

Cílené mutanty



Vytváření cílených mutant

□ Princip

- na základě homologie integrace pozměněné alely vedoucí ke změně studovaného genu (knock out, delece, změna funkce)
- vyvinuty metody jak přenést gen z vektoru na chromosom
 - integrační plazmidy (nereplikují se v daném organismu)
 - Nekompatibilní plazmidy
 - Rekombinantní fágy

□ Použití

- vytváření cílených mutant - studium funkce genů
 - mutanty vybraného genu na základě znalosti jeho sekvence
- vyřazení genů
 - vkládáním rezistentních kazet
 - delecí genů
- vytváření duplikací genů – komplementace
 - rekombinací Campbellova typu s jedním crossing overem se inkorporuje celý plazmid (není stálá mutace).
- pomocí speciálních plazmidů studium regulace z promotorů
 - plazmidy mají homologii s genem ne nezbytným (u *B. subtilis* amylasa)

Vytváření cílených mutant

- **1. krok** - vytvoření konstruktů – rekombinantní techniky
 - bodová mutace
 - delece
 - inserce kazety
 - fúze promotoru s reportérovým genem
 - fúze genu s reportérovým genem
- **2. krok** – vnesení mutace do chromosomu – genetické metody
 - systémy výměny allel
 - závisí na studovaném organismu
 - plazmidy
 - Fágy
- **3. krok** – izolace žádaného mutantu

Cílená mutagenese – 1. krok

Použití technik rekombinantní DNA umožňují cílené změny basí a vyvoláním patřičné mutace studium odezvy na fenotyp

- předpokladem je znalost sekvence studované části genomu
- omezeno na bakteriální druhy, u nichž jsou vyvinuty genetické techniky (přenos DNA, rekombinantní vektory, systémy výměny allel)
- **Specifická záměna basí**
 - studium aktivního místa enzymu či transportního proteinu
 - zavedení stop kodonu
- **Vytváření krátkých delecí**
 - efektivní vyřazení genu (knockout)
 - studium role enzymu v metabolismu
- **Postup**
 - provedení mutace v allele in vitro
 - vřazení mutantní allely do genu v chromosomu
 - selekce mutovaného klonu od genetického pozadí

Cílená mutagenese

- Pomocí restričních endonukleas a exonukleas.
- Pomocí PCR a modifikovaných oligonukleotidů

Další studium

- na arteficiálních systémech (např. expresní vektory v *E.coli*)
- rekombinace do původního divokého kmene.

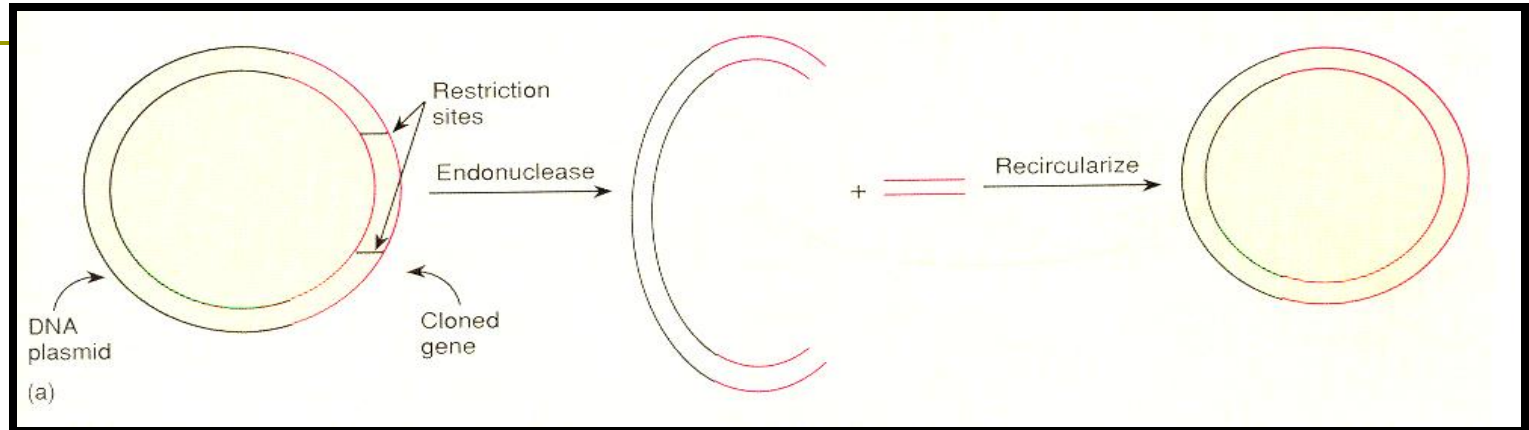
Důležitá je volba záměny aa k dosažení žádaného efektu

Table 2 Substitutions accepted by homologous proteins during evolution

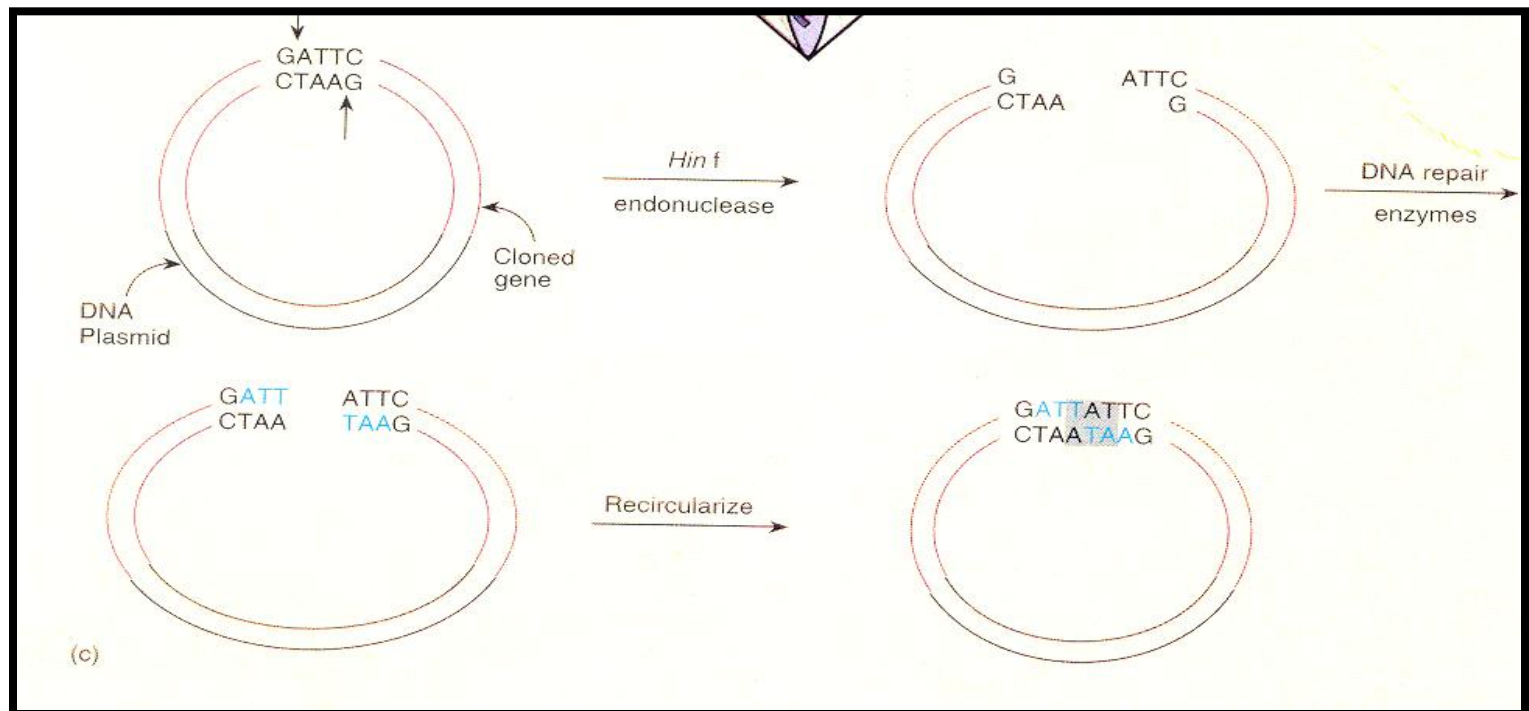
Cys → Ser	Ser → Ala, Thr, Asn, Gly, Pro
Thr → Ser, Ala, Val	Pro → Ala, Ser
Ala → Ser, Gly, Thr, Pro	Gly → Ala, Ser
Asn → Asp, Ser, His, Lys, Gln, Glu	Asp → Glu, Asn, Gln, His, Gly
Glu → Asp, Gln, Asn, His	Gln → Glu, His, Asp, Asn, Lys, Arg
His → Asn, Gln, Asp, Glu, Arg	Arg → Lys, His, Trp, Gln
Lys → Arg, Gln, Asn	Met → Leu, Ile, Val
Ile → Val, Leu, Met	Leu → Met, Ile, Val, Phe
Val → Ile, Leu, Met	Phe → Tyr, Leu, Ile
Tyr → Phe, His, Trp	Trp → Phe, Tyr

Cílená mutagenese - příklady

A) delece

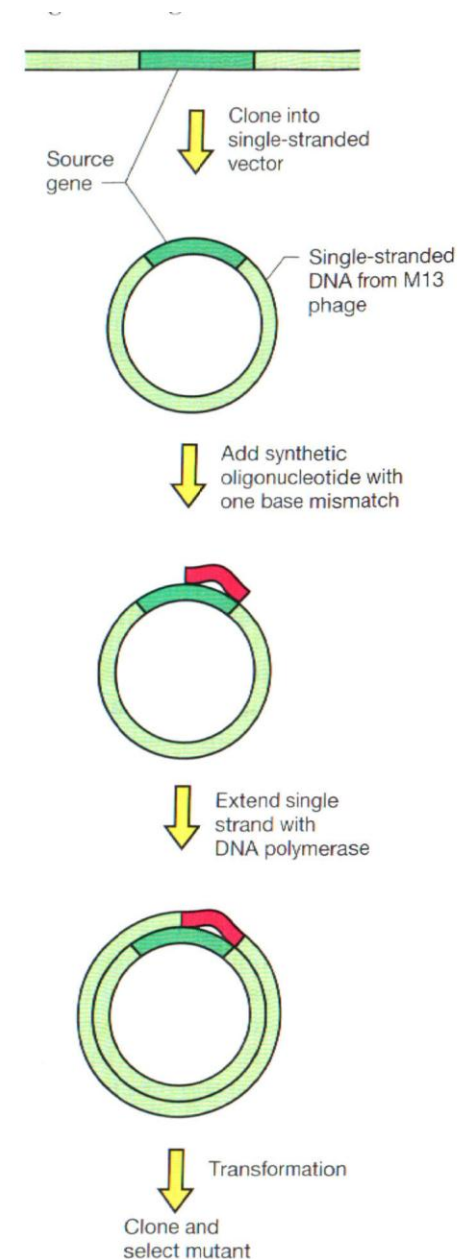


B) inserce



Cílená mutageneze – princip

- ssDNA s naklonovaným genem
- Hybridizace s mutovaným oligonukleotidem
- Syntéza druhého vlákna
- Transformace
- Selekcce žádaných mutant.



Cílená mutagenese - příklady

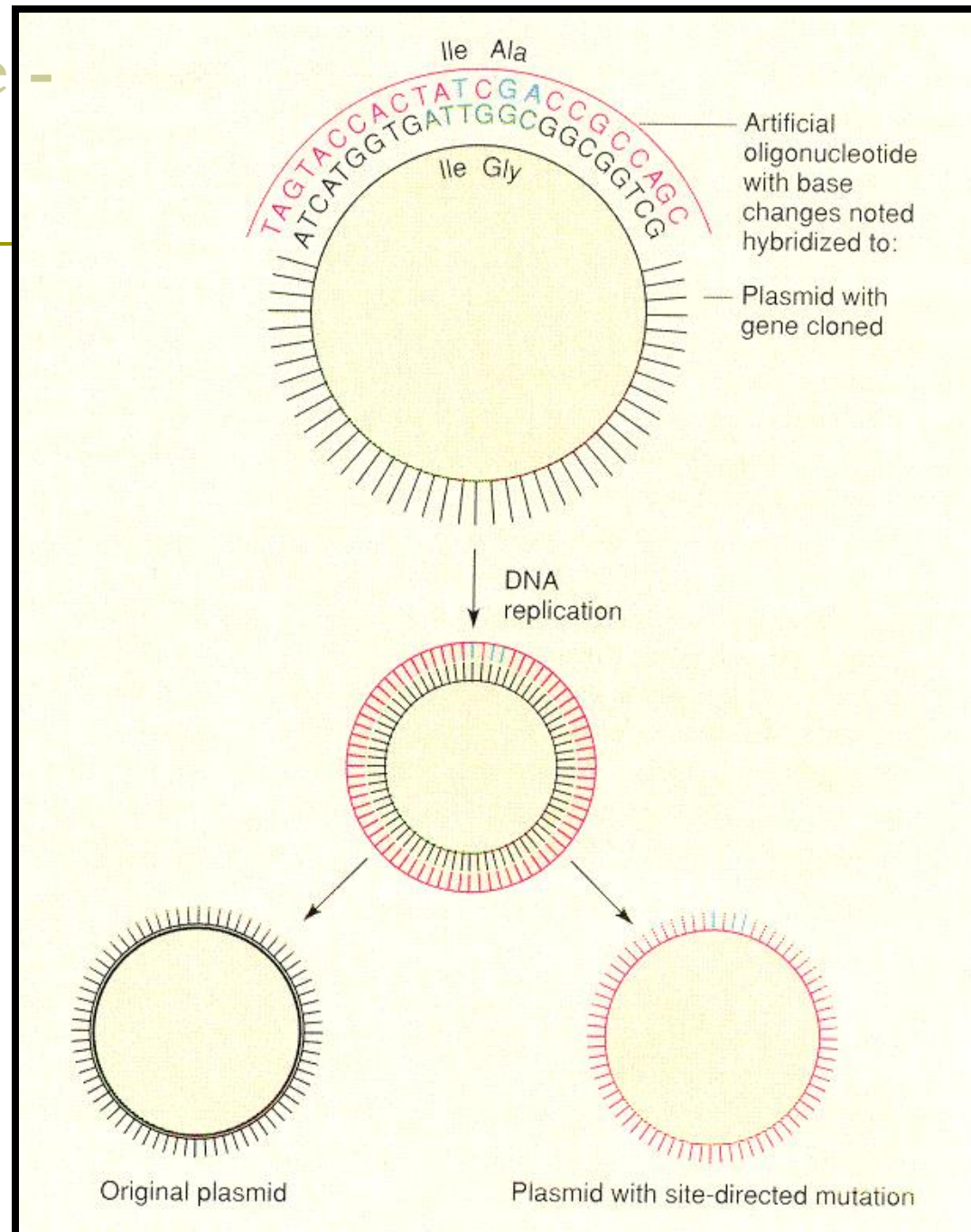
C) záměna aminokyselin metoda single-primer (M13 vektor)

nutnost následné selekce
mutantních klonů

- ▣ hybridizace (stringentní podmínky)
- ▣ biochemické i genetické přístupy

snižování efektivity

- ▣ neúplná dsDNA
- ▣ opravný systém buňky opravující nemethylovaný heteroduplex
- ▣ mutanty mutS, dam, atd.



Cílená mutagenese - příprava primerů

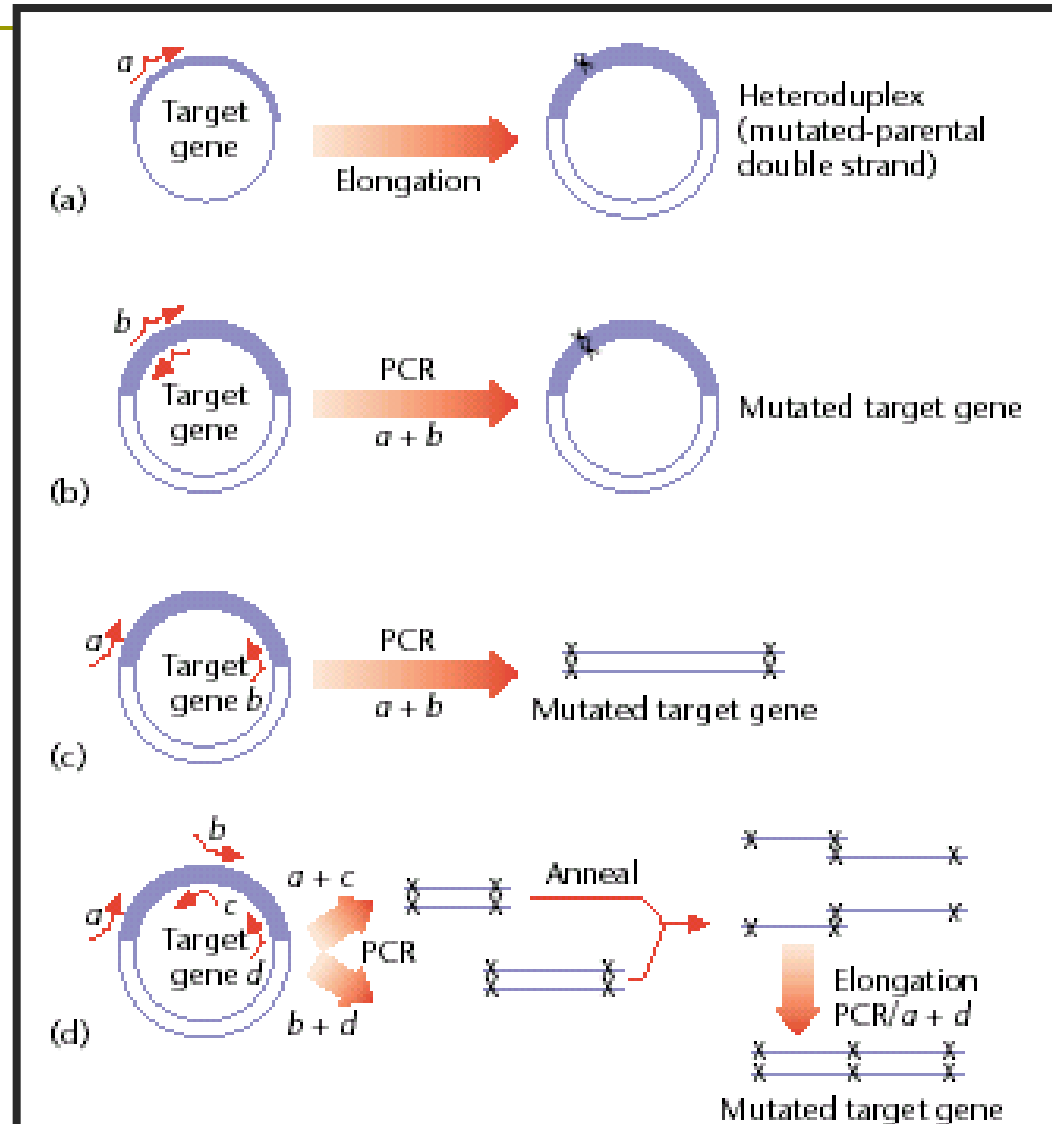
PCR-based methods

a,b) mutace uprostřed žádané sekvence: použitím jednoho nebo dvou komplementárních oligonukleotidů se syntetisuje celý plasmid

c) mutace v terminální části se docílí pomocí dvou mutovaných oligonukleotidů, kterými se syntetisuje celý gen

d) několikanásobné mutace se docílí dvěma páry oligonukleotidů, vnějších a vnitřních a následné PCR reakce z vnějších oligonukleotidů.

Mutagenesis: Site-specific
ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES / &
2001 Nature Publishing Group / www.els.net



Cílená mutagenese - PCR

- Polymerázy vhodné pro cílenou mutagenezi - přesně čtoucí bez „strand displacement“

Table 1 Commercially available DNA polymerases for site-specific mutagenesis (alphabetically by supplier)

DNA polymerase	Supplier	Web address
<i>Thermolabile</i>		
T4 DNA polymerase	Amersham Pharmacia Biotech	http://www.apbiotech.com/stibo/owa_default_service/plsql/sd.m.showModule?nModuleid=41391
T7 DNA polymerase (cloned)		http://www.apbiotech.com/stibo/owa_default_service/plsql/sd.m.showModule?nModuleid=41392
T7 Sequenase version 2.0 DNA polymerase		http://www.apbiotech.com/stibo/owa_default_service/plsql/sd.m.showModule?nModuleid=41393
<i>Thermostable</i>		
SuperTaq Plus_	Ambion, Inc.	http://www.ambion.com/catalog/catalog2.asp?catnum=205x
Advantage cDNA polymerase mix	Clontech Laboratories Inc.	http://www.clontech.com/clontech/Catalog/PCR/Advantage.html
Advantage genomic polymerase mix		
Advantage-HF polymerase mix		http://www.clontech.com/clontech/Catalog/PCR/Advantage-HF.html
KlenTaq LA polymerase mix		http://www.clontech.com/clontech/Catalog/PCR/KlenTaq.html
MasterAmp_ TAQurate_ DNA polymerase mix	Epicentre Technologies	http://www.epicentre.com/catalog/taqurate.htm
ELONGASE enzyme mix	Life Technologies Inc. (Gibco brl)	http://www2.lifetech.com:80/catalog/techline/molecular_biology/Manuals_PPS/10480010.pdf
Platinum [®] Pfx DNA polymerase		http://www2.lifetech.com:80/catalog/techline/molecular_biology/Manuals_PPS/11708013.pdf
VentR [®] DNA polymerase	New England Biolabs Inc.	http://www.neb.com/neb/products/polymerases/254.html
Tli DNA polymerase	Promega Corp.	http://cgi.promega.com/catalog/catinfo.asp?idx=1128
Expand High Fidelity PCR System	Roche Molecular	http://193.197.95.199/molecula/polymera/expandta/index.phtml
Pwo DNA polymerase	Biochemicals	http://193.197.95.199/products/644955.phtml
AccuTaq LA DNA polymerase mix	Sigma	http://www.sigma-aldrich.com/sacatalog.nsf/ProductLookup/sigmad8045?OpenDocument
PfuTurbo [®] DNA polymerase	Stratagene	http://www.stratagene.com/pcr/pfuturbo.htm
Pfu DNA polymerase		http://www.stratagene.com/pcr/pfu.htm
Accurase polymerase mix	Tetra Link International Inc.	http://www.tetra-link.com/accurase.htm

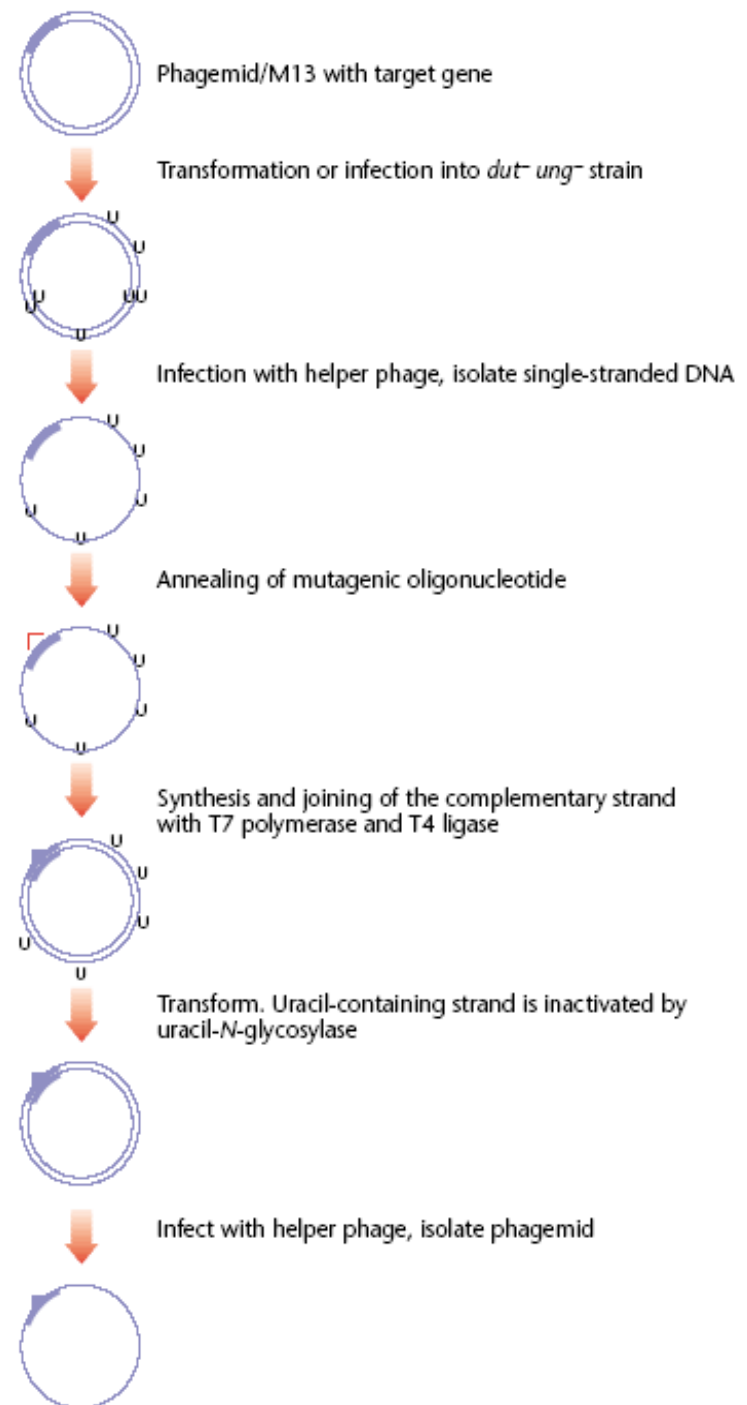
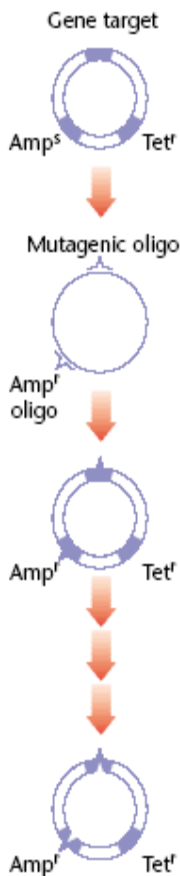
Cílená mutagenese - genetické přístupy

Metoda založená na inkorporaci deoxyuridinu

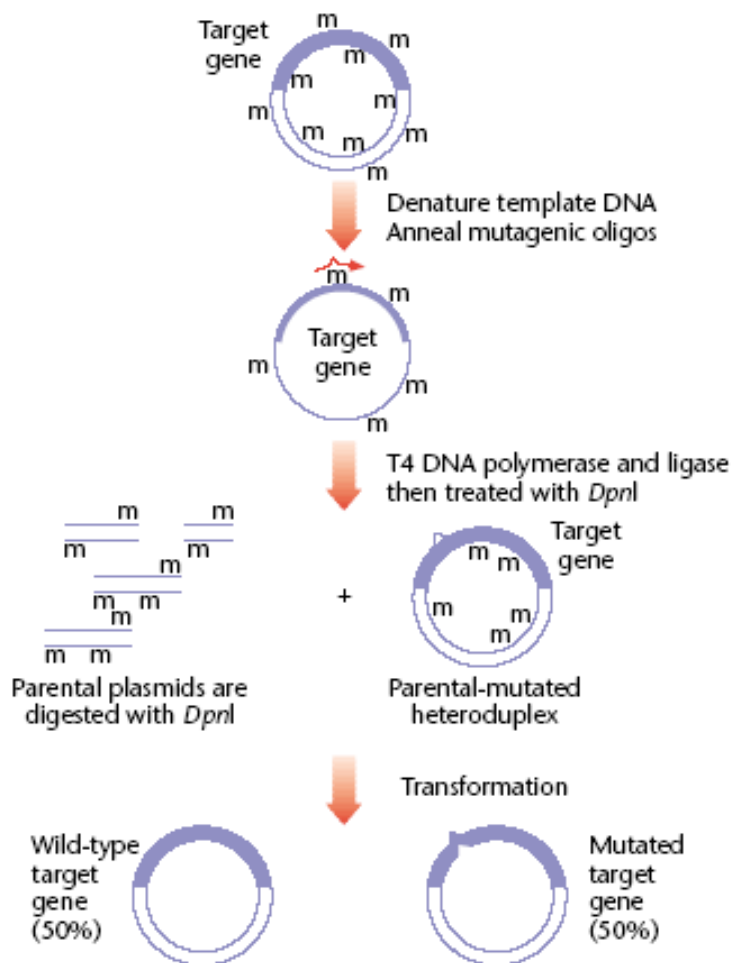
- komerčně dostupný jako kit
- Muta-Gene1 Phagemid in vitro Mutagenesis Kit, Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Altered sites1 II In vitro mutagenesis systems

- (Promega, Madison, WI, USA)
- založený na dvou mutantních primerech
- mutující cílový gen
- obnovující Amp resistenci
- heteroduplex transformován do mismatch repair-deficientních *E. coli* hostitelských kmenů (mutS)



Cílená mutagenese - biochemické přístupy



Thionucleotide selection-based method

- pro tvorbu druhého vlákna použity dNTPaS
- parentální vlákno neobsahující thiobase je degradováno
- Sculptor In Vitro Mutagenesis System from Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA



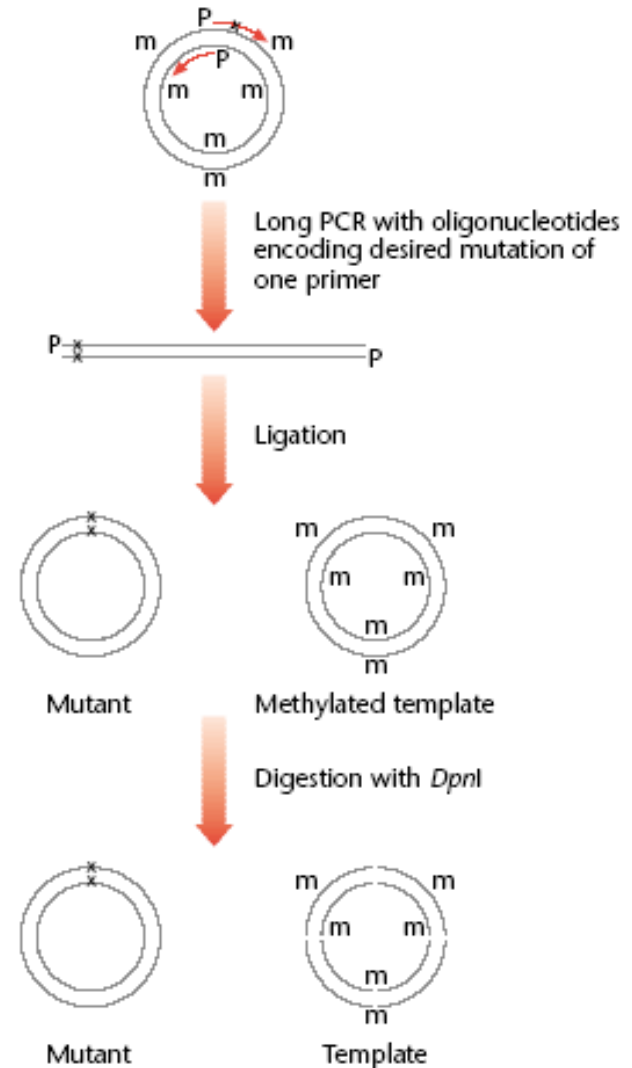
Methylation-based method

- MORPH2 SiteSpecific Plasmid DNA Mutagenesis Kit, 5 Prime Inc., Boulder, CO, USA)

Cílená mutagenese - PCR metody

□ Inversní PCR

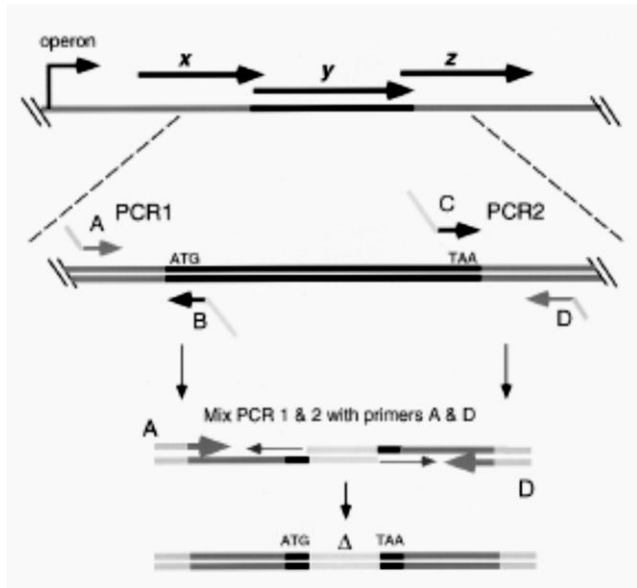
- ExSite2 PCR-Based Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene)
Fisher CL and PeiGK(1997)
Modification of a PCR-based site-directed mutagenesis method.
Biotechniques 23: 570–574.
- alespoň jeden primer musí být fosforylován
- selekce mutant probíhá na principu methylace
- lze použít i pro delece a inserce
Dorrell N, Gyselman VG, Foyne S, Li SR and Wren BW (1996) Improved efficiency of inverse PCR mutagenesis.
BioTechniques 21:604–608.



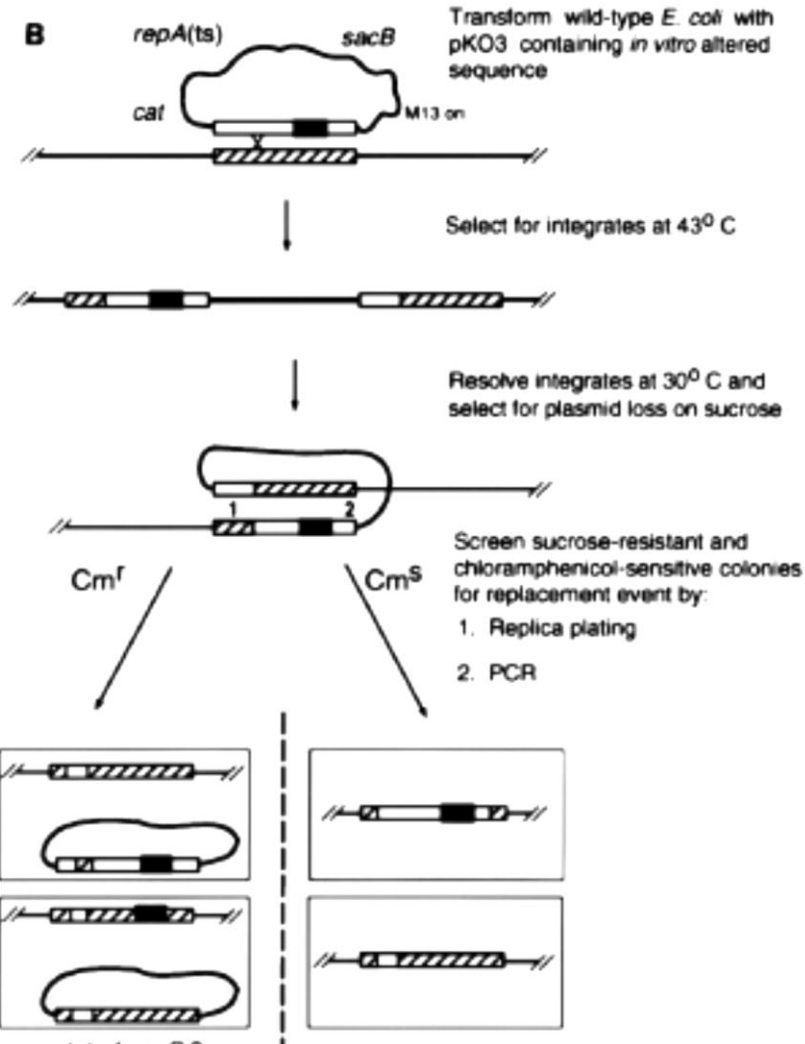
Příprava delecí – přesné in frame delece

- 1997 –nový systém vektorů pro mutagenesi chromosomu
- Použití k inaktivaci neznámých ORF
 - Možno použít ve WT kmenech
 - Nevznikají sekundární mutace
 - Nemají polární efekt
 - Delece předem definované části genu
 - Delece polycystronních genů bez ovlivnění okolí
- Vytvoření delecí pomocí „cross- over“ PCR in vitro na plasmidech
- Vložení do chromosomu – selekce na markery na plasmidu
- Nutná znalost sekvence a konstrukce vhodných plasmidů

Příprava delecí – přesné delece



- Primery pro PCR
 - Vnější primery HindII sekvenci – klonování do plasmidu
 - Vnitřní primery překrývající se konce – slouží jako primery v 2. PCR
 - J.Bact. 179, 6228



pKO3 plasmid
Ts replikace

1-5 kolonií do LB a vyseto na 5% sacharosu 30 Cat a 43 °C
 Poměr 30 °C sac^R/43 °C cat^R frekvence vyštěpení

cat^S sac^R 30
 žádané mutanty
 PCR kontrola

Systemy výměny allel – 2. krok

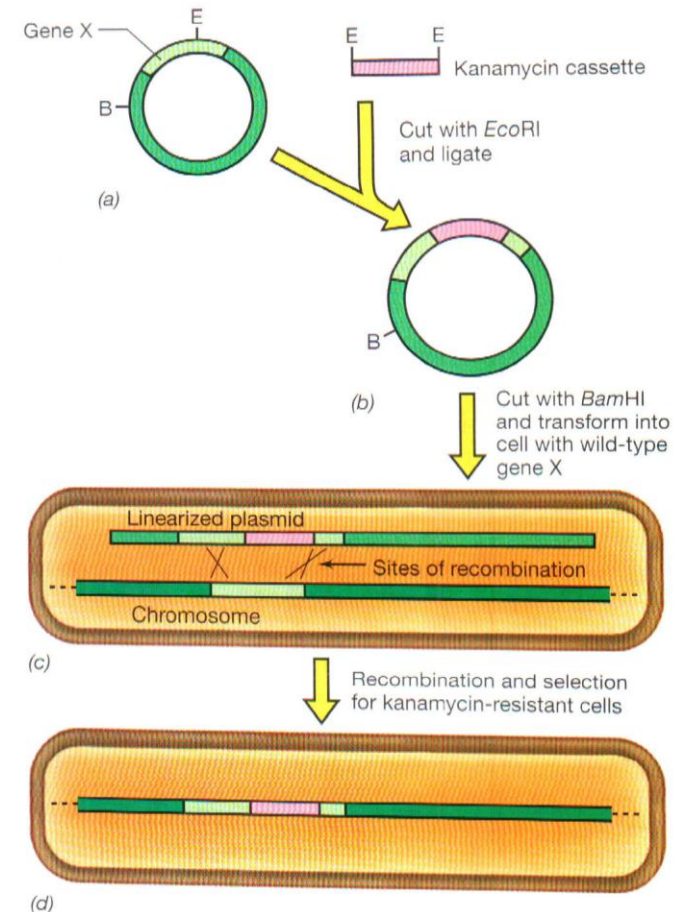
plazmidy s podmíněnou replikací –

- specifický insert je vložen do plazmidu a vpraven do recipienta
- na základě homologie s recipientem dojde k rekombinaci
- na základě vlastností plazmidu (resistence) a neschopnosti replikace je možno selektovat pouze rekombinanty v chromosomu
 - př.: podmíněné replikace teplotně sensitivní, replikace v permisivním hostiteli
 - přenos transformací či konjugací
- jednoduchý crossing over – cirkulární vektor
 - Duplikace selektovány na marker v plazmidu –
- dvojitý crossing over –
 - probíhají s malou frekvencí
 - špatně se selektují pokud není systém přímé selekce
 - selekce na vložený marker
 - knock-out – musí být gen s markerem –

Výměna allel -

□ Knock out:

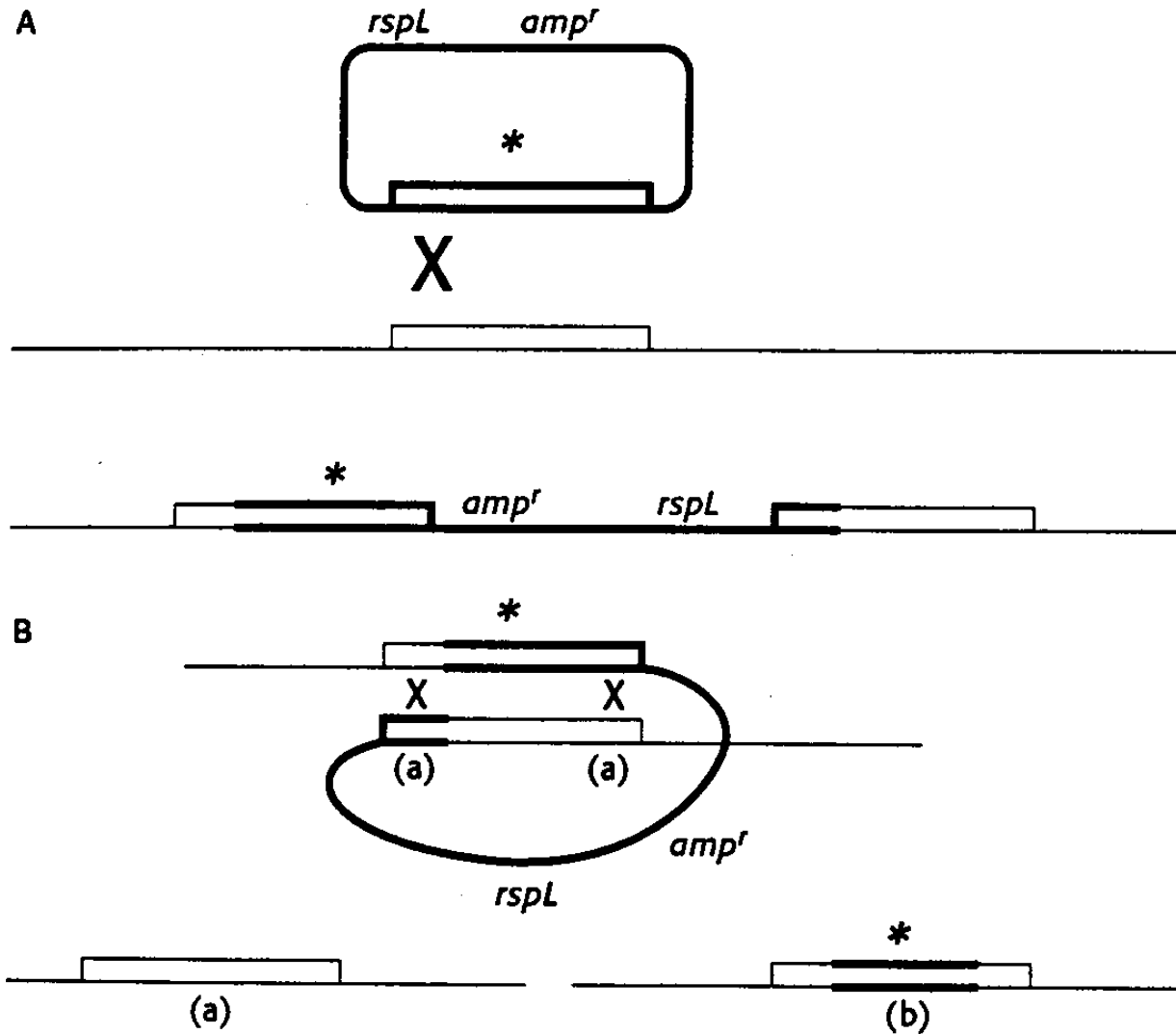
- Rekombinantní technikou vložit ATB res. kazetu do vektoru
- Linearizovat
- Transformovat a selektovat na ATB resistenci
- kontrola inzertu na ztrátu druhého ATB markeru ve vektoru (B)



Systemy výměny allel

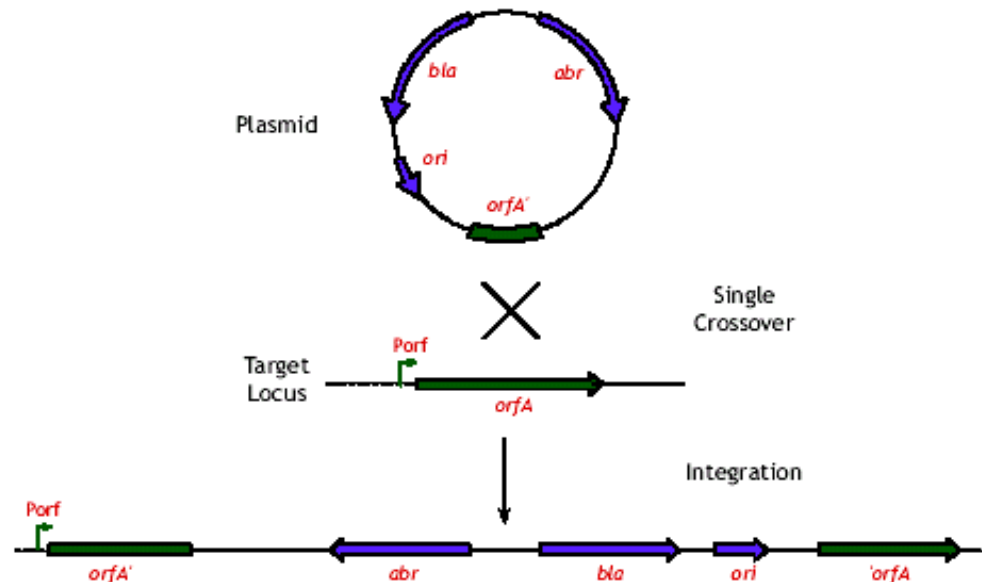
- dvoustupňová metoda
 - celý plazmid je integrován do chromosomu jednoduchým crossing overem s homologním genem, který je potřeba mutovat
 - selekce na rezistenci nesoucí plazmid
 - chromosomální duplikace je segregována homologní rekombinací
 - selekce na ztrátu rezistence
 - může být druhý selektivní marker na plazmidu
 - vyštěpený nereplikující se plazmid je ztracen v průběhu dělení buněk
 - vznikají dva typy buněk, mutantní a wild type
 - mutace musí být potvrzena (PCR, hybridizace, restriční analýza)

Systemy výměny allel



Systemy výměny allel – G+ bakterie

- Přirozená kompetence
 - Integrační vektory
 - Dvoustupňová metoda
 - Efektivní rekombinace – není potřeba dalších selekčních markerů
- Transdukci – nespecifická transdukce



Integrační vektory

Fúze genu s reportérovým genem pod kontrolou vlastního promotoru

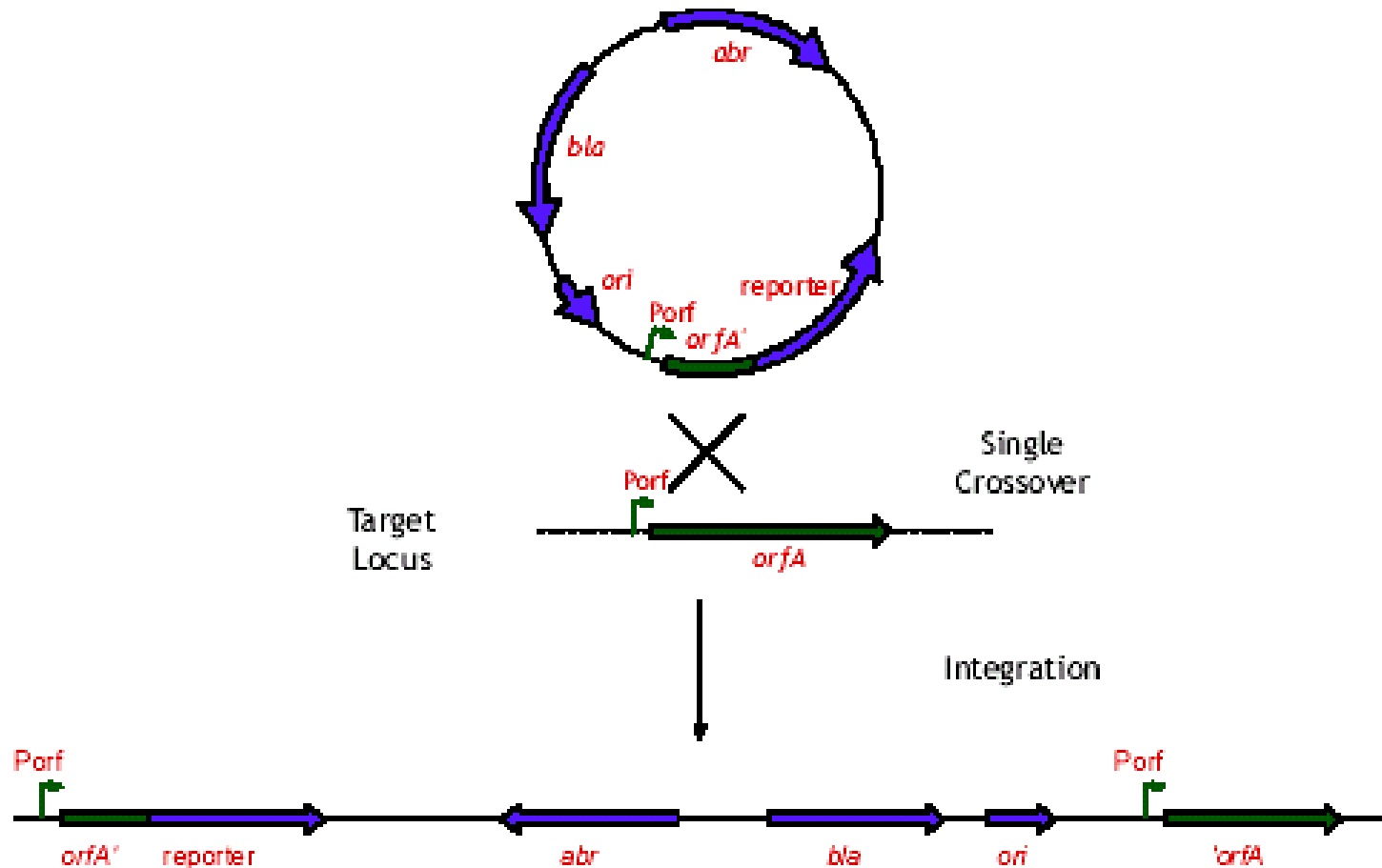


Figure 2. Use of an integration vector to construct a reporter gene fusion under the control of the promoter of a hypothetical open reading frame, *orfA*.

Integrační vektory

Vkládání do „nepotřebného genu“

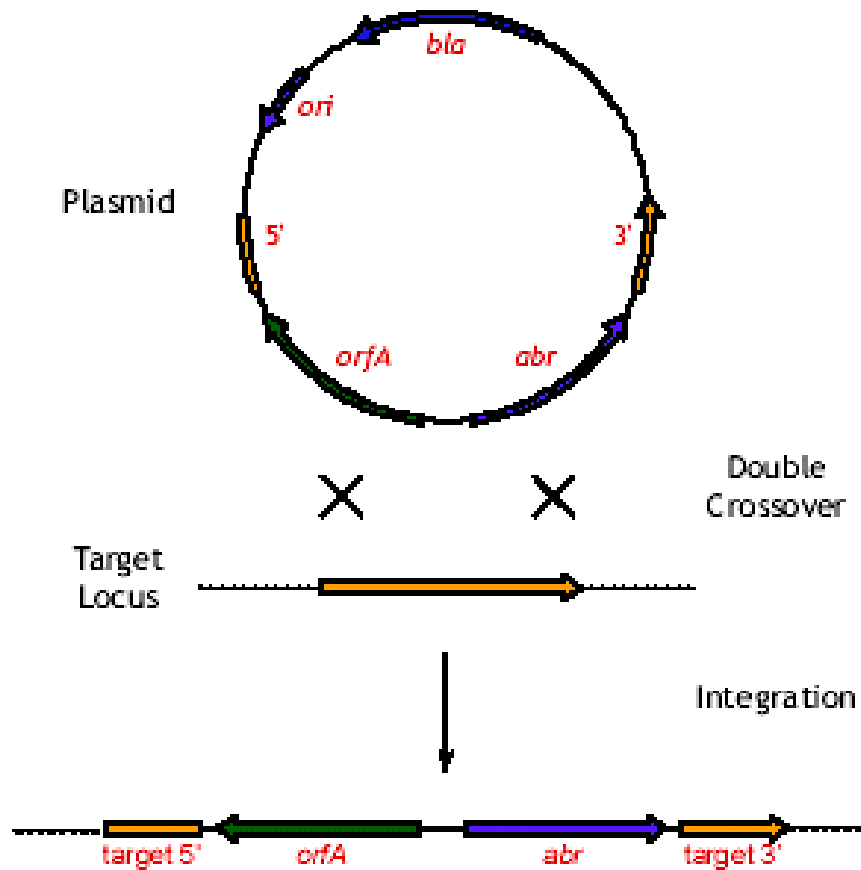
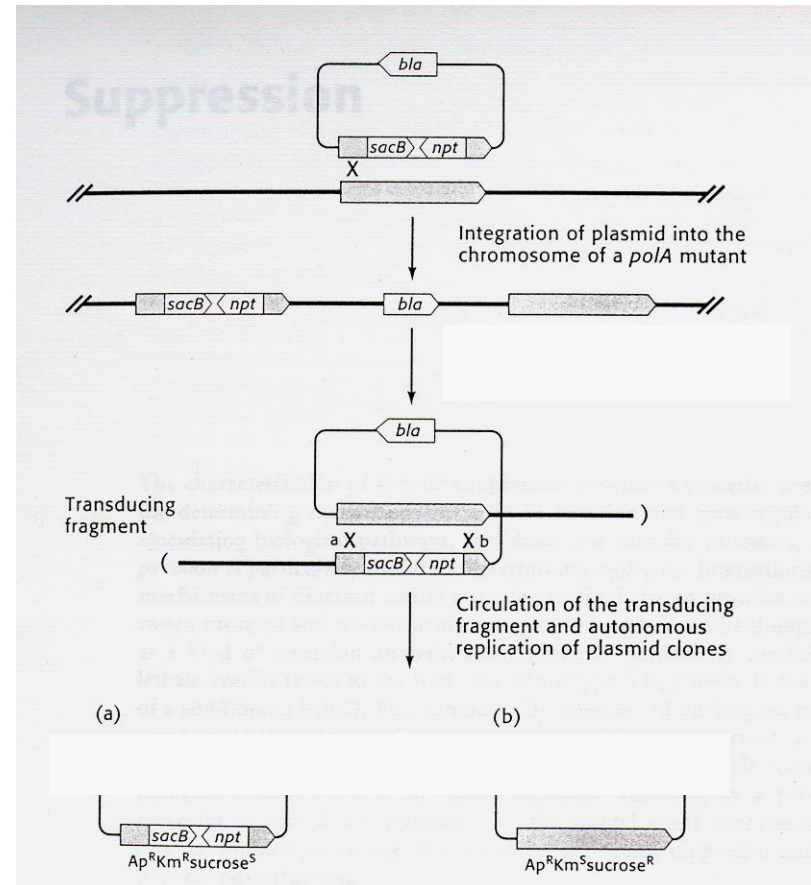


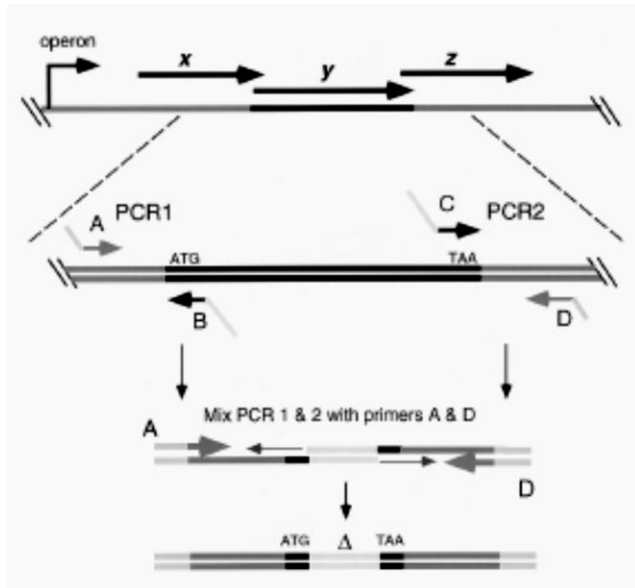
Figure 3. Use of an ectopic integration vector to insert a hypothetical open reading frame, *orfA*, into a target locus on the chromosome, such as the *B. subtilis amyE* gene.

Systemy výměny allel – G⁻ bakterie

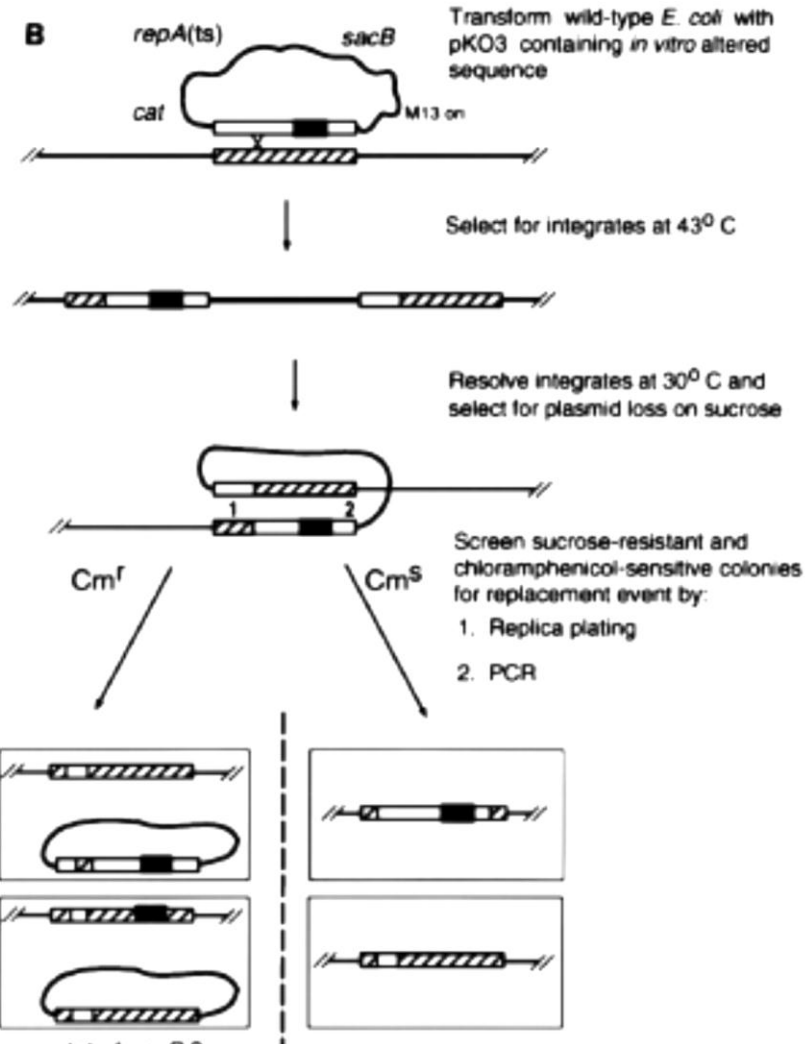
- Příklady druhého selektivního markeru
 - použití *sacB* genu z *B. subtilis* - produkt genu levan sucraza je toxický pro G⁻ bakterie pokud rostou v přítomnosti 5% sacharosu
 - umožňuje přímou selekci na ztrátu plazmidu
 - (současná selekce na ztrátu Amp^r a resistenci k sacharose)



Příprava delecí – přesné delece



- Primery pro PCR
 - Vnější primery HindII sekvenci – klonování do plasmidu
 - Vnitřní primery překrývající se konce – slouží jako primery v 2. PCR
 - J.Bact. 179, 6228



pKO3 plasmid
Ts replikace

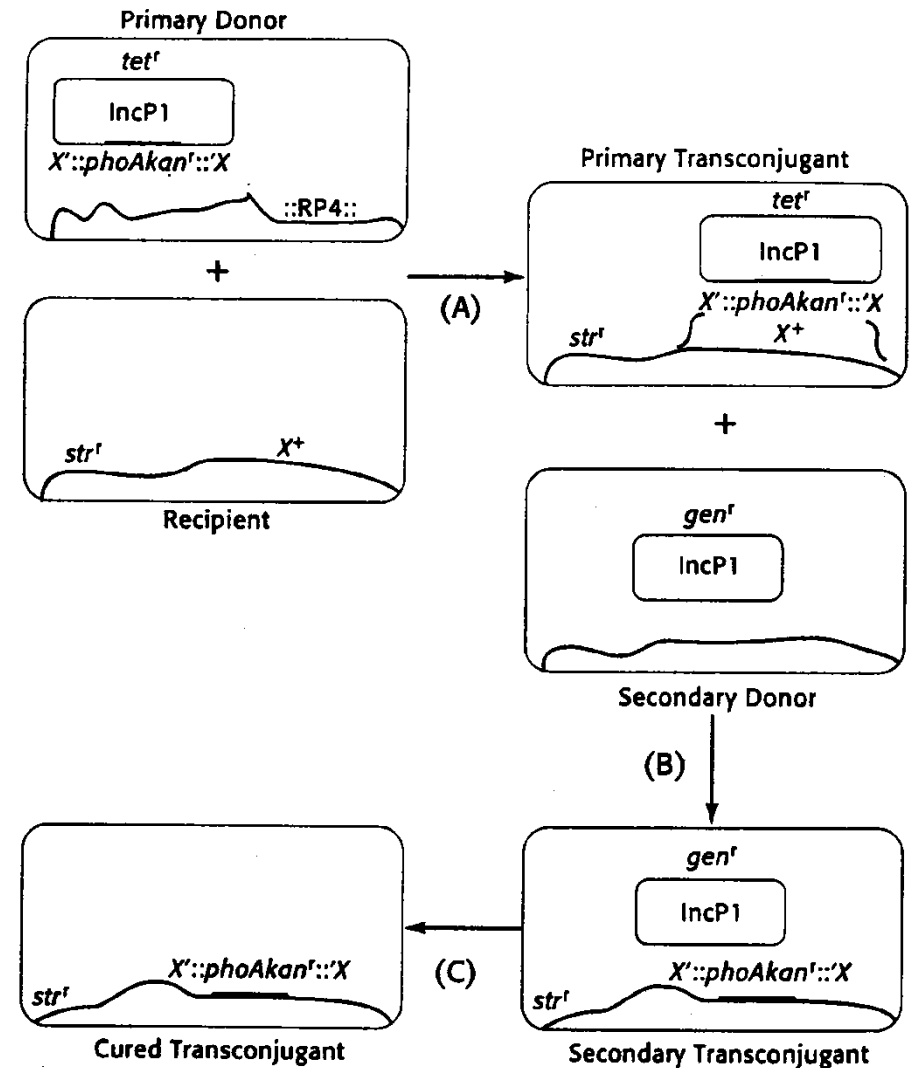
1-5 kolonií do LB a vyseto na 5% sacharosu 30 Cat a 43 °C
Poměr 30 °C sac^R/ 43 °C cat^R frekvence vyštěpení

cat^S sac^R 30
žádané mutanty
PCR kontrola

Systemy výměny allel - G⁻ bakterie

Nekompatibilní plazmidy

- v gramnegativních druzích
- třístupňový mechanismus
 - mutantní DNA fragment naklonovaný do plazmidu s širokým spektrem hostitelů (konjugační nebo mobilizovatelný)
 - je přenesen do recipienta a selektován na Str i Kan resistenci
 - (plazmidový a chromozomální marker)
 - recipient je konjugován s dalším donorem konjugativního plazmidu z IncP1 (stejné inkompatibilní skupiny) s jiným selektivním markerem - („kickout - step“)
 - pPH1JI resitence na gentamicin
 - nemohou oba koexistovat v jedné buňce - selekce na druhý plazmid, ztráta prvního
 - současná selekce na resistenci v integrovaném genu
 - pPH1JI je termosenzitivní - ztráta při zvýšení teploty na 42 °C

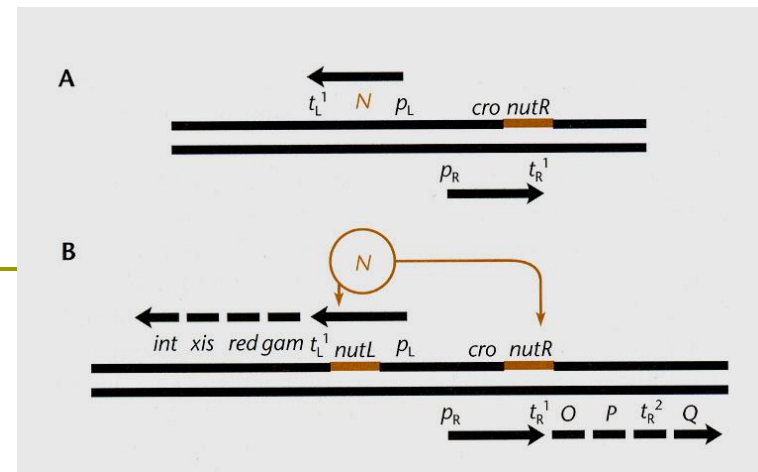


Systemy výměny allel - G⁻ bakterie

Př.: replikace v permisivním hostiteli

- pGP704 - derivát pBR322 - *oriE1* zaměněno za *oriR6K*
 - pro replikaci vyžaduje protein π , produkt *pir* genu
 - v *E.coli* může být dodán na fágu lambda (λ pir) – permisivní hostitel
 - Nepermisivní hostitel (bez profága λ pir) je plazmid integrován do chromosomu na základě homologie
 - Kontrola možná restriční analýzou a hybridizací (integrováný plazmid vnese unikátní restriční místo mezi duplikace genů – dva hybridizační signály)

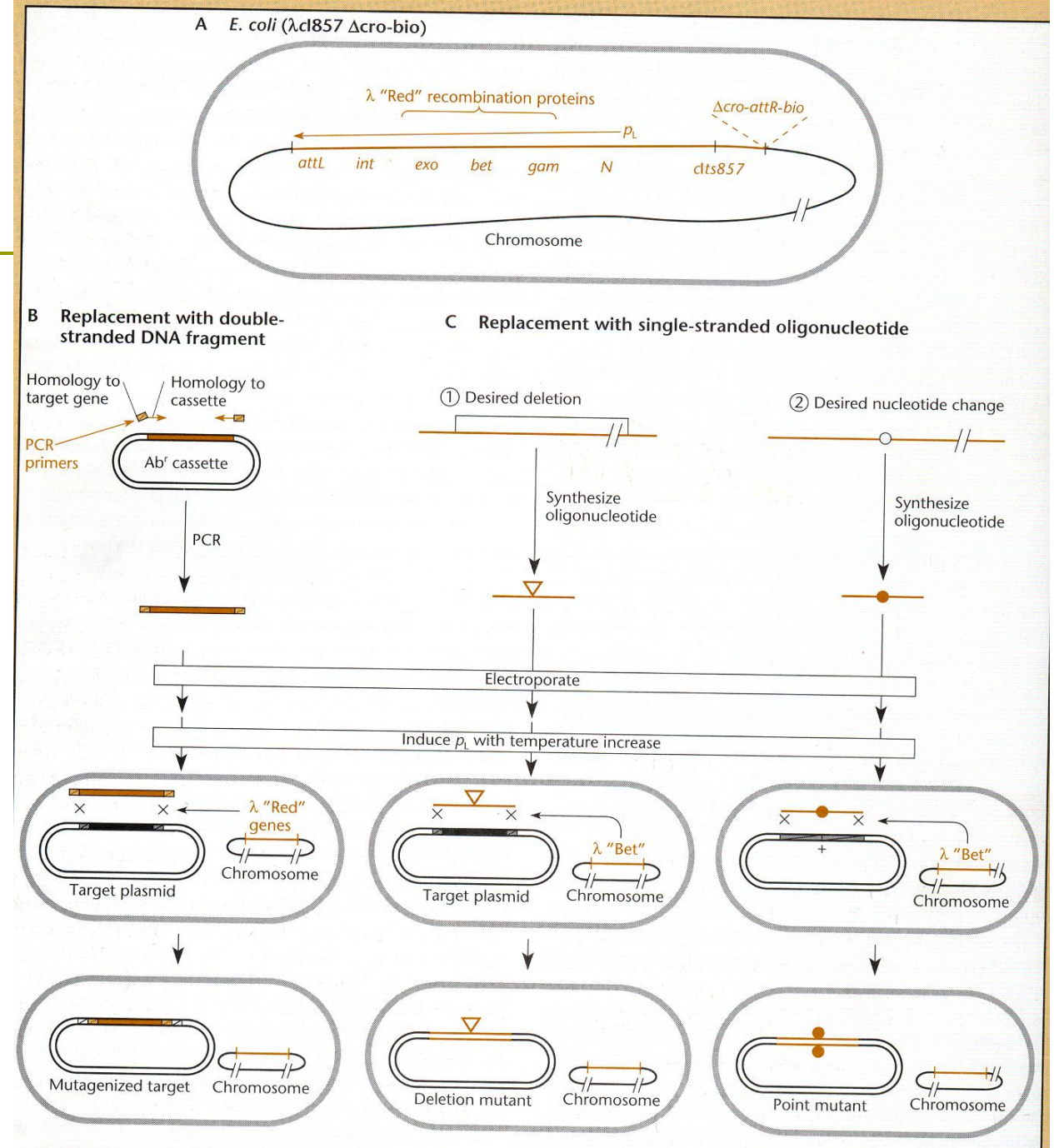
Systemy výměny allel



- *E. coli* – využití rekombinačních funkcí λ fága
 - Rekombinace nezávislá na RecA, RecBCD
 - Výhody –
 - Efektivnější rekombinace – není potřeba efektní selekční systém
 - Inserce lineární DNA ds i ss – vždy dvojitý cross-over.
 - Systém funguje i s krátkými homologiemi – 30bp
 - Příprava mutace na plazmidu
 - Popis systému –
 - Kmen *E. coli* – profág s rekombinančními geny *gam*, *bet*, *exo*,
 - Dále jen *int* a *att*
 - Gam – inhibuje RecBCD enzymy – možnost použití lineární dsDNA
 - Exo – stejná funkce jako RecBCD – degraduje jedno vlákno dsDNA
 - Bet – stejná funkce jako RecA – váže se na ssDNA a iniciuje vznik synapse a změnu homologních vláken
 - Sawitzeke et al. 1992 Genetics 130, 7-16.

Systemy výměny allel

λ fág „red systém“

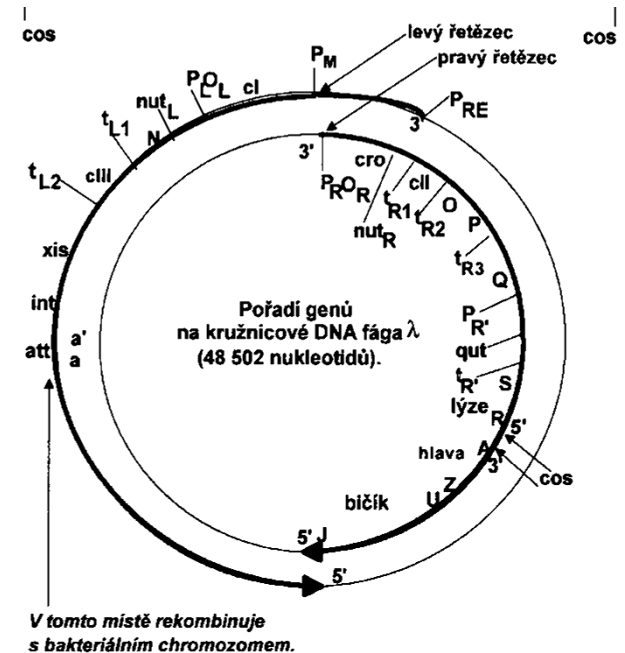


Systemy výměny allel

- Výměna dsDNA –
 - Transformace lineární mutovanou ds DNA
 - Aktivace genů λ fága
 - Výměna allel na plazmidu
- Výměna ssDNA –
 - Profág může obsahovat pouze gen *bet* – chrání ssDNA před degradací
 - Pro přípravu delecí a bodových mutací
 - Rekombinace mechanismem výměny vláken – je nutný screening 1:1
 - Probíhá snadněji na zpoždujícím vlákně – rekombinace se ssDNA za replikační vidličkou – větší afinita k jednomu vláknu – korelace s replikací

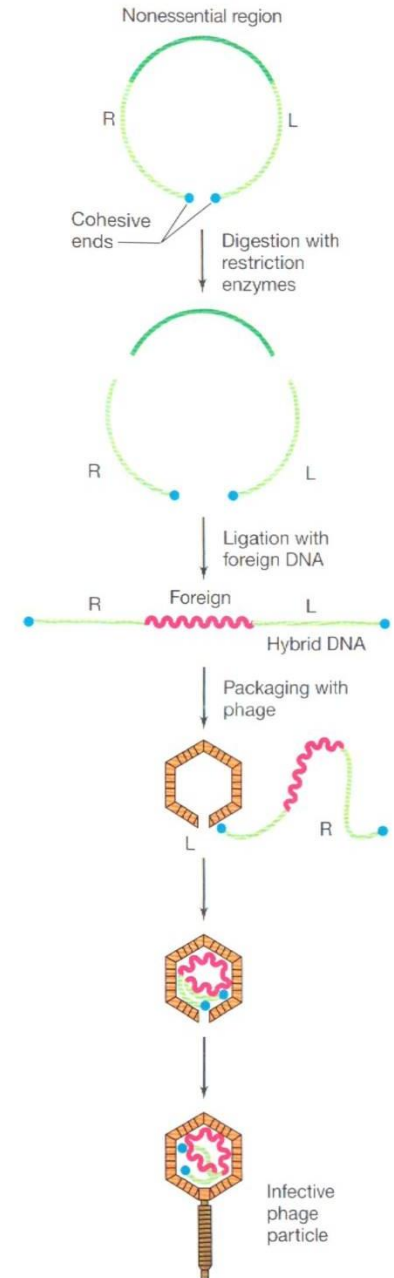
Specializovaná transdukce

- Při excisi fága před vstoupením do lytické fáze může dojít k nepřesnému vyštěpení -
 - fág pak nese část chDNA hostitele – 10^{-6}
- v chromosomu zůstane část fágové DNA
- fágový genom je defektní a nemá část att lokusu – (má att lokus integrovaného fága)
- u λ att lokus vždy mezi geny *gal* a *bio*,
 - defektní fág vždy nese jeden z těchto genů
 - λ ***dgal*** – snadná selekce – infekce Gal- bakterií – selekce s galaktozou
 - Nemají geny pro hlavu a bičík – může se stabilně inkorporovat, ale nemůže se bez asistence reprodukovat
 - λ ***pbio*** – jsou schopny se množit, ale nemohou bez asistence vytvářet lysogeny
 - Nemají geny pro integrasu



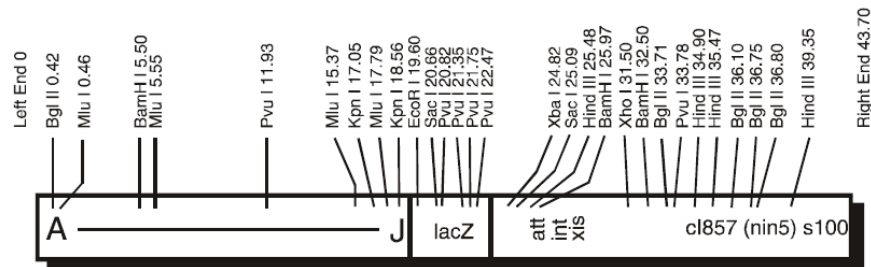
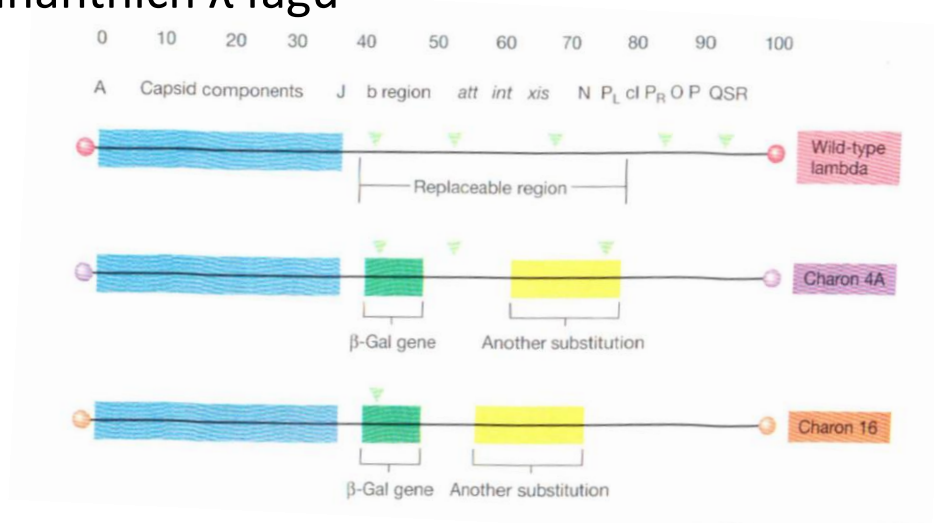
Lambda jako klonovací vektor

- Vytvoření transdukující partikule s libovolným genem
 - Rekombinantní techniky – komerční kity
 - Princip
 - Výměna neesenciálních genů za rekombinantní (geny J až N)
 - Vytvoření fágových partikulí in vitro pomocí buněčných extraktů se směsí fágových proteinů (kapsidy, bičíky, atd.)
 - Efektivní infekce hostitelské buňky
 - Výhody
 - Větší úseky DNA než plazmidy
 - Snadná manipulovatelnost – dobře geneticky charakterizovaný
 - Mnoho modifikovaných variant - změny v RE místech, polyklonovací místa s B/W selekcí, selekční markery,
 - Snadná infekce
 - Stabilita fágových partikulí



Rekombinantní fágů λ

- Příklady rekombinantních λ fágů
 - Charon

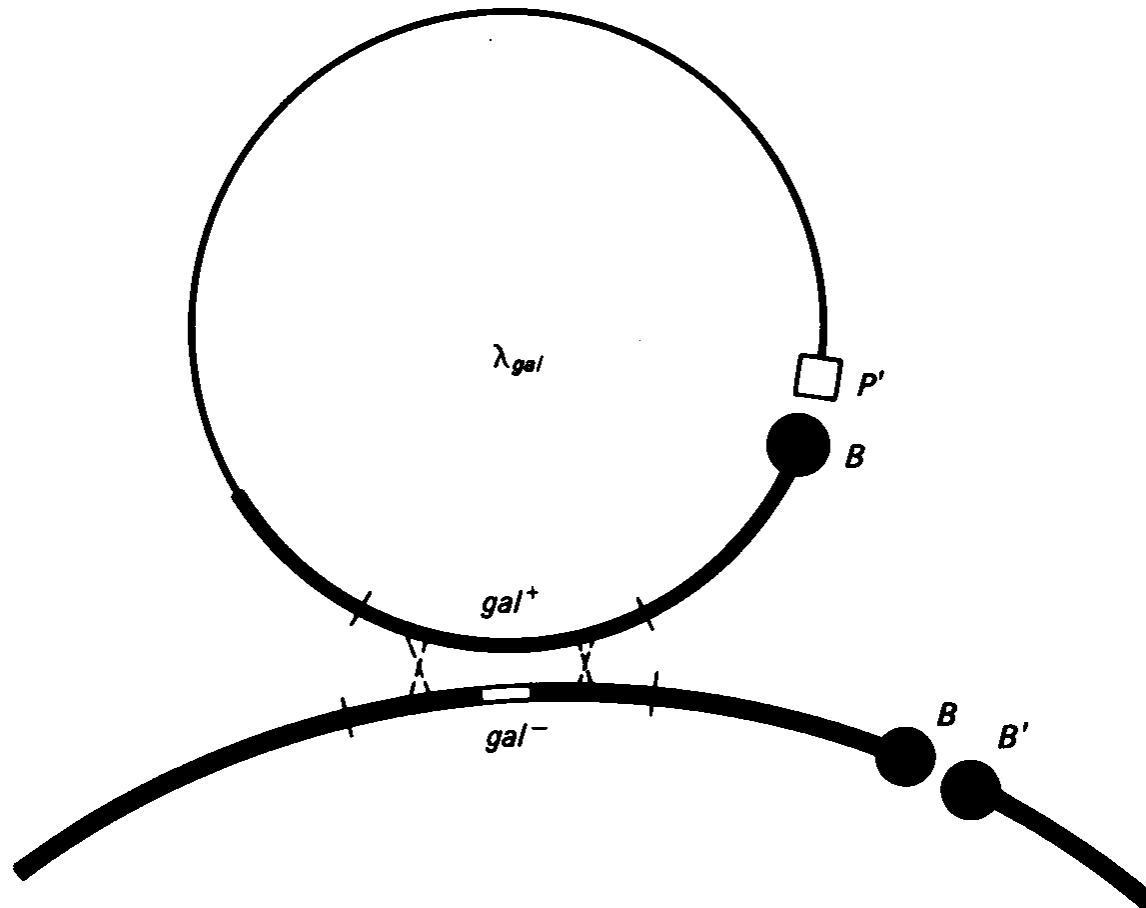


- Map of the Lambda gt11 insertion vector - Stratagen

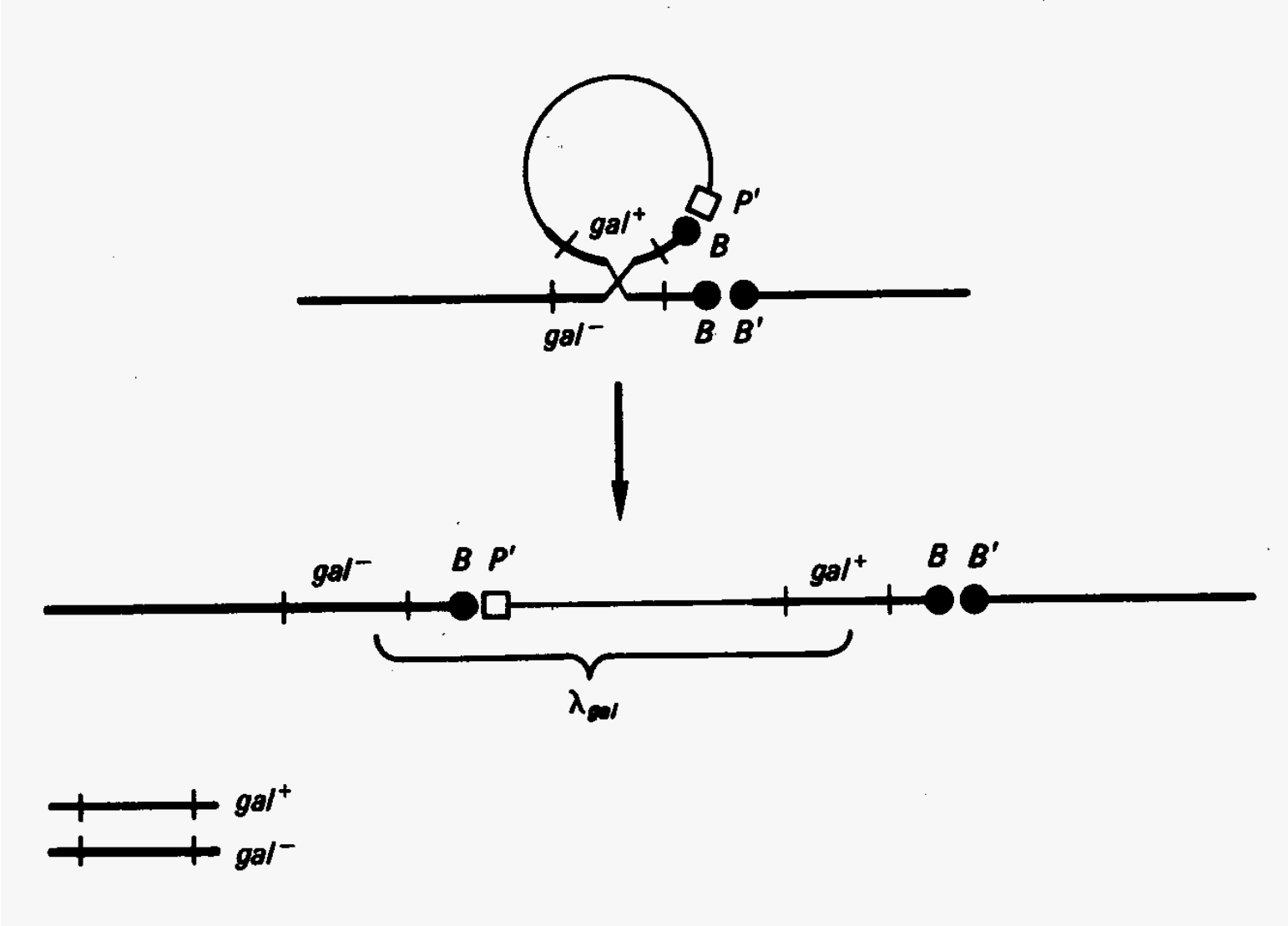
Specializovaná transdukce - komplementace

- Komplementace
 - Přirozených transdukujících částic – (λ – gal, bio)
 - Rekombinantních –
 - duplikace vlastního genu
 - Jednoduchá infekce – u přirozených –
 - nízký obsah transdukujících partikulí v lysátu LFT
 - nízkofrekvenční transdukce - nestabilní transduktanty (Campbell mechanismus) - duplikace genu v chromosomu
 - integrace přes *gal* stabilní transduktanty (2 cross-overs),
 - Reinfekce druhým fágem
 - integrace přes att místo - pokud existuje integrovaný fág - helper
 - nestabilní transduktanty (Campbell mechanismus) - duplikace fága v chromosomu
 - při excisi stejný počet defektních a normálních fágů - HFT lysáty
 - vysokofrekvenční transdukce
- Využití –
 - komplementace – vytváření částečných diploidů
 - Mapování
 - Vytváření mutant

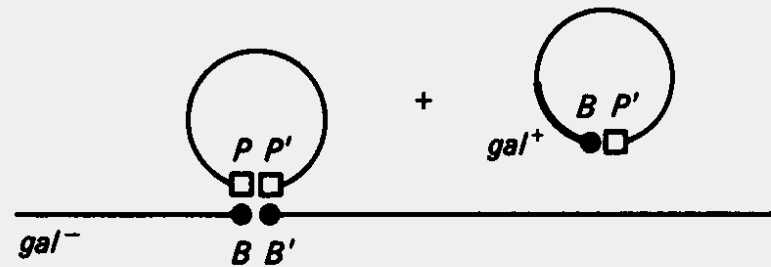
Stabilní transduktanty - LFT



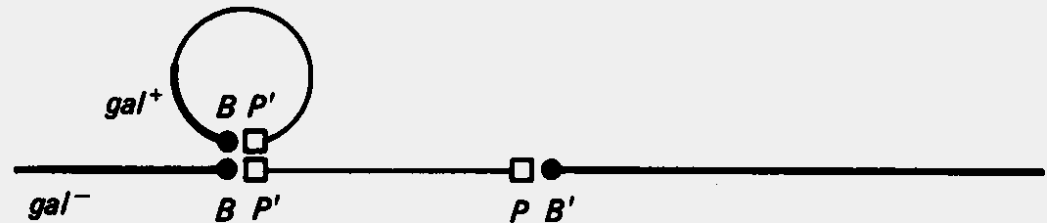
Nestabilní transduktanty - LFT



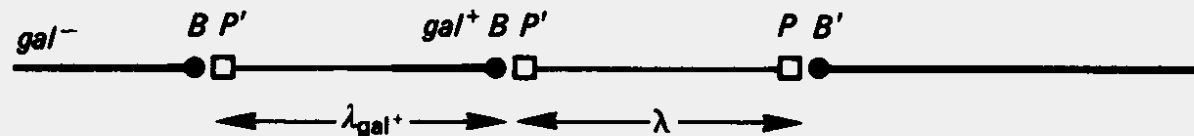
Nestabilní transduktanty -HFT



1. gal^- cells are infected by both a λ_{gal^+} and by a λ^+ particle. λ^+ first integrates at BB' as in normal lysogenisation

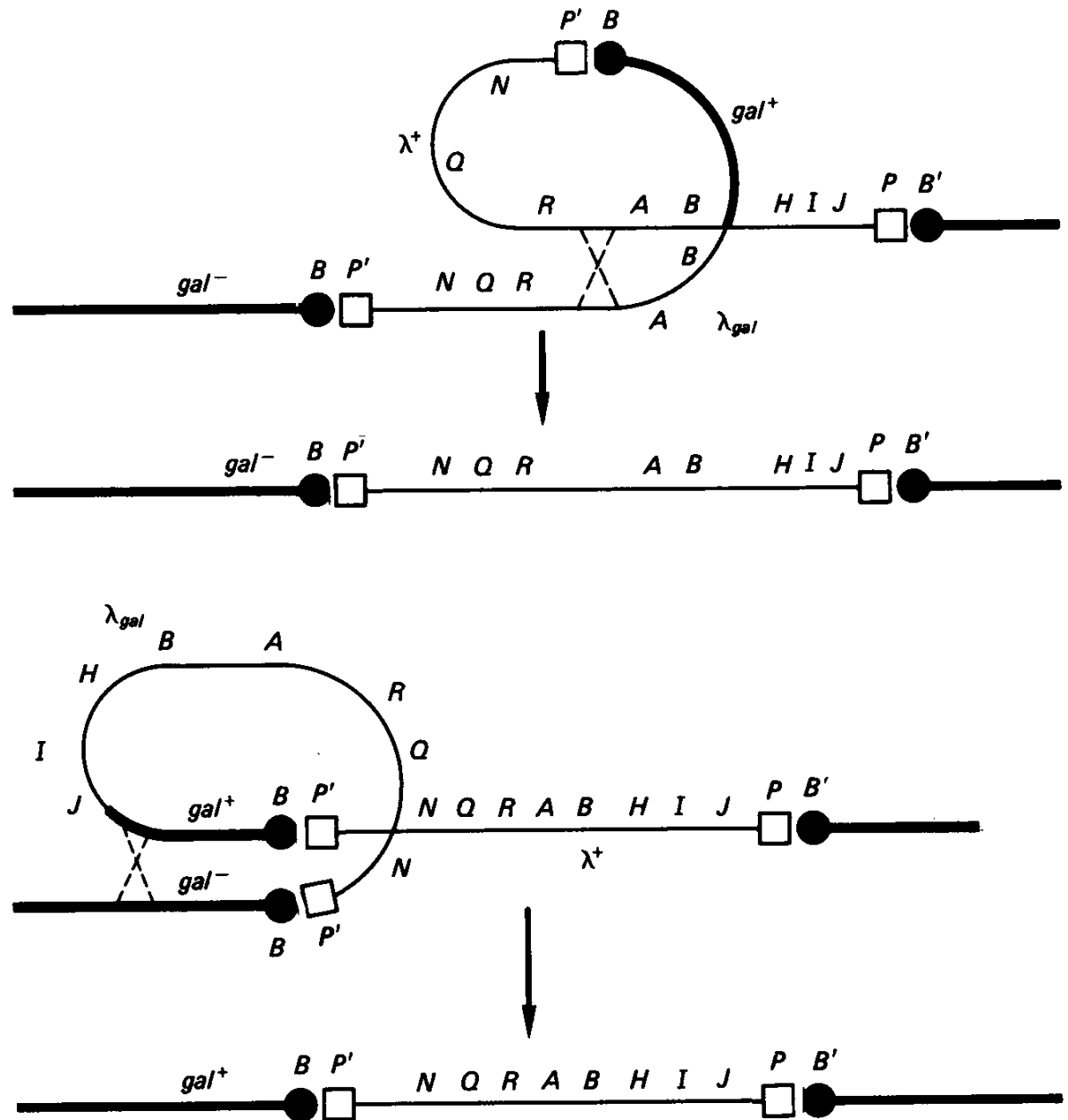


2. The BP' site on λ_{gal^+} can now undergo site-specific recombination with the hybrid attachment site BP' (frequently) or PB' (rarely)



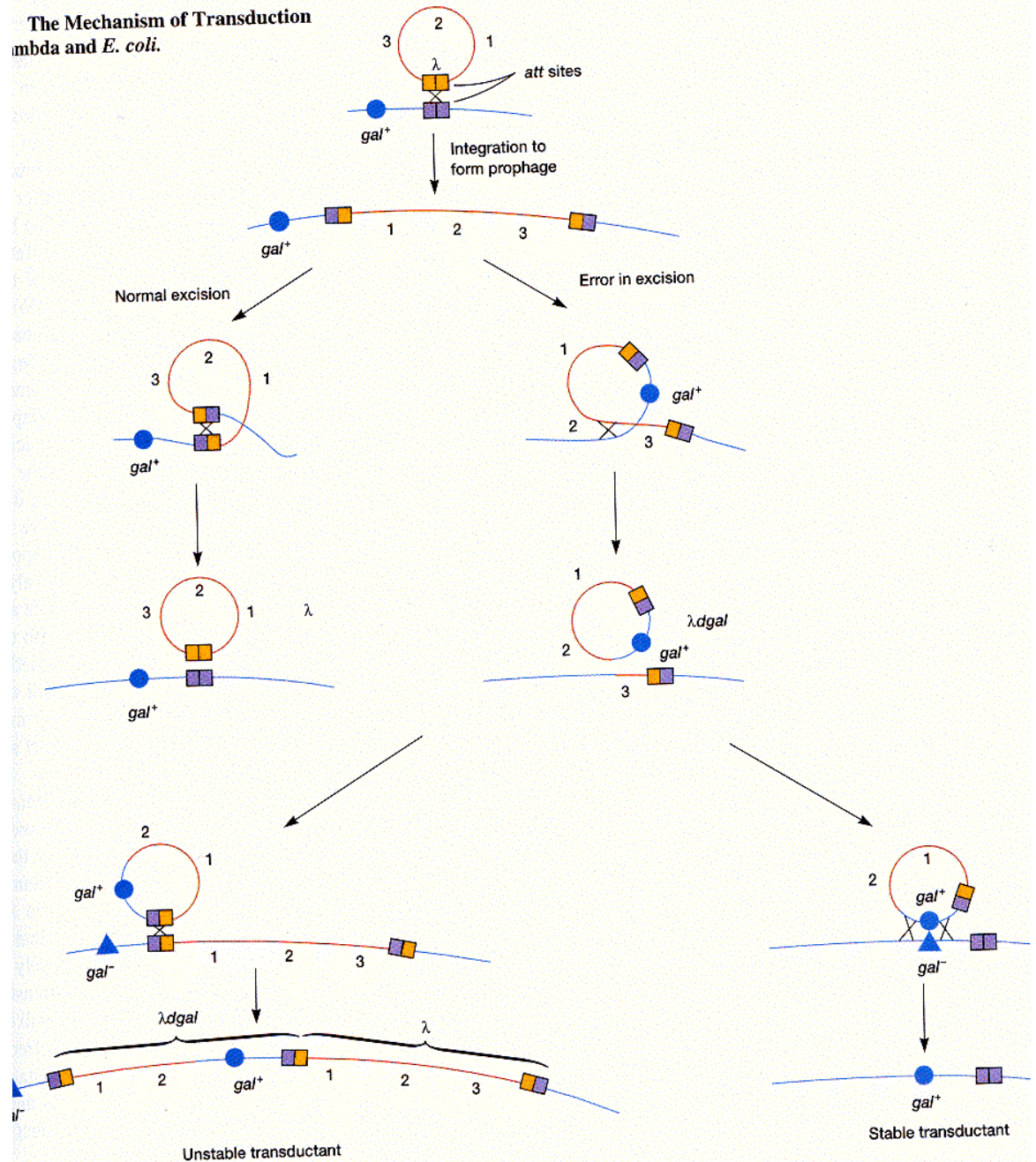
3. This integrates λ_{gal^+} into the recipient chromosome, creating a $\lambda^+/\lambda_{gal^+}$ double lysogen

Stabilní transduktanty - HFT



Specializovaná transdukce

The Mechanism of Transduction of λ and *E. coli*.



Archaea - Genetické přístupy

1. Většina archaea vyžadují extrémní růstové podmínky
 - Není růst v koloniích
 - Klonování
 - Screening mnoha klonů
 - Jiná stavba buněk
 - Nefungují antibiotika působící na bakteriální buněčnou stěnu
2. Transkripce a translace více podobná eukaryím
 - Markery a plazmidy používané v bakteriální genetice nejsou transkribovány a translatovány – nereplikují se

Archaea - Genetické přístupy

1. Nové systémy – posledních 20 let

- Fúze archaea promotorů s rekombinantními geny
- Isolace archaea plazmidů –
 - příprava podvojných plazmidů
- Kultivační podmínky umožňující růst v koloniích
 - Halofilní euryarcheota – standartní agarové plotny s přidavkem 12-25% NaCl a Mg⁺
 - Anaerobní methanogeny – přísně anaerobní podmínky – v uzavřených boxech – standartní agar
 - Hypertermofilní metanogeny – speciální nádobí i komponenty pevných médií
- Typické systémy pro transfer genů
 - Pružný parakrystalický protein a glycoproteinová S- vrstva
 - Rigidní formy obsahující pseudomureinovou monovrstvu
 - heteropolysacharidová vrstva s chemickými vlastnostmi chondroitinu

Archaea - Genetické přístupy -transformace

- Systémy pro S - vrstvu -
 - Příprava sféroplastů -
 - rozrušení S vrstvy přidavkem EDTA
 - Transformace
 - Regenerace sféroplastů přidáním divalentních kationtů
- Rigidní buněčná stěna – Methanosarcina
 - Růst v nízkých koncentracích solí – jednovrstevný růst – sféroplasty jako u S –vrstev
 - Methanothermobacter – pseudomurein
 - Sféroplasty inkubací s pseudomurein endopeptidasou

Archaea - Genetické přístupy

- **Markery – vybrány z archaea i bakterií**
 - **Halofily – většina heterologních proteinů je denaturována**
 - Mevinolin - rezistence k 3-hydroxyl-3methyl glutaryl koenzymu A reduktáze inhibitoru – inhibuje syntézu isoprenoidní lipidickou část řetězce u archaea
 - Novobiocin – rezistence ke gyrase inhibitoru
 - Anisomycin, sparsomycin, thiostrepton – inhibitory proteinů
 - Spontáně izolované mutanty rezistentní k 5-fluoroorotic kyselině
 - Auxotrofní mutanty – histidin, leucin, thymidin, tryptofan
 - **Metaogeny – jsou sensitivní k antibiotikům které inhibují syntézu proteinů**
 - Puromycin, neomycin, pseudomycin
 - Puromycin transacetylase ze *Streptomyces alboniger* –
 - rezistence k puromycinu
 - Promotor z methyl coenzym M reduktázy z *Methanosarcina*
 - Spontání mutace v isoleucin t-RNA –rezistence k pseudomycinu
 - **Hypertemofily**
 - Hygromycin – hygromycin fosfotransferáza z *E. coli* s promotorem pro *S. solfataricus* aspartát aminotransferáza

Archaea - Genetické přístupy

- Vektory –
 - halofily, metanogeny a nemetanogenní hypertermofily
 - Podvojně plazmidy – *E. coli*
- Halofily
 - pHV2 – miniplazmid – 2 ori (pHV a R6K), mevinolin, ampicilin
- Metanogeny
 - pC2A - 2ori – pV2A a ColE1) puromycin, ampicilin
- Hypertermofily
 - pGT5 –
 - pEXSs – ori z fága SVV1 - hygromycin

Archaea - Genetické přístupy

- Nespecifická mutageneze –
 - UV a chemicky – snadná izolace x obtížná lokalizace
 - Transpozony –
 - mariner deriváty se selekcí a ori archaea i *E. coli*
 - Lokalizace – restrikce chromozomu a ligace do *E. coli* plazmidů
 - Tepelný šok, fixace dusíku, struktura buněčné stěny

Archaea - Genetické přístupy

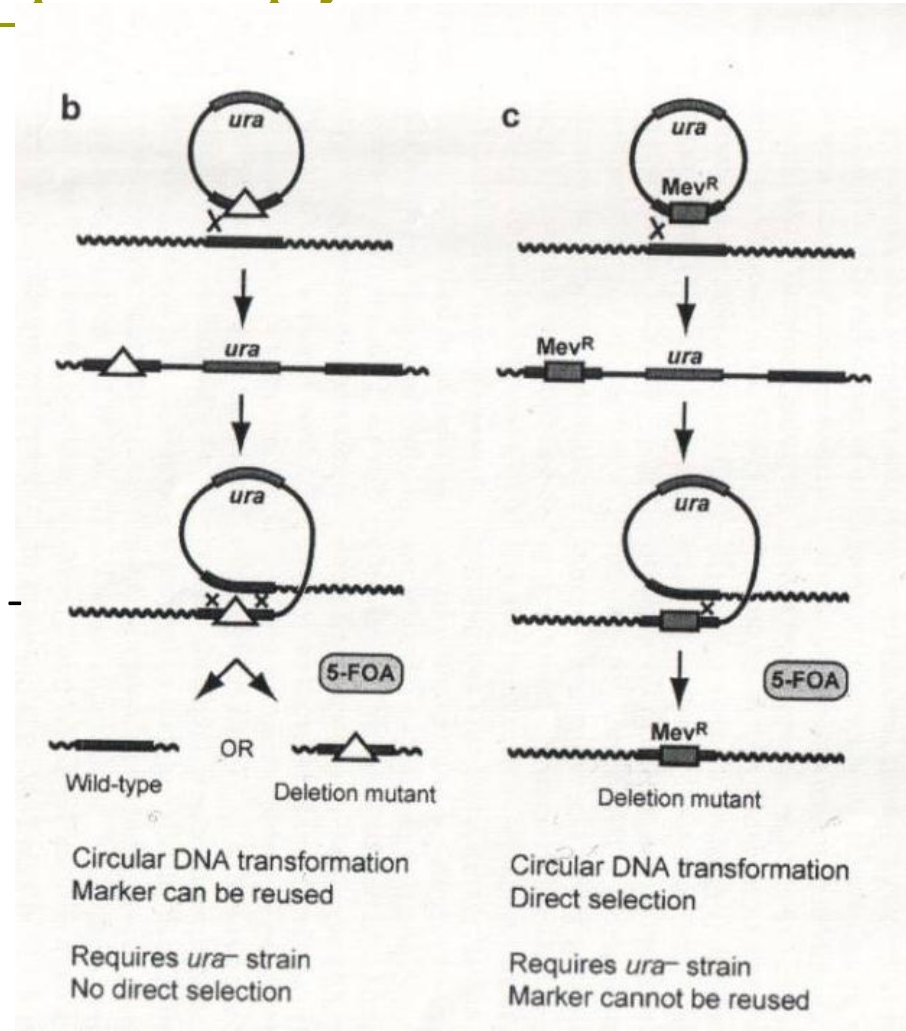
Knock out systémy

Dvojkrokový systém –

Transformace nereplikujícího se
cirkulárního plazmidu
Ztráta markeru

Halofilní bakterie –

obnovení uracilové auxotrofie –
vyžaduje *ura* auxotrof
Mevinolin – *mevR* – přímá
selekce



Archaea - Genetické přístupy

- Reportérové geny –
 - Halofilní bakterie - salt tolerantní β – galaktozidáza
 - Modifikovaný derivát GFP
 - Bakteriorodopsin – bop gen na plazmidu v bop- mutantu
 - purpurové zbarvení kolonií
 - Metanogenní bakterie –
 - β – galaktozidáza, β – glucuronidaza z E. coli
 - Trehaláza – Bacillus subtilis
 - Vždy archaea promotory a terminátory