

Artbestämning av fisk med hjälp av DNA-streckkoder

Introduktion och syfte

Molekylärbiologin utvecklas i snabb takt och får allt fler tillämpningsområden. DNA-streckkodning (på engelska: DNA-barcoding) är exempel på ett sådant område där man försöker identifiera organismer utifrån hur deras DNA ser ut. Principen är enkel: en kort DNA-sekvens från en standardiserad genetisk markör tas fram och jämförs mot ett stort antal DNA-sekvenser i en referensdatabas.

Den här laborationen syftar till att ge en praktisk introduktion till några molekylärbiologiska tekniker som används vid artbestämning av organismer. Målet är att du efter genomförandet ska ha bekantat dig med de olika delmomenten och blivit införd med några av metodens styrkor och begränsningar.

Laborationen är uppdelad i följande delmoment

- Isolering av DNA (från fiskvävnad).
- Mångfaldigande av mitokondrie-DNA med hjälp av PCR (polymeraskedjereaktion, på engelska: Polymerase Chain Reaction).
- Gelelektrofores av PCR-produkt.
- Sökning med BLAST (Basic Local Search Alignment Tool) mot en databas för identifiering av sekvenser.

Isolering av DNA från fiskvävnad

Extraktion av DNA från djurvävnad består huvudsakligen av fyra steg: (1) lysa cellerna, (2) binda DNA:t till kolonnen, (3) tvätta DNA:t, och (4) lösa ut (eluera) DNA:t från

kolonnen. Material: DNeasy® Blood & Tissue Kit

Vävnader från olika fiskarter.

Innan du börjar: När du öppnar ett nytt kit, se då till att fylla på etanol till buffert AW1 och AW2 enligt instruktionerna på respektive behållare.

Sätt på värmeskåp (alternativt vattenbad) på 56°C.

1. Skär ut små bitar vävnad (2-3 mm³ eller ≤ 25 mg) och placera dem i ett uppmärkt 1,5 ml rör.
2. Tillsätt 180 µl av buffert ATL.
3. Tillsätt 20 µl av proteinas K.
4. Vortexa provet (dvs. blanda det genom att använda en vortex-apparat).
5. Inkubera provet (dvs. låt det vila) i 56°C (i värmeskåp eller i vattenbad) tills det löst upp sig helt och hållet (kan ta upp till ca 1,5 h). Vortexa då och då under inkubationstiden. Vortexa även 15 s direkt innan du går vidare till punkt 6.
6. Tillsätt 200 µl av buffert AL. Blanda om ordentligt genom att vortexa.
7. Tillsätt 200 µl etanol (96-100 %). Blanda om ordentligt genom att vortexa.
8. Sug upp lysatet och överför till den vita DNeasy-kolonnen som placerats i ett 2,0 ml uppsamlingsrör. Centrifugera sedan i mikrocentrifug i 1 minut vid 8000 rpm. Kasta filtratet och uppsamlingsröret

9. Placera DNeasy-kolonnen i ett nytt 2 ml uppsamlingsrör. Tillsätt 500 μ l av buffert AW1. Centrifugera vid 8 000 rpm i 1 min. Kasta filtratet och uppsamlingsröret
10. Placera DNeasy-kolonnen i ett nytt 2 ml uppsamlingsrör. Tillsätt 500 μ l av buffert AW2. Centrifugera i 3 minuter vid 14 000 rpm. Kasta filtratet och uppsamlingsröret
11. Flytta DNeasy-kolonnen till ett uppmärkt 1,5 ml rör och tillsätt 200 μ l av buffert AE till kolonn-membranets centrum. Inkubera provet på bänken i 1 minut. Centrifugera i 1 minut vid 8 000 rpm. Upprepa elueringssteget om så önskas.

Mångfaldigande av mitokondrie-DNA med hjälp av PCR

En av de vanligaste markörerna för streckkodning är mitokondriegenen COI (som kodar för proteinet Cytokrom c oxidas subenhet 1). I detta moment kommer du att mångfaldiga en bit av denna gen från ditt isolerade DNA (dvs. ditt DNA-extrakt).

Material: Illustra™ puReTag Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare) ("kul-per-rör"), nukleasefritt vatten och primers (10 μ M).
PCR-maskin.

Nedan beskrivs hur du gör för att mångfaldiga DNA från ett prov. Om du har flera extrakt kan du ta ett kul-per-rör från vart och ett av dessa. Om du vill kan du också ta med en negativ kontroll utan tillsatt DNA för att upptäcka en eventuell kontamination under detta steg.

1. Ta ett 0.2 ml kul-per-rör. Märk upp röret på locket och på sidan så att du känner igen ditt rör.
2. Tillsätt 1 μ l av primer FishF1 (forward-primer) till ditt PCR-rör.
3. Tillsätt 1 μ l av primer FishR1 (reverse-primer) till ditt PCR-rör.
4. Tillsätt 2 μ l av ditt DNA-extrakt till ditt PCR-rör.
5. Tillsätt 21 μ l nukleasfritt vatten.
6. Knacka eller centrifugera för att blanda och samla allt på botten av röret.
7. Placera ditt rör i en PCR-maskin och starta programmet (görs av läraren)

Undersökning av växters släktskap med hjälp av DNA-sekvenser

DNA-sekvenser används inte bara för att särskilja närbesläktade arter, utan är också ett viktigt verktyg för att studera evolutionära händelser många miljoner år tillbaka i tiden. För att ta reda på växters släktskap har det varit vanligt att arbeta med DNA från kloroplaster. Anledningarna till detta är flera: kloroplasterna är ofta flera i varje cell, och DNA:t i dessa finns i sin tur i många kopior. En annan fördel är att kloroplasternas DNA replikerar relativt långsamt, vilket gör det möjligt att jämföra växter som endast är släkt på långt håll.

Laborationen är uppdelad i följande delmoment

Isolering av DNA (från växtvävnad).

- Mångfaldigande av kloroplast-DNA med hjälp av PCR (polymeraskedjereaktion, på engelska: Polymerase Chain Reaction).
- Gelelektrofores av PCR-produkt.

Isolering av DNA från växtvävnad

Extraktion av DNA från växtvävnad består huvudsakligen av fem steg: (1) lysa cellerna, (2) fälla ut och filtrera bort polysackarider med den lila kolonnen, (3) binda DNA:t till den vita kolonnen, (4) tvätta DNA:t, och (5) lösa ut (eluera) DNA:t

Material: DNeasy® Plant Mini Kit
Vävnader från olika arter av blommväxter.

Innan du börjar: När du öppnar ett nytt kit, se då till att fylla på etanol till buffert AW1 och AW2 enligt instruktionerna på respektive behållare.
Sätt på värmeskåp, alternativt vattenbad, på 65°C.
Förbered is eller ta ut kylväska för det kalla inkubationssteget

1. Fyll ett 2,0 ml rör med färskt (≤ 100 mg) eller torkat (≤ 20 mg) bladmaterial och mortla sönder innehållet med en engångspistill
2. Tillsätt 400 μ l av buffert AP1 och 4 μ l RNase A. Vortexa och inkubera i 10 minuter i 65°C. Vänd röret 2-3 ggr under inkubationen.
3. Tillsätt 130 μ l av buffert P3. Blanda och inkubera 5 minuter på is.
4. Centrifugera lysatet i 5 minuter vid 14 000 rpm.
5. Överför supernatanten (vätskan ovanför sedimentet) till den lila QIAshredder-kolonnen och centrifugera 2 minuter vid 14 000 rpm.
6. Sug upp filtratet och överför till ett nytt (märkt) 2,0 ml rör utan att röra den lilla pellet som bildats på botten av uppsamlingsröret. Uppskatta filtratets volym på ett ungefär (kan göras m.h.a. pipetten).
7. Tillsätt 1,5 ggr provvolymen av buffert AW1 och blanda med pipetten.
8. Tillsätt 650 μ l av blandningen till den vita DNeasy-kolonnen och centrifugera 1 minut vid 8 000 rpm. Kasta filtratet och sätt tillbaka kolonnen i sitt uppsamlingsrör. Upprepa tills hela provvolymen centrifugerats.
9. Byt till nytt uppsamlingsrör. Tillsätt 500 μ l av tvättbuffert AW2, och centrifugera i 1 minut vid 8 000 rpm. Kasta filtratet och sätt tillbaka kolonnen i sitt uppsamlingsrör.
10. Tillsätt 500 μ l av tvättbuffert AW2, och centrifugera i 2 minuter vid 14 000 rpm. Kasta filtratet. Se till att kolonnens munstycke inte kommer i kontakt med det genomrunna filtratet. (Etanol som finns kvar i filtret kan påverka sekvenseringsreaktionen negativt.)
11. Flytta DNeasy-kolonnen till ett uppmärkt 1,5 ml rör och tillsätt 200 μ l av buffert AE till kolonn-membranets centrum. Inkubera provet på bänken i 1 minut. Centrifugera vid 8 000 rpm i 1 min. Upprepa elueringssteget om så önskas.

Mångfaldigande av kloroplast-ONA med hjälp av PCR

I detta moment är din uppgift att mångfaldiga en del av kloroplastgenen *trnL*.

Material: Illustra™ puReTag Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare)
("kul-per-rör"), nukleasefritt vatten och primers (10 f.lm).
PCR-maskin.

Nedan beskrivs hur du gör för att mångfaldiga DNA från ett prov. Om du har flera extrakt kan du ta ett kul-per-rör för vart och ett av dessa. Om du vill kan du också ta med en negativ kontroll utan tillsatt DNA för att upptäcka en eventuell kontamination under detta steg.

1. Ta ett 0.2 ml kul-per-rör. Märk upp röret på locket och på sidan så att du känner igen ditt rör.

2. Tillsätt 1 µl av primer trnLC (forward-primer) till ditt PCR-rör.
3. Tillsätt 1 µl av primer trnLD (reverse-primer) till ditt PCR-rör.
4. Tillsätt 2 µl av ditt DNA-extrakt till ditt PCR-rör.
5. Tillsätt 21 µl nukleasfritt vatten.
6. Knacka eller centrifugera för att blanda och samla allt på botten av röret.
7. Placera ditt rör i en PCR-maskin och starta programmet (görs av läraren).

Primers

Namn	F/R	Sekvens
FishFl	F	5' -TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC- 3'
FishRl	R	5' -TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA- 3'
trnLC	F	5' -CGAAATCGGTAGACGCTACG- 3'
trnLD	R	5' -GGGGATAGAGGGACTTGAAC- 3'

PCR-program

COI

95°C	5 minuter	
94°C	30 sekunder	
52°C	30 sekunder	35 ggr
<i>nOC</i>	1 minut	
<i>nOC</i>	10 minuter	
4°C	∞	

trnL

95°C	5 minuter	
94°C	30 sekunder	
55°C	30 sekunder	30 ggr
72°C	30 sekunder	
<i>nOC</i>	2 minuter	
4°C	∞	
