



# Tomat och banan – hur är de släkt?

## Laborationsbeskrivning

### Introduktion

I denna övning studeras släktskapet mellan olika växtarter. Övningen beskriver översiktligt arbetsgången från extraktion och PCR, via sekvensering tills ett släktträd konstruerats. En sekvens med beteckningen *trnL*, en intron i en tRNA-sekvens som finns i kloroplast-DNA, används i den praktiska delen av övningen. *trnL* är användbar för att särskilja arter som är relativt närstående.

Om man inte vill genomföra den praktiska delen av laborationen går det utmärkt att hämta DNA-sekvenser från databasen GenBank och utifrån dessa sekvenser bygga ett släktträd, alternativt använda de sekvenser som finns i en separat fil från Skolprojekt Linné. En utförlig beskrivning av den teoretiska delen finns i övningen som heter *Tomat och banan -Alignment*.

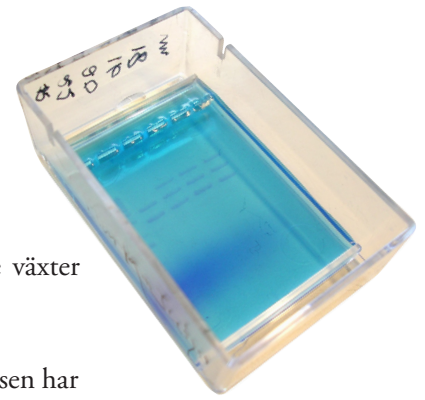
### Praktiskt genomförande

#### Extraktion av växt-DNA, PCR och elektrofores

DNA från växtmaterial kan enklast renframställas med hjälp av färdiga analyskit (kit). En enkel metod presenteras utförligt i laborationen *Undersökning av växternas evolution*, se webbtidningen Bioscience explained vol 3, nr 2, [http://bioenv.gu.se/digitalAssets/1568/1568598\\_plantevolsve.pdf](http://bioenv.gu.se/digitalAssets/1568/1568598_plantevolsve.pdf). Laborationen har utvecklats av NCBE som också säljer material till laborationen (National Centre for Biotechnology Education, University of Reading, England, [www.ncbe.reading.ac.uk](http://www.ncbe.reading.ac.uk).) Använd beskrivningen i Bioscience explained vid genomförandet av laborationen, nedan följer endast en översiktlig beskrivning.

- Växtmaterial från många olika arter kan användas, exempelvis kan grönsaker inköpas i livsmedelsaffär. Undvik växter med hårda blad.
- Whatman FTA® växtkort används för att frigöra DNA från växtmaterialet (en del av ett använt växtkort syns till vänster).
- Provet med växt-DNA tas från växtkortet.
- Provet renas.
- Växt-DNA amplifieras. I ett PCR-rör tillsätts DNA-provet, två olika primers, vatten och PCR-mix i form av en kula med enzymet *Taq-polymeras*, buffert, nukleotider och magnesiumklorid. PCR-apparaten programmeras enligt temperaturanvisningar i labbeskrivningen. Frys in





PCR-produkten om den inte ska användas omedelbart.

- Kontrollera PCR-produkten med gelelektrofores, se bild t.h.

Kortare DNA-

fragment kommer att vandra snabbare än längre. Besläktade växter

brukar ha DNA-

fragment av liknande storlek.

- Labben från Bioscience Explained slutar med att gelelektroforesen har genomförts. En

sekvensering av DNA kan göras genom att skicka DNA till ett labb som kan genomföra sekvenseringar, se nedan.

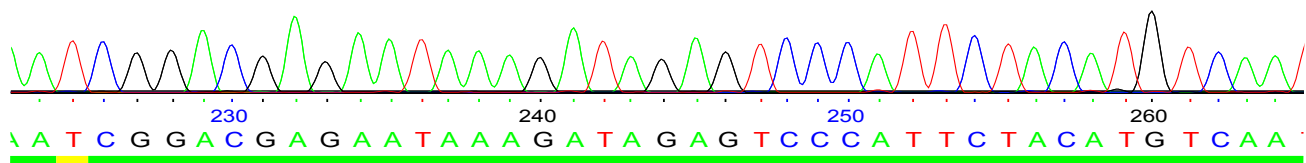
OBS! Vid efterföljande sekvensering: Gör en gelelektrofores för att kontrollera att det finns tillräckligt mycket DNA för att räcka till sekvensering. Se också till att tillräcklig mängd av PCR-produkten finns kvar för att räcka till sekvensering. Det är särskilt viktigt att PCR-produkten antingen fryses eller renas omedelbart efter det att PCR genomförts för att hindra att DNA bryts ner, se vidare nedan.

## Sekvensering

För att se skillnaderna mellan DNA-sekvenserna från de olika växterna behöver man göra en sekvensering – det är inte säkert att gelelektroforesen visar några skillnader. PCR-produkten måste renas innan den skickas iväg till ett speciallabb för sekvensering. Reningen görs med exempelvis *QIAquick PCR Purification Kit* från företaget *QIAGEN*, se referens nedan. Utförliga anvisningar för rening av PCR-produkten medföljer kittet.

Kontakta det labb som ska utföra sekvenseringen för att få uppgifter om hur proverna ska beredas innan de skickas in, se referenslistan med kontaktuppgifter. För att kunna genomföra en sekvensering krävs det att en primer tillsätts till röret med PCR-produkten. Denna primer kan man själv sätta till proverna innan de skickas iväg. Det behövs bara *en* primer och det går bra att använda en av de två primers som fanns med i PCR-reaktionen. Vilken av primerna man använder till sekvenseringen spelar ingen roll. Primern tillsätts i en lägre koncentration (10 pmol (picomol) till en 50 µl-reaktion). Man kan också låta tillverka primers enligt en given sekvens, se referenser för uppgifter om labb som tillverkar primers. Vissa labb som utför sekvensering kan själva tillverka och sätta till primern.

När sekvenseringen är klar skickas uppgifter via mail från labbet om hur man hämtar hem



resultatet. Resultatet för en liten sekvens från broccoli syns ovan i form av ett kromatogram överst och nedanför motsvarande nukleotidsekvens. Det krävs att man har ett speciellt program för att kunna se sekvenserna. För PC rekommenderas *Sequence Scanner v1.0* och för Mac-dator *4peaks*. Båda programmen kan laddas ner gratis.

Granska DNA-sekvenserna och spara som textfiler. Partier som visar en skadad DNA-kod tas bort, i annat fall kan det bli problem om sekvensen ska användas för att söka i databaser efter andra liknande sekvenser. Partier med sämre kvalitet visar sig genom att det finnas upprepade luckor i sekvensen eller också ersätts nukleotiderna A, T, C och G med ett N, som visar att nukleotiden inte kunnat identifieras.

## Alignment

DNA-sekvenser från olika växtarter ska nu användas för att bygga ett släktträd. För vidare instruktioner se uppgiften *Tomat och banan - Hur är de släkt? Alignment*.

## Referenser

Övningen ingår i Idéhäfte 6 *Efter Linné*, serien *Linnélektioner*. Red. Britt-Marie Lidesten. Nationellt resurscentrum för biologi och bioteknik. 2008

Övningen har utvecklats av Elisabeth Långström, FD, botaniker, informatör, Inst. f. Evolution, genomik och systematisk botanik, Uppsala universitet och Britt-Marie Lidesten (se ovan)

### *Instruktion och inköp av material:*

För instruktion och inköp av material till den praktiska delen med extraktion av DNA från växtmaterial hänvisas till Bioscience explained vol 3, nr 2, [www.bioscience-explained.org](http://www.bioscience-explained.org). Laborationen har utvecklats av NCBE (National Centre for Biotechnology Education, University of Reading, England, [www.ncbe.reading.ac.uk](http://www.ncbe.reading.ac.uk).)

### *Bildspel med en översikt över laborationen finns på:*

<http://www.ncbe.reading.ac.uk/NCBE/MATERIALS/DNA/plantevomodule.html>

### *Beställning av kit för rening av PCR-produkt:*

QIAquick PCR Purification Kit beställes från företaget Qiagen tel. 020-798328, <https://www.qiagen.com/se/shop/>

### *Beställning av primers:*

Beställes från Invitrogen, <https://www.thermofisher.com/se/en/home.html> Direktlänk för beställning av primers: <https://www.thermofisher.com/se/en/home/products-and-services/product-types/primers-oligos-nucleotides/invitrogen-custom-dna-oligos.html>

### *Exempel på laboratorier som tar emot DNA-prov för sekvensering:*

- Uppsala Genome Center, Uppsala universitet, [http://www.igp.uu.se/facilities/genome\\_center/services/next-generation-sequencing/](http://www.igp.uu.se/facilities/genome_center/services/next-generation-sequencing/)  
Kontaktuppgifter: <https://portal.scilifelab.se/genomics/node/373>.
- Macrogen, se [www.macrogenusa.com](http://www.macrogenusa.com) (koreanskt företag). Företaget tillverkar primers utifrån angiven sekvens.