serina vengono replicate su diversi terreni selettivi con i seguenti risultati: su terreno minimo più serina cresce solo la colonia 1; su terreno minimo con streptomicina, serina e leucina cresce solo la colonia 2; su terreno minimo più leucina crescono le colonie 2 e 3; su terreno minimo non cresce nessuna colonia. Indicare per quanto possibile i genotipi delle tre colonie.



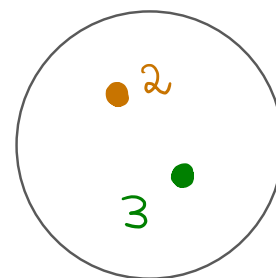
+ ser
+ leu



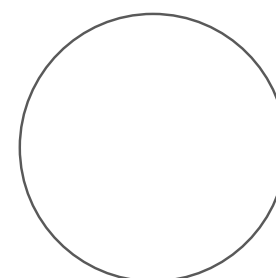
+ ser



+ ser
+ leu
+ str



+ leu



minimo

COLONIA 1 = $leu^+ str^s ser^-$

- cresce con serina ma senza leucina $\rightarrow leu^+$
- NON cresce con streptomicina $\rightarrow str^s$
- NON cresce senza serina $\rightarrow ser^-$

COLONIA 2 = $leu^- str^R ser^+$

- cresce senza serina $\rightarrow ser^+$
- NON cresce senza leucina $\rightarrow leu^-$
- cresce con streptomicina $\rightarrow str^R$

COLONIA 3 = $leu^- str^s ser^+$

- cresce senza serina $\rightarrow ser^+$
- NON cresce senza leucina $\rightarrow leu^-$
- NON cresce con streptomicina $\rightarrow str^s$

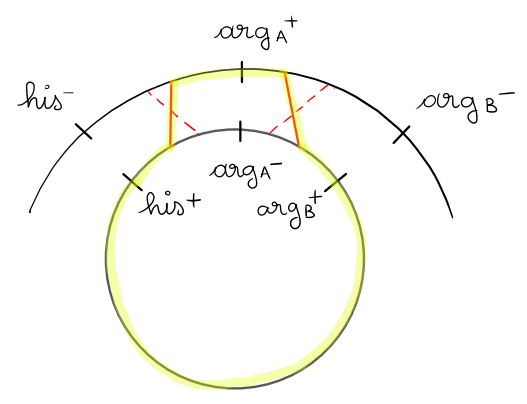
11) Si considerino due mutanti nel locus per l'arginina arg_A^- e arg_B^- , che stanno alla destra di un locus per l'istidina (his). Un ceppo batterico con genotipo $his^+ arg_A^-$ viene trasdotto dal fago da un ceppo che è $his^- arg_B^-$. Si realizza anche un incrocio reciproco in cui il ceppo $his^- arg_B^-$ viene trasdotto dal fago da un ceppo che è $his^+ arg_A^-$. In entrambi i casi il numero dei ricombinanti prototrofi è equivalente. Si determini l'ordine dei mutanti per l'arginina, in relazione al marcatore per l'istidina.

ceppo 1 = $his^- arg_A^+ arg_B^-$
 ceppo 2 = $his^+ arg_A^- arg_B^+$

Dal testo so che i due loci per l'arginina sono a destra del locus per l'istidina. Bisogna quindi determinare quale locus, tra arg_A e arg_B è il centrale.
 Dal momento che la trasduzione dal ceppo 1 a 2 e quella reciproca da 2 a 1 restituiscono lo stesso numero di ricombinanti prototrofi, l'ordine corretto dei geni è quello che permette di ottenere ricombinanti $his^+ arg_A^+ arg_B^+$ con lo stesso numero di crossing over in entrambe le direzioni della trasduzione.

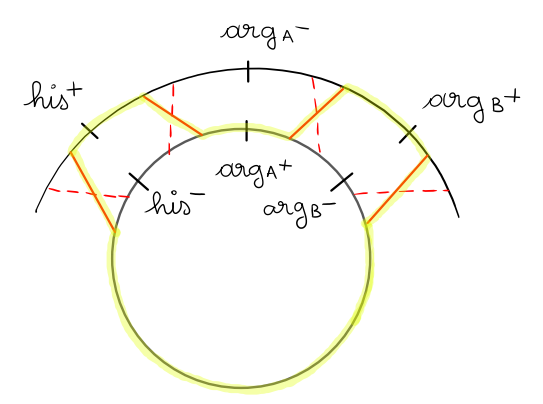
arg_A è il locus CENTRALE ?

TRASDUZIONE 1 → 2



2 SCAMBI

TRASDUZIONE 2 → 1

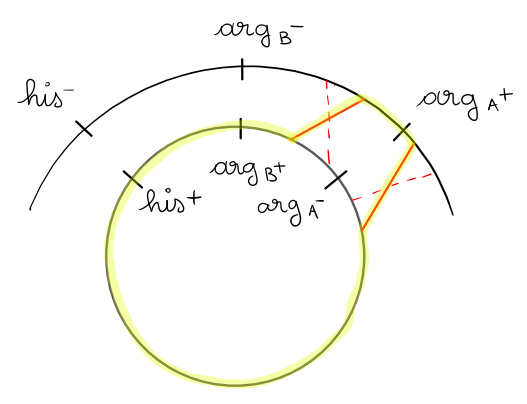


4 SCAMBI

Poiché servirebbe un numero diverso di scambi per ottenere lo stesso numero di prototrofi nelle due direzioni di trasduzione, arg_A^+ non è il locus centrale.

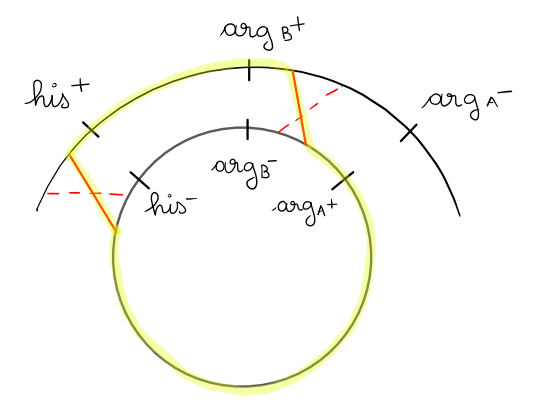
arg_B è il locus CENTRALE ?

TRASDUZIONE 1 → 2



2 SCAMBI

TRASDUZIONE 2 → 1



2 SCAMBI

Sì: con arg_B^+ al centro ottengo ricombinanti prototrofi con lo stesso numero di scambi nelle due direzioni di trasduzione.

→ L'ordine dei loci è quindi: $his arg_B arg_A$

12) Un batterio con genotipo $thr^+ leu^+ ara^+$ è infettato da un batteriofago trasducente. Il lisato ottenuto viene utilizzato per infettare un batterio $thr^- leu^- ara^-$. I batteri di questa seconda infezione (riceventi) vengono selezionati su una prima piastra priva di leucina e su una seconda che non contiene treonina. Le colonie cresciute vengono saggiate per la cotrasduzione degli altri geni. Disegnare la mappa genetica e spiegare brevemente il procedimento

Marcatore selezionato	% di cellule con geni cotrasdotti	
leu^+	76 ara^+	3 thr^+
thr^+	3 leu^+	0 ara^+

$$thr^+ leu^+ ara^+ \rightarrow thr^- leu^- ara^-$$

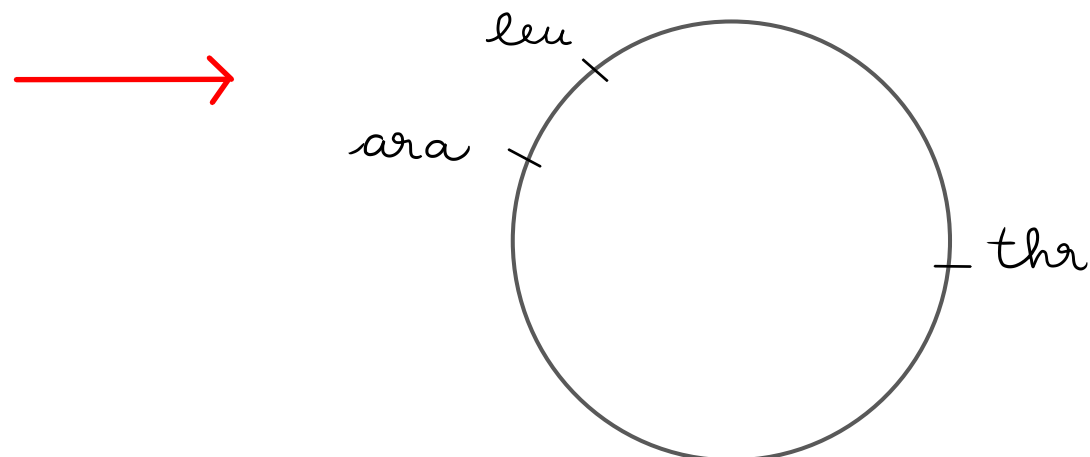
PIÙ È ALTA LA % DI COTRASDUZIONE PIÙ I GENI SONO VICINI

- Selezionando per leu^+ ho
 - 76% di cellule $leu^+ ara^+$
 - 3% di cellule $leu^+ thr^+$
 → leu è più vicino ad ara che a thr perché è cotrasdotto con ara con maggior frequenza rispetto a thr (76% > 3%)

Quindi potrei avere:

1) $leu \quad ara \quad \quad \quad thr$ oppure 2) $ara \quad leu \quad \quad \quad thr$

- Per discriminare tra le due ipotesi seleziono per thr : dal momento che è più facilmente cotrasdotto con leu (3%) rispetto ad ara (0%), la situazione corretta è la **2**



Sette mutanti per delezione nel cistrone A della regione rII del fago T4 sono stati saggiati in tutte le combinazioni a coppie per i ricombinanti di tipo selvatico. Nella tabella dei risultati, a lato, + = ricombinazione, 0 = non ricombinazione. Si costruisca una mappa topologica per queste delezioni.

	1	2	3	4	5	6	7
1	0	+	0	0	+	0	0
2		0	0	0	+	+	0
3			0	0	+	+	0
4				0	+	0	0
5					0	0	0
6						0	0
7							0

• Costruisco la MAPPA DI DELEZIONE basandomi sulla tabella:

- > se compare 0 = nessun ricombinante selvatico, le due DELEZIONI SI SOVRAPPONGONO almeno in parte
- > se compare + = la ricombinazione può originare ricombinanti selvatici per cui le due DELEZIONI NON SI SOVRAPPONGONO

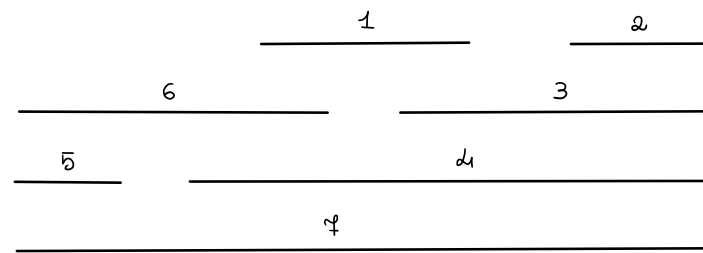
Quindi:

- la DELEZIONE 1 si sovrappone alla 3, 4, 6 e 7 ma NON alla 2 e alla 5
- la DELEZIONE 2 si sovrappone alla 3, 4 e 7 ma NON alla 1, 5 e 6
- la DELEZIONE 3 si sovrappone alla 1, 2, 4 e 7 ma NON alla 5 e alla 6
- la DELEZIONE 4 si sovrappone alla 1, 2, 3, 6 e 7 ma NON alla 5
- la DELEZIONE 5 si sovrappone alla 6 e 7 ma NON alla 1, 2, 3, 4
- la DELEZIONE 6 si sovrappone alla 1, 4, 5 e 7 ma NON alla 2 e alla 3
- la DELEZIONE 7 si sovrappone a tutte le altre

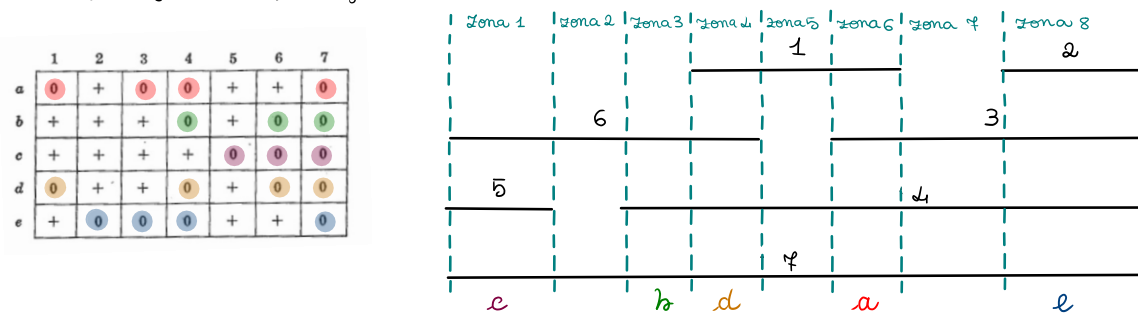
	1	2	3	4	5	6	7
a	0	+	0	0	+	+	0
b	+	+	+	0	+	0	0
c	+	+	+	+	0	0	0
d	0	+	+	0	+	0	0
e	+	0	0	0	+	+	0

La mappa si costruisce per tentativi, partendo magari dalle delezioni più informative (come ad es la 7) ed aggiungendo via via le altre. Si possono costruire vari tipi di mappe, l'importante è che riflettano ciò che è scritto sulla tabella

MAPPA delle DELEZIONI



• Una volta che ho costruito la MAPPA delle delezioni, la uso per mappare le mutazioni puntiformi saggiate nella seconda parte dell'esercizio, basandomi sulla tabella fornita



Per mappare le mutazioni all'interno della mappa di delezione uso il ragionamento dell'esercizio precedente:

- Suddivido la mappa di delezione in diverse zone, ciascuna delimitata dai confini delle delezioni
- Analizzo ciascuna mutazione e identifico con quali delezioni NON dà ricombinanti selvatici (= dove nella tabella c'è -)
 - ↳ quella sarà la zona all'interno della quale cade

N.B. Essendo mutazioni PUNTIFORMI cadono in UN PUNTO della zona considerata, NON in tutto l'intervallo

a → NON dà ricombinanti SELVATICI con le delezioni 1, 3, 4 e 7 per cui deve mappare nella zona in cui sono presenti le DELEZIONI 1, 3, 4 e 7 ma NON si sovrappengono alle altre → zona 6

b → NON dà ricombinanti SELVATICI con le delezioni 4, 6 e 7 per cui deve mappare nella zona in cui sono presenti le DELEZIONI 4, 6 e 7 ma NON si sovrappengono alle altre → zona 3

c → NON dà ricombinanti SELVATICI con le delezioni 5, 6 e 7 per cui deve mappare nella zona in cui sono presenti le DELEZIONI 5, 6 e 7 ma NON si sovrappengono alle altre → zona 1

d → NON dà ricombinanti SELVATICI con le delezioni 1, 4, 6 e 7 per cui deve mappare nella zona in cui sono presenti le DELEZIONI 1, 4, 6 e 7 ma NON si sovrappengono alle altre → zona 4

e → NON dà ricombinanti SELVATICI con le delezioni 2, 3, 4 e 7 per cui deve mappare nella zona in cui sono presenti le DELEZIONI 2, 3, 4 e 7 ma NON si sovrappengono alle altre → zona 8