

O B S A H

	Strana
PŘEDMLUVA	3
<u>GENETIKA BAKTERIÁLNÍCH VIRŮ</u>	
MORFOLOGIE A STRUKTURA BAKTERIÁLNÍCH VIRŮ	5
OBECNÁ CHARAKTERISTIKA VIRŮ, ZVLÁŠTĚ BAKTERIÁLNÍCH	5
Základní informace o virech	5
Základní rozdělení virů	6
Fágový virion, bakteriofág, fágový kmen	6
Rozmezí hostitele	6
Základní kritéria pro klasifikaci bakteriofágů	7
TYPY NUKLEOVÉ KYSELINY BAKTERIOFÁGA	7
Jednořetězcová kruhová DNA	7
Dvoušroubovicová lineární DNA s kohezními konci	7
Dvoušroubovicová lineární DNA s permutovanými geny	8
Dvoušroubovicová lineární DNA s nepermutovanými geny	9
Jednořetězcová lineární RNA	11
STRUKTURA A MORFOLOGIE FÁGOVÉHO KAPSIDU	11
Protomery a kapsomery	11
Symetrie kapsidů	11
KLASIFIKACE BAKTERIOFÁGŮ	12
Bičíkaté bakteriofágy	12
Bezbičíkaté bakteriofágy	15
Vláknité bakteriofágy	15
SÉROLOGICKÉ VLASTNOSTI BAKTERIOFÁGŮ	19
Fágové antisérum	19
Kinetika neutralizační reakce	19
Titr fágového antiséra	19
Stanovení sérologické příbuznosti mezi fágy	19
INFEKCE A LYZE BAKTERIÁLNÍCH BUNĚK Z PŮSOBENÁ FÁGOVÝMI VIRIONY	21
ZÁKLADNÍ ZNAKY LYTICKÉ INFEKCE	21
Lytická infekce	21
Fágový lyzát	21
Plaky	21
Stanovení titru fágového lyzátu	22

Poissonovo rozdělení	23
Zdůvodnění, že lyzi kultury může vyvolat jeden virion	24
ADSORPCE FÁGOVÝCH VIRIONŮ NA POVRCH BAKTERIÁLNÍCH BUNĚK	26
Fágové receptory	26
Receptory fágů skupiny A a B	26
Receptory fágů skupiny C	26
Receptory fágů skupiny E a F	26
Vstup fágové DNA do hostitelské buňky	26
Vliv vnějších faktorů na adsorpci fága	27
Konstanta rychlosti adsorpce	27
Vkladový poměr a multiplicita infekce	30
JEDNOSTUPŇOVÁ RŮSTOVÁ KŘIVKA	31
Růstový cyklus fága	31
Popis jednostupňové růstové křivky	31
Fágový výnos (burst size)	32
Vliv fyziologických podmínek na parametry jednostupňové růstové křivky	32
Ekliptické období	32
Maturace	32
STANOVENÍ FÁGOVÉHO VÝNOSU V JEDNOTLIVÝCH BUŇKÁCH	33
Charakteristika metody stanovení	33
Výpočet fágového výnosu z jednotlivých buněk	33
FENOTYPOVÉ MÍŠENÍ	36
Vysvětlení fenotypového míšení	36
Příklad fenotypového míšení	36
MODIFIKACE A RESTRIKCE INDUKOVANÁ HOSTITELEM	37
Příklad modifikace a restrikce	37
Restrikční endonukleázy	38
Metylace DNA, transmetylázy	39
Experimentální důkaz sekvencí nukleotidů citlivých na restrikční endonukleázy a transmetylázy	39
Modifikace glukozylací	41
Význam restrikce a modifikace	42
SYNTÉZA BAKTERIÁLNÍCH VIRŮ V HOSTITELSKÉ BUŇCE	43
BIOSYNTÉZA DNA-FÁGU	43
Biosyntéza fága T2 a T4	43
Biosyntéza fága T7	45
Biosyntéza fágů obsahujících jednořetězcovou kruhovou DNA	47
Biosyntéza RNA fágů	47

MUTACE A REKOMBINACE BAKTERIOFÁGA	51
FENOTYPOVÉ VYJÁDŘENÍ MUTACÍ BAKTERIOFÁGA	51
Mutace projevující se ve tvaru a vzhledu plak	51
Mutace v rozmezí hostitele	51
Mutace projevující se změnou citlivosti fága k inkubační teplotě	51
Mutace projevující se v citlivosti k supresorům	52
Výpočet frekvence mutace bakteriofága	52
TEORIE REKOMBINACE BAKTERIOFÁGA	53
Příklad rekombinace bakteriofága	53
Orientační stanovení pořadí genů a vzdálenosti mezi nimi na chromozómu	54
Pravděpodobnost rekombinace a skutečná vzdálenost mezi dvěma libovolnými geny na chromozómu bakteriofága	54
Výpočet frekvence rekombinantů (R_{xy})	58
Výpočet množství křížení (m) připadající průměrně na jednu intracelulární populaci fágových virionů	58
Definice mapové jednotky	60
HETEROZYGOTY	60
Příklad detekce fágových heterozygotů	60
Molekulární struktura heterozygotů	61
MOLEKULÁRNÍ PODSTATA REKOMBINACE BAKTERIOFÁGA	63
Spojené molekuly DNA	63
Model nereciprokého crossing-overu u fága T4	63
Model nereciprokého crossing-overu u fága λ	64
MAPOVÁNÍ CHROMOZÓMU BAKTERIOFÁGA	65
Výběr mutantů ke křížení	65
Dvoufaktorové křížení	66
Třífaktorové křížení	69
Výpočet vzdálenosti mezi geny (síly genové vazby) na základě údajů třífaktorového křížení	73
Křížení mutantů citlivých k supresorům	74
TEST KOMPLEMENTACE	74
Intergenová komplementace	74
Intragenová komplementace	75
INTERFERENCE	75
Koeficient koincidence	75
Pozitivní a negativní interference	78
Lokalizovaná vysoká negativní interference	78
GENETICKÁ ANALÝZA OBLASTI RII FÁGA T4	78
Charakteristika mutantů rII	78
Křížení mutantů rII	79
Deleční mutanty oblasti rII	79

Mapování oblasti rII pomocí delečních mutantů	80
Stanovení počtu genů v oblasti rII testem komplementace	81
MOLEKULÁRNĚ GENETICKÉ METODY MAPOVÁNÍ CHROMOZÓMU BAKTERIOFÁGA	81
Mapování štěpením DNA nukleázami	81
Denaturační mapování	81
Hybridizační mapování delecí	82
GENETICKÉ MAPY CHROMOZÓMU NĚKTERÝCH BAKTERIOFÁGŮ	82
Genetická mapa chromozómu fága T4	82
Genetická mapa chromozómu bakteriofága T7	85
Genetická mapa chromozómu bakteriofága ØX174	88
Genetická mapa chromozómu RNA bakteriofágů	88
LYZOGENIE A GENETIKA TEMPEROVANÉ - H O F Á G A	91
REAKCE BAKTERIÁLNÍ BUŇKY NA INFEKCI TEMPEROVANÝM FÁGEM	91
Lyzogenizace	91
Vlastnosti lyzogenních kmenů	91
Životní cyklus temperovaného fága	92
Výskyt lyzogenie	92
TEMPEROVANÝ FÁG λ	92
Základní charakteristika	92
Mutanty fága λ	94
CHROMOZÓM FÁGA λ	94
Lineární a kruhová forma chromozómu fága λ	94
Lineární forma genetické mapy chromozómu fága λ	95
Kruhová forma genetické mapy chromozómu fága λ	96
GENETICKÁ PODSTATA NAVOZENÍ LYTICKÉHO CYKLU FÁGA λ	97
Raná fáze	97
Zpomalená raná fáze	98
Pozdní fáze	98
GENETICKÁ PODSTATA NAVOZENÍ LYZOGENNÍHO STAVU	99
Pochody směřující k navození lyzogenního stavu	99
Pochody působící proti navození lyzogenního stavu	100
Imunitní represor a podstata jeho účinku na operátor	100
LYZOGENNÍ STAV	101
Začlenění (integrace) chromozómu fága λ do chromozómu bakteriální buňky	101
Podstata imunity lyzogenní buňky	103
Zrušení lyzogenního stavu	103
FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ FREKVENCI LYZOGENNÍ ODPOVĚDI	104
Frekvence lyzogenizace	104
DEFEKTIVNÍ LYZOGENY A DEFEKTIVNÍ PROFÁGY	104
Vznik defektivních lyzogenů	104
Křížení defektivního profága s nedefektivním fágem	105

LYZOGENNÍ KONVERZE	106
Lyzogenní konverze	106
Lyzogenní konverze u salmonel	106
Lyzogenní konverze u <i>C. diphtheriae</i>	106

GENETIKA BAKTÉRIÍ

ZÁKLADNÍ POJMY A NOMENKLATURA BĀKTERIÁLNÍ GENETIKY	108
---	-----

CHROMOZÓM BAKTERIÁLNÍ BUŇKY	108
Struktura	108
Replikace	108
REKOMBINACE	110
Merozygota	110
Způsoby přenosu DNA	110
NOMENKLATURA BAKTERIÁLNÍ GENETIKY	110
Označování genotypu	110
Označení fenotypu	112

MUTACE BAKTÉRIÍ	117
-----------------	-----

AUXOTROFNÍ MUTANTY	117
Auxotrofie a prototrofie	117
Izolace auxotrofních mutantů penicilinovou metodou	117
Využití auxotrofních mutantů ke studiu biochemických reakcí	117

MUTANTY REZISTENTNÍ K ANTIBIOTIKŮM	118
Izolace mutantů rezistentních k antibiotikům	118
Rezistence k antibiotikům vzniklá ve více mutačních stupních	121
Metoda gradientních ploten	121
Rezistence k antibiotikům vzniklá v jednom mutačním stupni	121
Podstata účinku streptomycinu na bakterie Str^S a Str^R	121

JINÉ SKUPINY MUTANTŮ	123
Mutanty citlivé k supresorům	123
Supresor pozitivní mutanty	123
Mutanty citlivé k inkubační teplotě	124
Mutanty vzniklé intragenovou nebo nepřímou intragenovou supresí	124

JADERNÁ SEGREGACE	126
Vznik sektorových kolonií	126
Experimentální důkaz jaderné segregace	126

FENOTYPICKÉ ZDRŽENÍ	127
Pojem fenotypického zdržení	127
Zdržení v segregaci	127
FLUKTUAČNÍ TEST	128
Mutace a fenotypová modifikace	128
Význam fluktuačního testu	128
Poissonovo rozdělení mutací	128
Důsledky Poissonova rozdělení mutací pro počty mutantů v sérii paralelních kultur	130
Rozdělení počtu buněk s fenotypickou modifikací indukovanou v sérii paralelních kultur z vnějška	130
Technika provedení fluktuačního testu	131
NEWCOMBUV TEST	132
METODA NEPŘÍMÉ SELEKCE MUTANTU	135
MUTAČNÍ RYCHLOST	136
Stanovení mutační rychlosti tzv. první metodou	136
Vyloučení vlivu fenotypického zdržení při první metodě	138
T R A N S F O R M A C E	139
ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA TRANSFORMACE	139
Transformace a typy transformantů	139
Za jakých podmínek se může transformace uskutečnit	139
Příklad transformace	139
Požadavky na DNA extrahovanou z donora	141
Závislost počtu transformantů na koncentraci transformující DNA	141
Výskyt transformace	142
MECHANISMUS REKOMBINACE TRANSFORMUJÍCÍ DNA S CHROMOZÓMEM	
RECIPIENTNÍ BUŇKY	143
Experimentální důkaz hybridní DNA v transformující se recipientní buňce	143
Dodatečný důkaz hybridní DNA	144
Model rekombinace transformující DNA s chromozómem recipienta	147
KRITÉRIA GENOVÉ VAZBY NA MOLEKULE DNA	147
Co rozumíme vazebným přenosem genů při transformaci	147
Stanovení genové vazby	147
T R A N S D U K C E	150
ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA TRANSDUKCE	150
Transdukce	150
Výskyt nespecifické transdukce	150

ZÁKLADNÍ PŘEDPOKLADY K PROVEDENÍ NESPECIFICKÉ TRANSDUKCE	150
Požadavky na fágový kmen použitý k transdukcii	150
Transdukující fágové částice	151
Typy transduktantů	152
Příklad transdukce	152
DŮKAZ EXISTENCE CHROMOZÓMOVÉHO FRAGMENTU V TRANSDUKUJÍCÍ ČÁSTICI	153
Experimentální provedení	153
Rozlišení lytický aktivních virionů od transdukujících částic	153
Frekvence transdukujících částic ve fágovém lyzátu	156
Frekvence transdukujících částic v lyzátu přenášejících určitý gen z donora	156
KOTRANSDUKCE A JEJÍ VÝZNAM PRO STANOVENÍ VAZBY MEZI GENY	157
Kritéria pro genovou vazbu při transdukcii	157
Frekvence kotransdukce a skutečná vzdálenost mezi geny	157
KŘÍŽENÍ REALIZOVANÉ NESPECIFICKOU TRANSDUKCÍ	158
Dvoufaktorové křížení	158
Třífaktorové křížení	158
Intragenová rekombinace	159
ABORTIVNÍ TRANSDUKCE	159
Co rozumíme abortivní transdukcí	159
Složení klonu abortivních transduktantů	160
Mikrokolonie	160
Intergenová komplementace (cis-trans test) realizovaná abortivní transdukcí	160
ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA SPECIFICKÉ TRANSDUKCE	163
Viriony λ gal a λ bio	163
Lyzát LFT	163
Dvojitě lyzogenní heterogenoty	164
Štěpení heterogenotů	165
Lyzát HFT	166
Důkaz existence virionů λ gal	166
MAPOVÁNÍ CHROMOZÓMU FÁGA λ A GALAKTÓZOVÉHO OPERONU POMOCÍ SPECIFICKÉ TRANSDUKCE	168
Deleční mapování chromozómu λ	168
Mapování galaktóзовého operonu	168
K O N J U G A C E	169
ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA KONJUGACE A KONJUGATIVNÍCH PLAZMIDŮ	169
Druhy transkonjugantů	169
Konjugativní plazmidy, pilusy	169

Typy pilusů, donorově specifické bakteriofágy	169
Volný (autonomní) stav konjugativních plazmidů	170
Stav Hfr konjugativního plazmidu	170
Epizomální konjugativní plazmidy	170
F PLAZMID	170
Genetická struktura F plazmidu	170
Kmeny F^+ a F^-	170
Konjugační shluky	171
Přenos F plazmidu do buňky F^-	172
Buňky Hfr	172
Model rekombinace chromozómu Hfr s chromozómem F^-	174
Výskyt konjugace	176
KONJUGACE A KŘÍŽENÍ KMENU F^+ A F^-	176
Příklad křížení kmene F^+ s kmenem F^-	176
Výklad konjugace a křížení kmenů F^+ s kmeny F^-	177
DŮKAZ SPONTÁNNÍHO VZNIKU BUNĚK HFR V POPULACI F^+	179
Důkaz spontánního vzniku buněk Hfr v populaci F^+	179
Detekce buněk Hfr v populaci F^+	179
Základní charakter křížení kmenů Hfr s F^-	181
NEPŘERUŠOVANÁ KONJUGACE	181
Princip nepřerušované konjugace	181
Příklad nepřerušované konjugace	181
PŘERUŠOVANÁ KONJUGACE	183
Princip přerušované konjugace	183
Příklad přerušované konjugace	183
Grafické znázornění kinetiky přerušované a nepřerušované konjugace	184
Charakteristika vstupu chromozómu Hfr do buňky F^-	185
VLASTNOSTI RŮZNÝCH KMENŮ HFR A DŮKAZY KRUHOVÉHO CHROMOZÓMU	
E. COLI K12	186
Vlastnosti kmenů Hfr	186
Genetický důkaz kruhového chromozómu E. coli K12	186
Genetická mapa chromozómu E. coli	188
Důkaz začlenění F plazmidu do chromozómu buňky F^+	189
Důkazy, že chromozóm je kruhový v buňkách Hfr i F^-	189
ZYGOTICKÁ INDUKCE A IMUNITNÍ REPRESOR	192
Základní charakteristika zygotické indukce	192
Důkaz umístění profága λ na chromozómu E. coli	192
VELIČINY URČUJÍCÍ FREKVENCI REKOMBINANTŮ PŘI NEPŘERUŠOVANÉ KONJUGACI	192
Účinnost přenosu a integrace	192
Štanovení účinnosti přenosu a integrace	193
Matematická formulace závislosti frekvence rekombinace daného genu na jeho vzdálenosti od počátku chromozómu	195

Zlomová konstanta	195
Stanovení doby integrace	196
F' PLAZMID	198
Typy F' plazmidu	198
Kmeny F'	198
DŮKAZ UMÍSTĚNÍ FÁGA λ NA CHROMOZÓMU	201
PLAZMIDY	202
OBECNÁ CHARAKTERISTIKA PLAZMIDU	202
Pojem plazmidu	202
Rozdíl mezi plazmidem a chromozómem	202
Relaxační komplexy a replikace plazmidu	202
Konjugativní a nekonjugativní plazmidy	204
Vstup plazmidu do recipientní bunky	205
Epizomální plazmidy	206
Kritéria, podle nichž se usuzuje na přítomnost plazmidů v buňkách	206
KOMPATIBILITA A INKOMPATIBILITA PLAZMIDŮ	207
Charakteristika kompatibility a inkompatibility	207
Podstata kompatibility a inkompatibility	207
REKOMBINACE PLAZMIDŮ	208
Rekombinace mezi inkompatibilními plazmidy	208
Rekombinace mezi kompatibilními plazmidy	208
NOMENKLATURA PLAZMIDŮ	212
Označování plazmidů	212
Označování plazmidových genů a fenotypu	213
Rozdělení plazmidů	215
R PLAZMIDY ENTEROBAKTÉRIÍ	215
Charakteristika R plazmidů enterobaktérií	215
Výskyt R plazmidů	215
Plazmidy R(Fi ⁺) a R(Fi ⁻)	216
COL PLAZMIDY	218
Přenos Col plazmidů	218
Charakter kolicinogenních transkonjugantů	219
Ostatní plazmidy enterobaktérií	220
PLAZMIDY RODU PSEUDOMONAS	221
R plazmidy	221
Konjugativní plazmidy rodu Pseudomonas	222
Degradativní plazmidy rodu Pseudomonas	223
Plazmidy obsahující geny pro rezistenci k iontům rtuti	223

PLAZMIDY DRUHU S. AUREUS	223
Příklady plazmidů S. aureus.	223
Penicilinázový plazmid	223
VYUŽITÍ PLAZMIDŮ V GENETICKÉM INŽENÝRSTVÍ	226
LITERATURA	230
OBSAH	237

