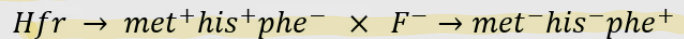


Esercizio 1

Vengono incrociati due ceppi di *E. coli*:



È noto che met^+ entra nel ricevente (F^-) per ultimo; quindi si selezionano i ricombinanti per met^+ e si saggiano per la presenza dei marcatori his^+ e phe^+ . Di ciascun tipo si trovano:

$met^+ his^+ phe^-$	400
$met^+ his^+ phe^+$	4
$met^+ his^- phe^+$	80
$met^+ his^- phe^-$	205

1. Stabilire l'ordine dei 3 geni e calcolare le distanze di mappa in unità di ricombinazione.

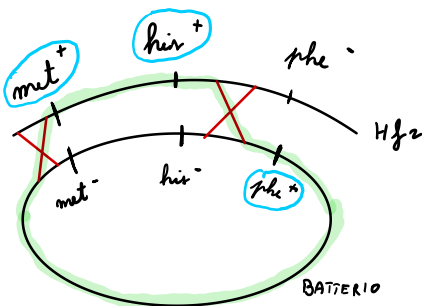
Guardando i tipi ricombinanti individuiamo i doppi ricombinanti che sono i meno numerosi

Discriminiamo le due ipotesi che possono dare questi ricombinanti:

↓
 $met^+ his^+ phe^+$

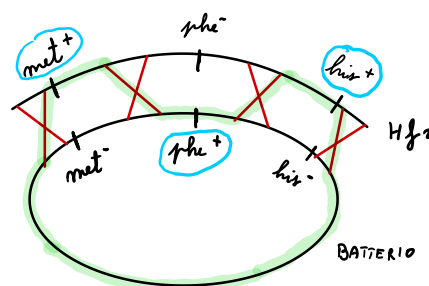
- ① $met^+ his^+ phe^+$ → his al centro
- ② $met^+ phe^+ his^+$ → phe al centro.

IPOTESI 1:



2 crossing-over

IPOTESI 2:



4 crossing-over

↓
L'IPOTESI 2 è quella che prevede il maggior numero di crossing-over quindi phe È IL GENE CENTRALE

Calcoliamo le distanze di ricombinazione:

$$f \text{ ricombinanti } met^+ phe^- = \frac{n^{\circ} \text{ ricombinanti } met^+ phe^-}{TOT} = \frac{4 + 80}{689} = 0,122 \rightarrow d_{met-phe} = 0,122 \cdot 100 = 12,2 \text{ u.m.}$$

$met^+ phe^+$

~~$met^- phe^-$~~

$phe^- his^-$

$phe^+ his^+$

$$f \text{ ricombinanti } phe^- his^+ = \frac{n^{\circ} \text{ ricombinanti } phe^- his^- + n^{\circ} \text{ ricombinanti } phe^+ his^+}{TOT} = \frac{4 + 205}{689} = 0,303 \rightarrow d_{phe-his} = 0,303 \cdot 100 = 30,3 \text{ u.m.}$$

Esercizio 2

7 mutanti nel gene *rII* del fago T1 sono stati testati per complementazione del ceppo *E. coli* K(λ). I risultati del test di complementazione sono indicati nella tabella di sinistra dove: + \rightarrow lisi e - \rightarrow assenza di lisi.

1. Quanti gruppi di complementazione si possono identificare?
2. È possibile ipotizzare che tutte e 7 le mutazioni siano puntiformi? Spiegare perché.

Gli stessi mutanti sono stati testati per ricombinazione con 4 delezioni. I risultati sono indicati nella tabella di destra.

3. Disegnare la mappa genetica e l'estensione dei gruppi di complementazione.

	a	b	c	d	e	f	g
a	-	+	+	+	+	-	-
b		-	+	-	+	+	+
c			-	+	-	-	+
d				-	+	+	+
e					-	-	+
f						-	-
g							-

	1	2	3	4
a	-	-	+	+
b	+	+	-	-
c	+	+	+	-
d	+	+	-	+
e	+	-	+	-
f	-	-	+	-
g	-	+	+	+

SVOLGIMENTO.

1. Quanti gruppi di complementazione si possono identificare?

Per identificare i gruppi di COMPLEMENTAZIONE guardiamo la tabella a sinistra.

GRUPPO I = a, f, g

GRUPPO II = b, d

GRUPPO III = c, e, f

2. È possibile ipotizzare che tutte e 7 le mutazioni siano puntiformi? Spiegare perché.

Facendo riferimento ai gruppi di complementazione identificati al punto 1 si vede che la mutazione "f" appartiene a 2 gruppi di complementazione quindi non si tratta di una mutazione puntiforme, ma di una DELEZIONE.

3. Disegnare la mappa genetica e l'estensione dei gruppi di complementazione.

La delezione 1 contiene le mutazioni a, f, g.

La delezione 2 contiene le mutazioni a, e, f.

La delezione 3 contiene le mutazioni b, d.

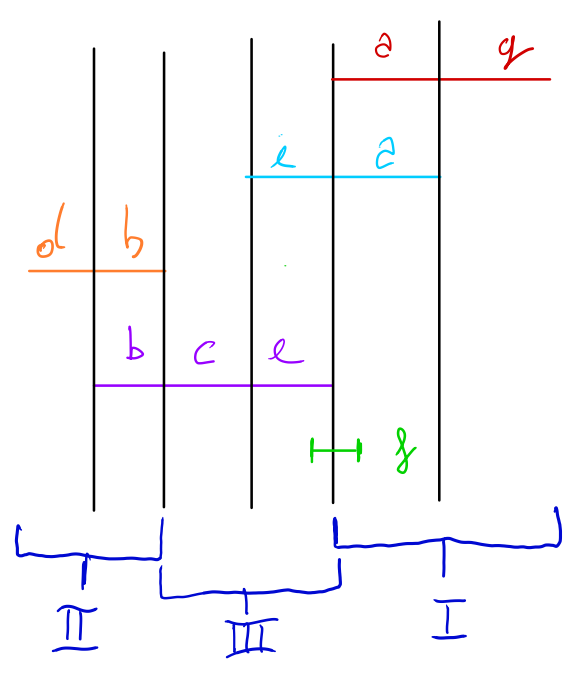
La delezione 4 contiene le mutazioni b, c, e, f.

La delezione più informativa è la a:

DELEZIONI

	1	2	3	4
a	-	-	+	+
b	+	+	-	-
c	+	+	+	-
d	+	+	-	+
e	+	-	+	-
f	-	-	+	-
g	-	+	+	+

MUTAZIONI



Esercizio 3.

Sono stati condotti degli esperimenti di coniugazione interrotta su 3 ceppi di un batterio *E. coli* Hfr prototrofo su batteri F^- auxotrofi. I risultati sono riportati di seguito:

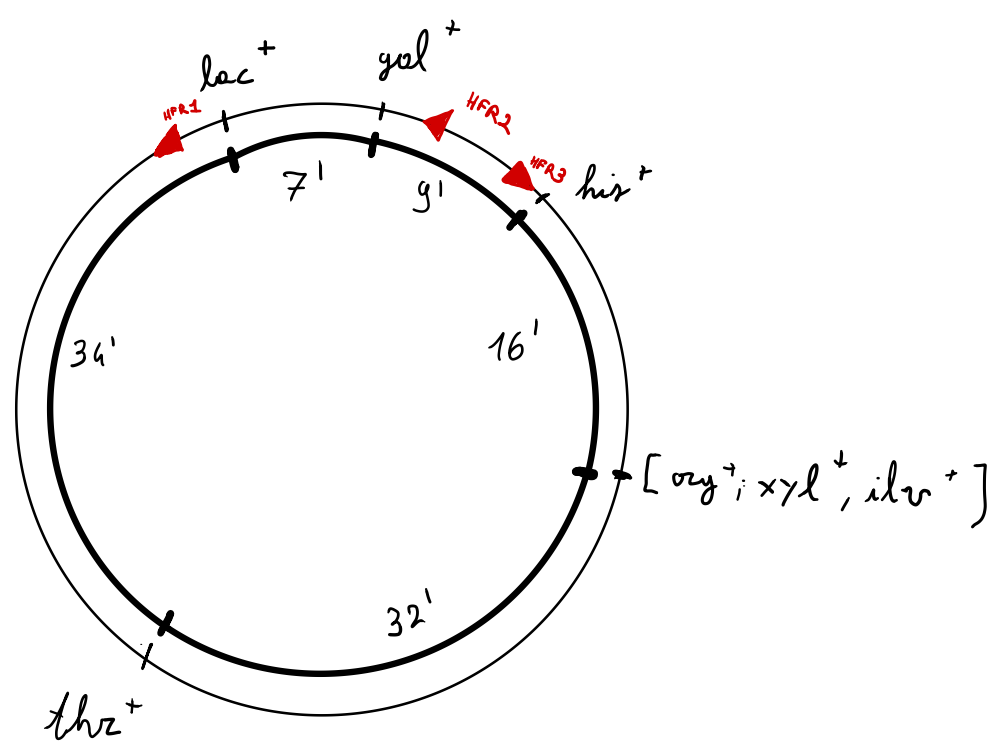
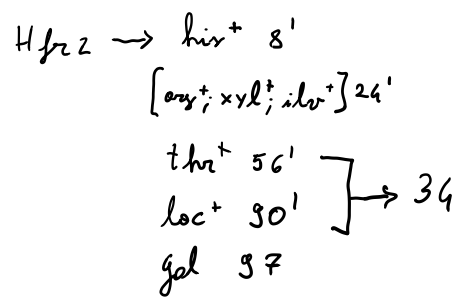
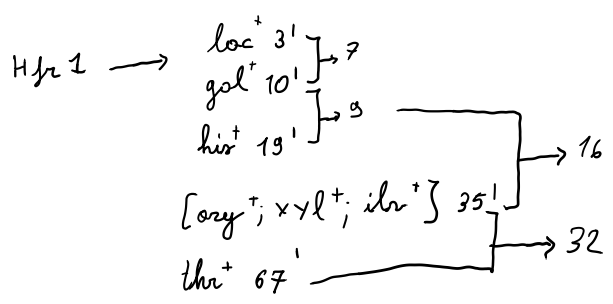
- Hfr1: $lac^+(3')$; $gal^+(10')$; $his^+(19')$; $[arg^+; xyl^+; ilv^+](35')$; $thr^+(67')$
- Hfr2: $his^+(8')$; $[arg^+; xyl^+; ilv^+](24')$; $thr^+(56')$; $lac^+(90')$; $gal^+(97')$
- Hfr3: $gal^+(7')$; $lac^+(14')$; $thr^+(48')$; $[arg^+; xyl^+; ilv^+](80')$; $his^+(96')$

* $\rightarrow [arg^+; xyl^+; ilv^+]$ è una regione cromosomica in cui l'ordine dei 3 geni non è determinabile con gli esperimenti di coniugazione interrotta.

1. Disegnare la mappa dei geni sul cromosoma circolare di *E. coli*. Indicare la posizione degli Hfr e la direzione di trasferimento di ciascuno di essi.
2. Come si potrebbe mappare la zona $[arg^+; xyl^+; ilv^+]$ e quale Hfr utilizzeresti?

SVOLGIMENTO

1. Disegnare la mappa dei geni sul cromosoma circolare di *E. coli*. Indicare la posizione degli Hfr e la direzione di trasferimento di ciascuno di essi.



2. Come si potrebbe mappare la zona $[arg^+; xyl^+; ilv^+]$ e quale Hfr utilizzeresti?

Per mappare la zona $[arg^+; xyl^+; ilv^+]$ si può fare un esperimento di coniugazione e selezione dei ricombinanti. In particolare si può fare:

CONIUGAZIONE



Hfr 2 x F^- e selezione dei ricombinanti $t^+ hcr^+$

ultimo gene che entra

Esercizio 4.

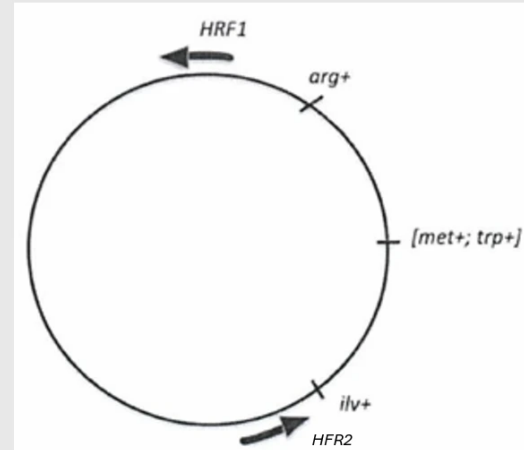
Considerando la seguente mappa batterica con 2 *hfr* integrati, in cui le frecce indicano la direzione dell'ingresso degli *hfr* nelle cellule *F*⁻ di genotipo:

$$ilv^- [met^-; trp^-] arg^-$$

Viene effettuata una mappatura per ricombinazione per mappare *met* e *trp*.

- Indicare quale dei 2 *hfr* è quello più appropriato per la mappatura, quale marcatore si utilizza per questa mappatura. Inoltre, indicare sulla mappa le posizioni e le distanze dei geni rispetto alla selezione effettuata considerando i genotipi ex-coniuganti.

- $X^+ met^+ trp^+ \rightarrow 275$
- $X^+ met^+ trp^- \rightarrow 5$
- $X^+ met^- trp^+ \rightarrow 35$
- $X^+ met^- trp^- \rightarrow 85$



SVOLGIMENTO

Per mappare i geni *met* e *trp* si usa l'**HFR1** e si seleziona per ***ilv*⁺** che è l'ultimo gene che entra. Quindi sostituiamo X^+ con ilv^+ :

$$ilv^+ met^+ trp^+ \rightarrow 275$$

$$ilv^+ met^+ trp^- \rightarrow 5$$

$$ilv^+ met^- trp^+ \rightarrow 35$$

$$ilv^+ met^- trp^- \rightarrow 85$$

I doppi ricombinanti sono i meno numerosi $ilv^+ met^+ trp^-$

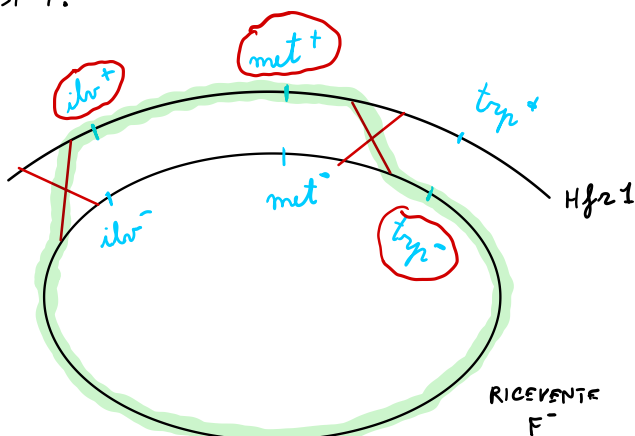
2 IPOTESI:

- met*⁺ al centro $\rightarrow ilv^+ met^+ trp^-$
- trp*⁻ al centro $\rightarrow ilv^+ trp^- met^+$

$$ilv^+ trp^- \quad trp^+ met^-$$

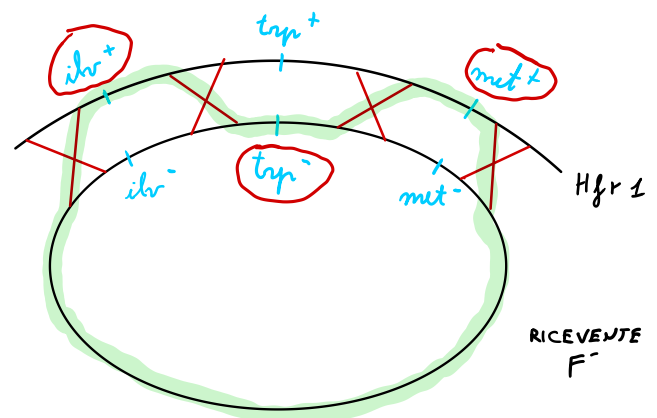
$$ilv^- trp^+ \quad trp^- met^+$$

IPOTESI 1:



2 ~~Crossing-over~~

IPOTESI 2:



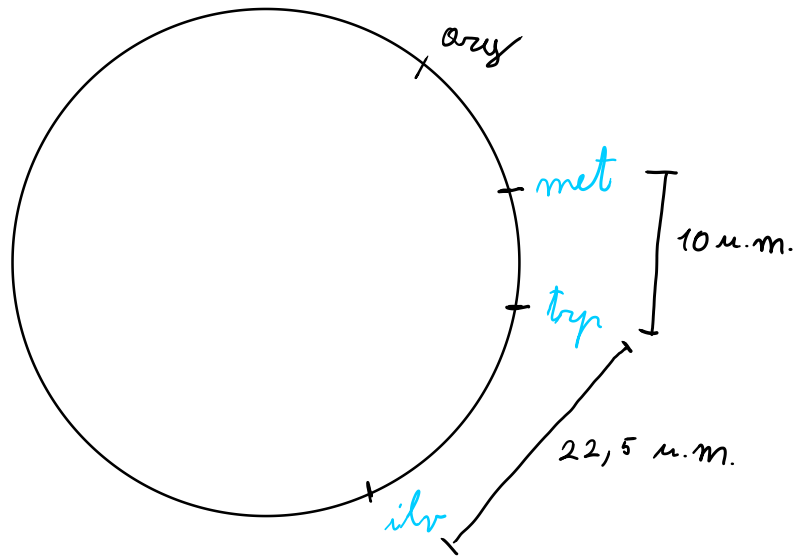
4 Crossing-over ✓ *trp*⁻ AL CENTRO

Determiniamo le distanze

$$f_{\text{ilv}^+ - \text{trp}^-} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ ricombinanti } \text{ilv}^+ - \text{trp}^-}{\text{TOT}} = \frac{85 + 5}{400} = 0,225 \rightarrow d_{\text{ilv}^+ - \text{trp}^-} = f_{\text{ilv}^+ - \text{trp}^-} \cdot 100 = 0,225 \cdot 100 = 22,5 \mu\text{m.}$$

$$f_{\text{trp}^- - \text{met}^+} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ ricombinanti } \text{trp}^+ - \text{met}^- + \text{n}^{\circ} \text{ ricombinanti } \text{trp}^- - \text{met}^+}{\text{TOT}} = \frac{5 + 35}{400} = 0,10 \rightarrow d_{\text{trp}^- - \text{met}^+} = 0,10 \cdot 100 = 10 \mu\text{m.}$$

MAPPA:



Esercizio 5.

In un esperimento di trasduzione con fagi P1 i batteri utilizzati sono:

- Donatori: $synP^+ supM^+ trpZ^+$
- Riceventi: $synP^- supM^- trpZ^-$

La selezione dei batteri viene fatta per $supM^+$ e produce i seguenti risultati:

48 $\rightarrow supM^+ synP^+ trpZ^+$
120 $\rightarrow supM^+ synP^+ trpZ^-$
500 $\rightarrow supM^+ synP^- trpZ^-$
0 $\rightarrow supM^+ synP^- trpZ^+$

Determinare:

1. Ordine dei geni.
2. Quale è la frequenza di co-trasduzione dei geni?

SVOLGIMENTO.

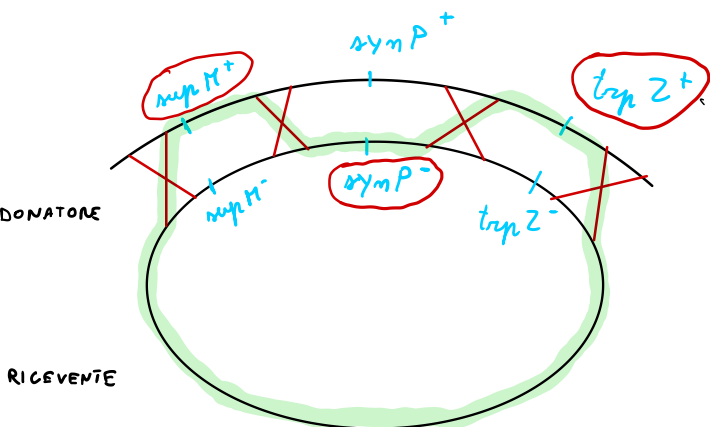
1. Ordine dei geni.

La classe meno numerosa dei doppi ricombinanti è $supM^+ synP^- trpZ^+$

2 IPOTESI:

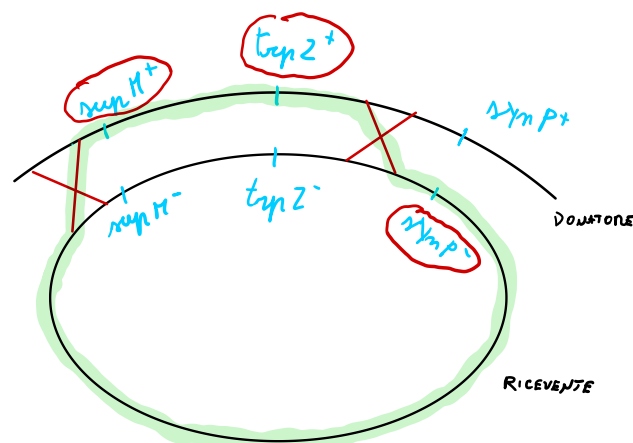
1. $synP$ al centro $\rightarrow supM^+ synP^- trpZ^+$
2. $trpZ$ al centro $\rightarrow supM^+ trpZ^+ synP^-$

IPOTESI 1:



4 crossing-over $\checkmark \rightarrow synP$ è al CENTRO

IPOTESI 2:



2 crossing-over \times

2. Quale è la frequenza di co-trasduzione dei geni?

$$f \text{ co-trasduzione } \text{supM}^+ \text{trpZ}^+ = \frac{\text{n}^\circ \text{ colonie } \text{supM}^+ \text{trpZ}^+}{\text{TOT}} = \frac{48 + 120}{668} = 0,25 \rightarrow 25\%$$

$$f \text{ co-trasduzione } \text{supM}^- \text{trpZ}^- = \frac{\text{n}^\circ \text{ colonie } \text{supM}^+ \text{trpZ}^+ + \text{n}^\circ \text{ colonie } \text{supM}^- \text{trpZ}^-}{\text{TOT}} = \frac{48 + 500}{668} = 0,82 \rightarrow 82\%$$

Esercizio 6.

In un esperimento di trasduzione generalizzata i fagi vengono raccolti da un ceppo donatore di *E. coli* di genotipo: $phe^+ gly^+ thr^+$. Questi vengono usati per trasdurre un ceppo di *E. coli* ricevente di genotipo: $phe^- gly^- thr^-$.

La popolazione di batteri trasdotti viene piastrata su un terreno contenente glicina e fenilalanina; da questo piastramento si ottengono 400 colonie. Delle 400 colonie nessuna cresce su un terreno minimo, 100 crescono su un terreno minimo con l'aggiunta di fenilalanina senza glicina e 48 crescono su un terreno minimo con glicina (senza fenilalanina).

- Indicare i genotipi delle colonie ottenute
- Costruire la mappa genica e calcolare le frequenze di co-trasduzione.

SVOLGIMENTO.

- Indicare i genotipi delle colonie ottenute

INCROCIO:

DONATORE $phe^+ gly^+ thr^+$ \otimes $phe^- gly^- thr^-$ RICEVENTE

Le 400 colonie sono cresciute tutte su un terreno minimo con l'aggiunta di phe e gly , ma senza thr . Quindi le 400 colonie sono thr^+ perché non lo richiedono dall'esterno.

Per determinare i genotipi dobbiamo fare riferimento al testo:

→ nessuna delle 400 colonie cresce su terreno minimo → $\emptyset phe^+ gly^+ thr^+$, cioè nessuna colonia è in grado di vivere sintetizzando da sé phe e gly

→ 100 crescono su terreno minimo con phe , senza gly → 100 $phe^- gly^+ thr^+$

→ 48 crescono su terreno minimo con gly → 48 $phe^+ gly^- thr^+$

→ Le restanti colonie hanno genotipo $phe^- gly^- thr^+$ → 252 $phe^- gly^- thr^+$

RICAPITOLANDO

$\emptyset \rightarrow phe^+ gly^+ thr^+$
100 $\rightarrow phe^- gly^+ thr^+$
48 $\rightarrow phe^+ gly^- thr^+$
252 $\rightarrow phe^- gly^- thr^+$

- Costruire la mappa genica e calcolare le frequenze di co-trasduzione.

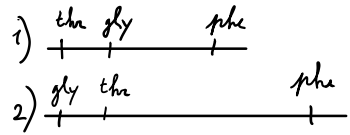
La prima cosa da fare è determinare l'ordine dei geni. Per farlo si calcolano le **FREQUENZE DI CO-TRASDUZIONE** tra il gene per cui sto facendo la selezione (thr) e gli altri due geni:

FREQUENZE DI CO-TRASDUZIONE:

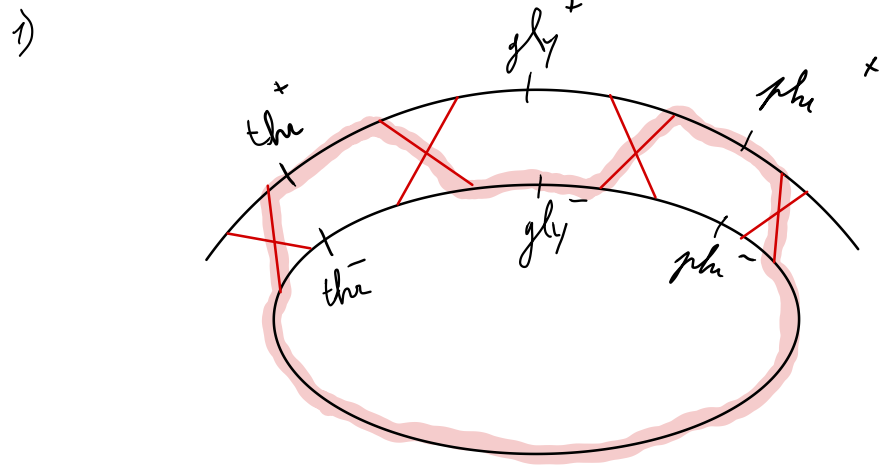
$$f_{thr^+ - phe^+} = \frac{n^{\circ} \text{colonie } thr^+ - phe^+}{TOT} = \frac{0 + 48}{400} = 0,12 \rightarrow 12\%$$

$$f_{thr^+ - gly^+} = \frac{n^{\circ} \text{colonie } thr^+ - gly^+}{TOT} = \frac{0 + 100}{400} = 0,25 \rightarrow 25\%$$

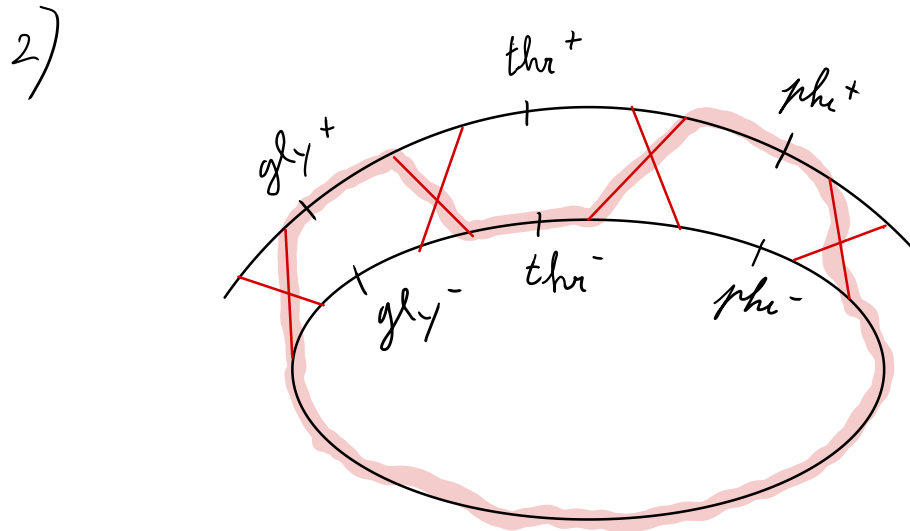
Da queste frequenze deduciamo che: *thr* è più vicino a *gly* (25%) che a *phe* (12%). Da questi dati possiamo avere che *thr* è più lontano da *phe* in 2 modi:



A questo punto valutiamo le due ipotesi e vediamo con 4 scambi cosa si origina:

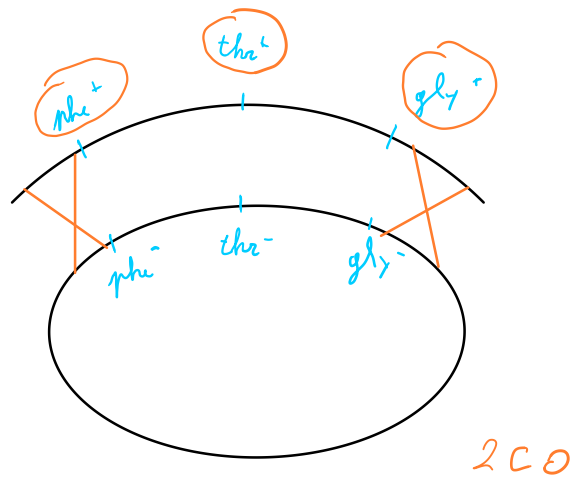


$\text{thr}^+ \text{ gly}^- \text{ phe}^+ \rightarrow 48$ (non è la classe meno frequente)



$\text{gly}^+ \text{ thr}^- \text{ phe}^+ \rightarrow$ non li ho selezionati

A questo punto posso considerare la seconda possibilità meno probabile che prevede 2 crossing over solo sulla seconda ipotesi perché lo 1° posso scartarla perché con 4 crossing-over mi dà un genotipo più frequente:



thr → è il gene centrale.

MAPPA:

thr è più vicina a gly (25%) che a phe (12%)

