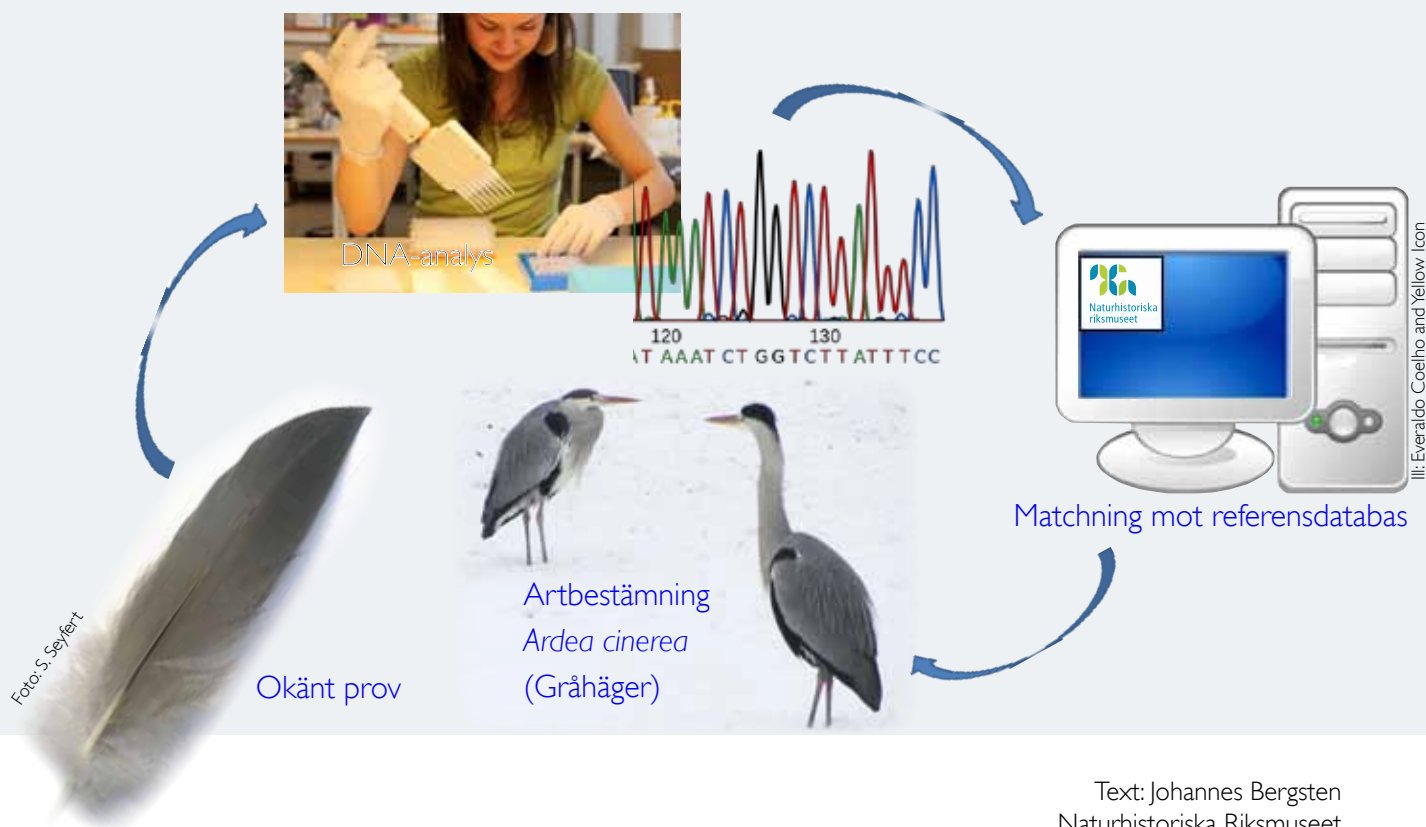


DNA-streckkodning – så går det till



Ända sedan metoder för att läsa DNA-sekvenser blev tillgängliga har DNA använts i frågeställningar kring arter, släktskap och identifiering. Eftersom DNA samlar på sig förändringar (mutationer) med tiden så blir DNA:t för olika arter mer och mer olika ju längre tid arterna är skilda från varandra.

Forskning på Naturhistoriska riksmuseet handlar mycket om biologisk mångfald och livets evolutionära historia. Eftersom DNA allt mer används i denna typ av forskning liksom inom andra samhällstillämpningar bildade museet förra året Centrum för Genetisk Identifiering (CGI). CGI kan ta olika typer av uppdrag som innefattar genetisk art- eller individidentifiering. Museet startade med DNA-baserad artidentifiering av fisk redan 2002 och 2006 sattes ett projekt igång för att bygga ett DNA-referensbibliotek över alla Sveriges ryggradsdjur. Projektet lade grunden till webbportalen Svenska DNA-nyckeln (www.dnanyckeln.se) som lanserades förra året.

Det var först 2003 som några forskare fick gehör i hela världen för att en specifik standardiserad genregion för djur skulle kunna bli

ett nytt artidentifieringsverktyg. Detta kom att kallas DNA Barcoding på engelska, vilket ibland försvenskas till DNA-barkodning eller ersätts med termen DNA-streckkodning.

Genregionen man bestämde sig för vad gäller djurriket var den mitokondriella genen cytochrom c oxidas subenhet I (COI). Då det visade sig att genen inte fungerade lika bra på alla organismgrupper, valde man senare andra gener för växter (kloroplastgenerna *rbcl* och *matK*) och svampar (den nukleära genen ITS).

För att kunna artidentifiera ett okänt prov behöver man först sekvensera den överenskomna genregionen – streckkoden. Hur det går till och viktiga saker att tänka på i anslutning till detta beskrivs av Markus Englund på s 17-18. DNA-sekvensen man får vid sekvenseringen är en textsträng med bokstäverna A, C, T, och G i olika kombinationer och upprepningar genom den cirka 650 bokstäver långa textsträngen. Bokstäverna representerar de fyra ämnena, så kallade kvävbaser (Adenin, Guanin, Cytosin och Tymin), som binder ihop DNA strukturen (den så kallade dubbelhelixen). Textsträngen med bokstäver kan man kopiera och klistra in i webbportalen Svenska DNA-nyckeln eller den internationella motsvarigheten BOLD för att jämföra med alla kända sekvenser i referensbiblioteket. Från detta kan en artbestämning oftast levereras, eller en

artlista om det var flera prover, förutsatt att organismgruppen för din okända sekvens finns väl representerad i referensdatabasen.

Man kan också få svaret att någon nära matchning inte kunde hittas varför någon artidentifiering inte heller gick att göra. Det beror oftast på att arten som det okända provet kommer ifrån ännu inte har lagts in i referensbiblioteket. För att en webbportal som svenska DNA-nyckeln ska fungera väl krävs det en databas med ett välfyllt referensbibliotek av kända DNA-sekvenser som okända sekvenser kan jämföras med. Det krävs att referensbiblioteket innehåller sekvenser av hög kvalitet, helst av alla arter i en organismgrupp som en okänd sekvens kan tänkas komma ifrån, och att de är kopplade till bevarade referensexemplar (se nästa sida).

Vad gäller svenska DNA-nyckeln så har denna webbportal just lanserats och referensbiblioteket är i uppbyggnadsfas. Just nu finns ganska bra täckning av svenska ryggradsdjur, framförallt fåglar, däggdjur och fiskar. För många andra djurgrupper, till exempel insekter så kommer man i svenska DNA-nyckeln ofta få svaret att inga liknande sekvenser kunde hittas och därför kunde ingen artbestämning göras. Man kommer då att rekommenderas att klicka på en länk

till den internationella sidan BOLD som har en större representation men som inte automatiskt kan filtrera fram till exempel kända svenska arter. Ibland kan det också vara så att närstående arter inte går att skilja från varandra med streckkoden varvid flera artnamn kan komma upp som svar på den okända sekvensen. Detta händer inte lika ofta med en geografiskt begränsad databas som Svenska DNA Nyckeln, men kan hända om man istället använder den "långsamare" ribosomala genen 16s (som också finns i webbportalen). För att arter ska gå att skilja åt med en gen som förändras långsamt, krävs att de varit skilda åt en längre tid än för en snabbare evolverande gen.

Exempel på prover att identifiera i en biologilab kan vara en fjäder från skolgården, spillning från närmaste skogs/ängsmark (helst av växtätare eftersom rovdjurspillning kan ge en oläslig sekvens med en blandning av både rovdjuret och dess byte om man använder standardprotokoll) eller en fiskfilé från någon matbutik eller restaurang. Det kan också gärna vara insekter som håvas in eller samlas in med någon slags fälla, men det innebär att djuren avlivas. Djurprover är att föredra då referensbibliotek för växter än så länge är ganska dåliga. ▶

Annons

Märkliga släktingar i havet!

Fjäderstjärna, mosaikormstjärna & kragollonmask

Lär dig allt om sjöborrar, sjögurkor, sjöstjärnor och andra spännande arter i Nationalnyckeln's nya bok. Beställ boken här: www.nationalnyckeln.se



NATIONALNYCKELN
TILL SVERIGES FLORA OCH FAUNA



Röd lergök *Psolus phantapus* • Bild: Helena Samuelsson • www.nationalnyckeln.se

Varför heter det DNA-streckkodning?



Exempel på referensexemplar som finns bevarade på Naturhistoriska riksmuseet är blåkråka till vänster (Cat. id. NRM 20106015) och morkulla till höger (Cat. id. NRM 20046331), som de illustrerade streckkoderna nedan har sek-

venserats ifrån. I detta fall var det en morkulla från Fibysjön utanför Uppsala och en felflugan blåkråka från Ramsberg norr om Lindesberg. Bilderna går att hitta på den museigemensamma samlingsdatabasen www.naturarv.se.

En liten del av DNA-streckkodsekvensen från en blåkråka, som totalt omfattar cirka 650 bokstäver.

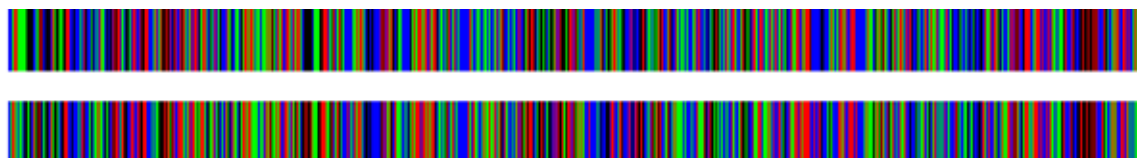
```
CTAATTTTTGGGGCCTGAGCGGGCATGGTTGGAACCGCCCTCAGCCTGCTCATTGCGCGAGAACTCGGTC  
AACCAGGAACCCTACTAGGAGACGACCAGATCTACAACGTAATCGTCACTGCCCATGCCTTCGTAATAATCT  
TCTTTATAGTCATACCAATCATAATCGGGGGCTTTGGAAACTGACTAGTCCCCCTTATAATCGGCGCCCCA...
```

En liten del av DNA-streckkodsekvensen från en morkulla, som totalt omfattar cirka 650 bokstäver.

```
CTAATCTTCGGTGCATGAGCTGGCATGGTCGGAACCGCCCTCAGCCTGCTTATTTCGTGCAGAACTAGGCCAA  
CCAGGAACCCTCTTGGGAGATGACCAAATCTACAATGTAATCGTTACTGCTCATGCATTGTAATAATTTTCTT  
CATAGTTATACCAATCATGATCGGAGGATTTGGAAATTGACTAGTCCCACTCATAATCGGCGCCCCCGACAT..
```

En DNA-sekvens kan visualiseras på ett mer överskådligt sätt om man låter linjer i fyra olika färger representera ordningen av kvävebaserna A, C, T och G i genen. Då åskådliggörs också analogin med vanliga streckkoder för till exempel produkter och varför det kallas "DNA-streckkodning".

Bilderna nedan visar DNA-streckkoden för blåkråka överst och morkulla nederst med samma sekvenser som ovan fast för hela den 650bp långa sekvensen. Ser du skillnad? (Tips titta till exempel alldeles i början av streckkoden)



Färgkoden till bilden ovan är:

Tymin (T) = grön

Guanin (G) = svart

Adenin (A) = röd

Cytosin (C) = blå

Text och bilder är delvis hämtade från Svenska DNA nyckeln på www.dnanyckeln.se (texter skrivna av Johannes Bergsten). Där går det att läsa mer om bakgrund och tillämpningar.



Konsten att göra en höna av en fjäder

– DNA-streckkoder i praktiken

Text: Markus Englund,
Naturhistoriska Riksmuseet

Med hjälp av korta artspecifika delar av DNA:t, så kallade DNA-streckkoder, är det möjligt att artbestämma till exempel en fågel utifrån bara en fjäder. I och med att tekniken blivit både enklare och billigare har tiden nu blivit mogen för att introducera DNA-streckkoder i skolundervisningen.

Att införa nya laborationer är ingen lätt uppgift. Som lärare ställs man inför många frågor: hur ska ny teori integreras? Hur ska eleverna arbeta rent praktiskt? Vilken utrustning behöver skolan köpa in? Och vilka frågeställningar ska eleverna jobba med? Den här artikeln ska försöka ge vägledning i hur du kan tänka kring dessa frågor när det gäller DNA-sekvenser, i första hand DNA-streckkoder.

Gymnasieskolans ämnesplan för biologi nämner inte uttryckligen arbete med DNA-sekvenser, men omfattar det ändå på sätt och vis. För Biologi 1 finns kopplingar till bland annat artidentifiering och organismers släktskap; för Biologi 2 ligger förmodligen molekylärbio-logins användningsområden och arbetsmetoder närmast till hands. Valet av angreppssätt lämnas i stor utsträckning åt läraren själv att avgöra.

DNA-streckkoder är praktiska

Det finns ofta flera skäl till varför man väljer att arbeta med DNA-streckkoder. Streckkodsmarkörerna är väl beprövade och tillräckligt variabla för att kunna särskilja närbesläktade arter. De är dessutom belägna i delar av genomet som är nog konservativa för att kunna mångfaldigas med hjälp av generella primrar. DNA:t är också förhållandevis lätt att mångfaldiga eftersom det förekommer i många kopior i varje cell.

Men streckkodsmarkörer behöver inte alltid vara bästa valet. Det är viktigt att man tar hänsyn till den aktuella frågeställningen när man väljer sin markör. Lämpligheten påverkas

dels av vilken organismgrupp som ska studeras och dels av vilken historisk tidshorisont man föreställer sig. DNA-streckkoder lämpar sig för att undersöka organismers evolutionära historia ner till artnivå, men ger liten eller ingen information på populations- och individnivå.

DNA-sekvenser kan användas för att lära ut många biologiska företeelser, från geners uppbyggnad och funktion till storskaliga evolutionära processer. Konkreta frågeställningar kan till exempel handla om att artbestämma fiskbitar från livsmedelsaffärens kyldisk eller att kartlägga släktskapet hos några arter av blommväxter.

Eleven måste inte göra allt

Arbetet med att ta fram en DNA-sekvens (enligt den traditionella Sanger-metoden) kan delas in i fem laborationsteg (se tabell nästa sida). Vilka steg som ska utföras av eleven och vilka som ska förberedas eller demonstreras av läraren kan anpassas efter rådande förutsättningar och efter vad man vill uppnå. Man kan till och med välja att helt strunta i det laborativa och istället låta eleven analysera DNA-sekvenser som laddats ner från Internet (steg 6 i tabellen).

Om sekvenser som tagits fram med samma markör uppvisar längdskillnader kan det ibland räcka med gelelektrofores för att belysa en frågeställning (se till exempel referensen *Undersökning av växternas evolution*). Längdskillnader förekommer i mindre utsträckning hos streckkodsmarkörerna, vilket innebär att sekvensering i allmänhet är nödvändig för att upptäcka skillnader.

Det femte och sista laborationssteget, sekvenseringen, utförs normalt inte på skolor eftersom det kräver mycket dyrbar utrustning. Flera universitet och kommersiella företag erbjuder sekvensering av renade PCR-produkter. Resultatet brukar skickas till kunden inom en eller ett par veckor.

Olika sätt att isolera DNA

Vid preparationen är det viktigt att provet är rent och att DNA:t inte har förstörts. Oftast



Steg	Exempel på utrustning	Exempel på kemikalier
1. DNA-preparation	Värmeskåp eller vattenbad; mikrocentrifug (ej vid användning av FTA®); dragskåp i vissa fall	Extraktionskit, FTA®-papper eller Chelex®
2. Mångfaldigande av DNA	PCR-maskin	PCR-mix; primrar
3. Gelelektrofores	Värmeplatta eller mikrovågsugn; elektroforesutrustning; spänningskälla	Agaros; buffertlösning; färg; DNA-stege
4. Rening av PCR-produkt	Mikrocentrifug alternativt PCR-maskin (vid användning av enzymer)	Reningskit eller enzymer (ExoSAP)
5. Sekvensering	PCR-maskin; sekvenseringsmaskin; dragskåp	Sekvenseringsreagens; primrar
6. Analys av sekvensdata	Dator med internetuppkoppling	Inga

Tabellen visar stegvis hur analysen går till när man vill ta reda på till vilken art ett biologiskt material hör.

räcker några få milligram av en vävnad. Metoden kan se lite olika ut beroende på om man arbetar med växt- eller djurmaterial.

För extraktion av DNA finns flera kommersiella kit att tillgå, men priserna kan vara ganska höga. Ett lättarbetat budgetalternativ som fungerar för djurvävnad är den så kallade Chelex®-metoden. Ett annat är FTA®-papper som finns för både växt- och djurvävnad. Fördelen med färdiga kit är att de vanligtvis ger ett större DNA-utbyte och att proverna kan sparas under lång tid. En nackdel med Chelex®-metoden är att man bör starta sin PCR direkt efter extraktionen.

Datorn är ett viktigt redskap

Man kan komma långt med bara en dator och en Internet-anslutning. På webbplatser som GenBank, BOLD och EBI (se länktips) finns en outtömlig källa av sekvenser att ösa ur. Där finns också flera olika verktyg för att jobba med sekvenser. Datorövningen *Lär känna din släkt* (se lästips) visar hur eleven kan få bekanta sig med några av verktygen.

Tips

Välj bort giftiga kemikalier

Metoderna inom molekylärbiologin utvecklas i snabb takt. Idag kan man för det mesta undvika kemikalierna som är mest skadliga för hälsan eller miljön. Ett exempel är det mutagena ämnet etidiumbromid (EtBr) som fram till relativt nyligen använts flitigt vid gelelektrofores. Nu finns flera mindre skadliga alternativ som fungerar i stort sett lika bra (till exempel GelRed™ och GelGreen™). Fråga gärna efter hälsosamma och miljövänliga alternativ när du köper in kemikalier till din skola!

Begagnad utrustning duger för det mesta

Mikrocentrifuger och PCR-maskiner har länge hört till standardutrustningen inom molekylärbiologin men är tyvärr fortfarande ganska dyra att köpa in. Hör med ett molekylärbiologiskt laboratorium om det finns någon uttrangerad maskin som de kan tänkas sälja billigt eller ge bort. Ibland händer det nämligen att äldre men fullt fungerande apparater blir stående oanvända när maskinparken uppgraderas.

Våga utforska nätets resurser

Webben är en fantastisk resurs när det gäller molekylärbiologiska data. Den stora informationsmängden kan dock kännas övermäktig och det kan vara svårt att veta var man ska börja. Webbplatsen *Den Svenska DNA-nyckeln* (dna-nyckeln.se) som tillhandahålls av Naturhistoriska riksmuseet är en bra startpunkt för utforskandet av DNA-streckkoder. Därifrån kan du sedan ta dig vidare till flera internationella webbplatser med liknande innehåll.

Referenser och lästips

Växters evolution. Laborationshandledning och datorövning av Markus Englund. Finns på Bioresurs hemsida i anslutning till Bi-lagan nr 1, 2014.

Artikeln *Lika eller olika?* av Ammie Berglund i Bi-lagan nr 3, 2013.

Artikeln *En svartvit streckkod på labbet – en hjälp för fältbiologen att artbestämma* av Malin Strand i Fauna och Flora nr 4, 2012. Kan laddas ner från: www.artdata.slu.se/FaunaochFlora/pdf/faunaochflora_4_2012_Streckkod.pdf

Laborationshandledningen *Undersökning av växternas evolution* av Andy Harrison, John Schollar och Dean Madden. Bioscience Explained, volym 3, nr 2. Kan laddas ner från bioscience-explained.org

Datorövningen *Lär känna din släkt* från Biotopia i Uppsala. Elevmaterial och sekvenser kan laddas ner från www.biotopia.nu/component/content/article/207-laer-kaenna-din-slaekt

The Barcode of Life Data Systems, BOLD (boldsystems.org) är en engelskspråkig internationell webbplats som samlar DNA-streckkoder från olika organismgrupper.

GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) är en amerikansk webbplats som tillhandahåller all slags genetisk data, men även olika verktyg.

The European Bioinformatics Institute, EBI (www.ebi.ac.uk) är europeisk webbplats som tillhandahåller information av samma typ som GenBank.

Svenska biotermgruppen (biotermgruppen.se) tillhandahåller termer och definitioner på svenska för många begrepp som förekommer inom molekylärbiologin.

Den Svenska DNA-nyckeln (dna-nyckeln.se) är en svenskspråkig webbplats från Naturhistoriska riksmuseet där du kan söka efter sekvenser.