



Foto: Fartyget: Pixabay



Skärmdump från sidan marinetraffic.com. De olika färgerna motsvarar olika typer av fartyg.

Invasiva arter i barlastvattnet

Kan en främmande djurart upptäckas utan att vi behöver hitta själva djuret? Ja, med hjälp av en metod som kallas PCR. I den här uppgiften ska du med en "modell" av ett vattenprov undersöka om fartygets vattentankar innehåller DNA från någon av de invasiva främmande djurarter som kan följa med fartyg från olika delar av världen.

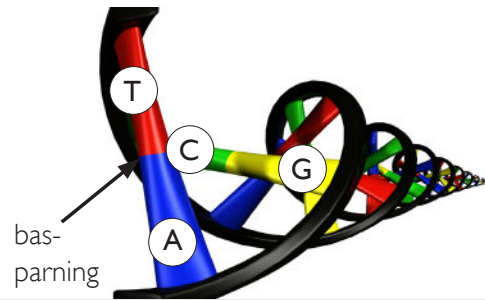
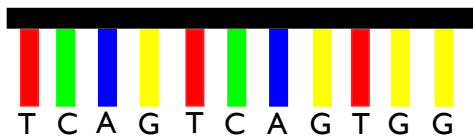
På världshaven transporteras hela tiden mängder av varor med hjälp av lastfartyg. Ibland går fartygen inte fullastade och då pumpas barlastvatten (havsvatten) in i speciella tankar för att stabilisera fartyget och för att det ska ligga tillräckligt djupt. När det görs kan havslevande organismer följa med. Om vattnet sedan töms ut i havet någon annanstans i världen kan det orsaka problem för ekosystem. För att förhindra att detta händer finns regler för var, när och hur fartygen får tömma och fylla på sina barlast-tankar. För att ta reda på om reglerna följs kan man göra kontroller.

Ta vattenprover och rena fram DNA

Tänk dig att du jobbar med att testa vattenprover från olika fartyg för att ta reda på om vattnet innehåller cellrester från någon invasiv främmande djurart. Du börjar med att åka till fartyget för att ta ett vattenprov av barlastvattnet.

Tillbaka på laboratoriet filtreras vattnet för att samla ihop celler och cellrester från organismer i vattnet. På filtret fastnar alla möjliga molekyler, även DNA. Rester av cellmembran, proteiner och kolhydrater tvättas bort så att det enda som slutligen finns kvar från vattenprovet är en blandning av DNA från de olika arter som lämnat spår i vattnet. Allt är smått, ingenting syns i ett mikroskop och även om det skulle synas är alla DNA-molekyler likadant uppbyggda.

Så hur ska vi göra för att få veta om det finns DNA från just de invasiva arterna?



Liten DNA-skola

DNA består av två enkelsträngar som hålls ihop med **basparning** där kvävebasen A binds till T och G binds till C.

En **sekvens** är ordningen av kvävebaser efter varandra (till exempel TCAAATGG)

Ovan visas en enkel DNA-sekvens. Sekvensen är ifylld i tabellen nedanför. Fyll i de tomma rutorna så får du en dubbel DNA-sekvens:

T	C	A	G	T	C	A	G	T	G	G

PCR – metod för att hitta en speciell sekvens

Jämförs DNA-molekyler från olika arter kan delar av DNA ha exakt lika sekvens. Men när vi letar efter en viss art siktar vi in oss på de delar av DNA som är unika - och som skiljer olika arter från varandra.

Med metoden **PCR** (*Polymerase Chain Reaction*) kan man undersöka om det finns spår av DNA från en viss art. Tricket är att använda små "målsökande" korta sekvenser, **primers**. De ska vara tillräckligt långa för att bara passa in på en unik DNA-sekvens som finns i den art vi letar efter. För att designa målsökande primers måste man veta hur DNA ser ut för den organism man söker efter. Den informationen går att hitta i databaser där forskare lagrat många olika arters hela DNA-sekvens.

Mer om primers

- Hur uttalas primer? Svar: "prajmer"
- En primer består av samma byggstenar som DNA (nukleotider med kvävebaserna A, T, C och G), men de är **korta enkelsträngade bitar**.
- Man behöver två primers: **primer 1** och **primer 2** som ska fästa i början och slutet av det unika DNA-området.
- Ordningen på kvävebaserna för primer 1 ska matcha början på den unika DNA-sekvensen för arten vi letar efter.
- Ordningen på kvävebaserna för primer 2 ska matcha i slutet av den unika DNA-sekvensen för arten vi letar efter.
- Förutom primers tillsätts **kopieringsenzymer** och byggstenar till DNA (nukleotider med kvävebaserna A, T, C och G).
- Kopieringsenzymerna bygger bara in nukleotider på enkelsträngat DNA där det har fäst in en primer.
- Platser där primer fäster ger start och stopp för kopiering.

Mycket DNA med en viss sekvens

De blå pilarna här nedanför visar åt vilket håll kopieringsenzymerna jobbar. Kopieringsenzymerna kan bara jobba åt ett håll (därför pilarna). Nedan är en DNA-molekyl med bara kvävebaserna utskrivna:

```
ATCGACCCATATGCGCCCCAGAACCGCGGAATC
TAGCTGGGTATACGCGGGGTCTTGGCGCCTTAG
```

När temperaturen höjs i PCR-maskinen (till 95°C) delas DNA upp i två enkelssträngar. När temperaturen sänks lite (till 60°C) fastnar primers där den passar in med A mot T och G mot C:

Primer 1 med CTGGGTA (gul), matchar GACCCAT på övre strängen.

```
ATCGACCCATATGCGCCCCAGAACCGCGGAAT
CTGGGTA →
← CCGCGGAAT
TAGCTGGGTATACGCGGGGTCTTGGCGCCTTAG
```

Primer 2 med CCGCGGAAT (blå), matchar GGCGCTTA på nedre strängen.

När kopieringsenzymerna jobbat ett tag höjs temperaturen igen, och då börjar det om på samma sätt igen. Ofta kör man 25–30 upprepningar med temperaturhöjning och sänkning (PCR-cykler).

Efter det finns det miljontals kopior av området mellan primer 1 och primer 2 – här nedan markerat med en rutan:

```
ATCGACCCATATGCGCCCCAGAACCGCGGAATC
TAGCTGGGTATACGCGGGGTCTTGGCGCCTTAG
```

En "PCR-produkt" från det här exemplet skulle ge miljontals bitar som alla är 29 baspar långa och med precis den här DNA-sekvensen som är inrutad. Primers ingår i de här nybyggda DNA-bitarna. Byggmaterialet i övrigt kommer från de nukleotider med kvävebaserna A, T, G och C som man tillsatte i PCR-röret i början.

Vad händer om de primers vi valt inte passar in på något DNA i det prov vi undersöker?

Då bildas ingen PCR-produkt. Då har vi inte kunnat hitta något spår av den art vi söker! Det är genom att designa primers som man bestämmer vad som ska hittas och kopieras upp.

Hur kan man "se" om det bildats en PCR-produkt?

Man kan använda kemikalier som ger en färgförändring i själva provröret där man kör PCR. Om kopieringsenzymet kommer igång och jobbar (om båda primers fäster) blir det mer färg. Eller så kan man använda en metod som kallas för gelelektrofores. Se sista uppgiften.



Svartmunnad smörbult



Amerikansk kammanet

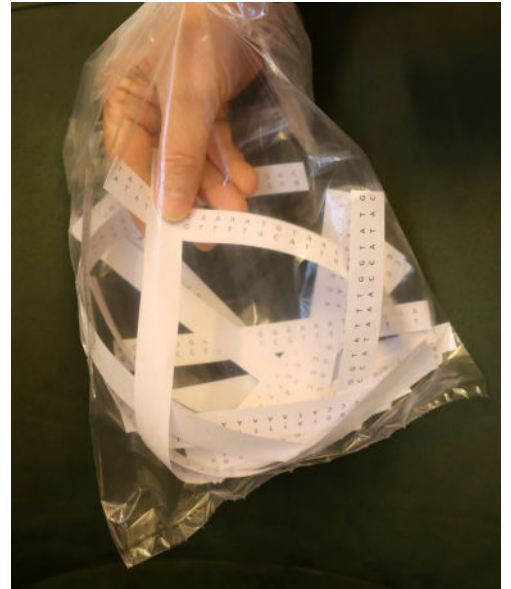
Foto: Wikipedia By Bruno C. Veilittini



Ullhandskrabba

Uppgift 1

- Bredvid dig ska du nu ha en påse med ett antal sekvenser. Tänk dig att det är ett vattenprov från ett fartyg i hamnen.
- Din uppgift är nu att ta reda på om det finns tecken på att en invasiv art har följt med i barlastvattnet.
- I påsen finns en blandning av DNA som kan komma från alla organismer som har funnits i vattnet. Det kan komma från djur, alger, växter, svampar eller bakterier.
- De arter du letar efter är DNA-sekvenser från svartmunnad smörbult, amerikansk kammanet och ullhandskrabban
- Använd **papperet med primer-sekvenser** som har designats för att hitta smörbult, ullhandskrabba och kammanet. **Undersök om du hittar någon av dessa arter i ditt "vattenprov"**.



Frågor att svara på:

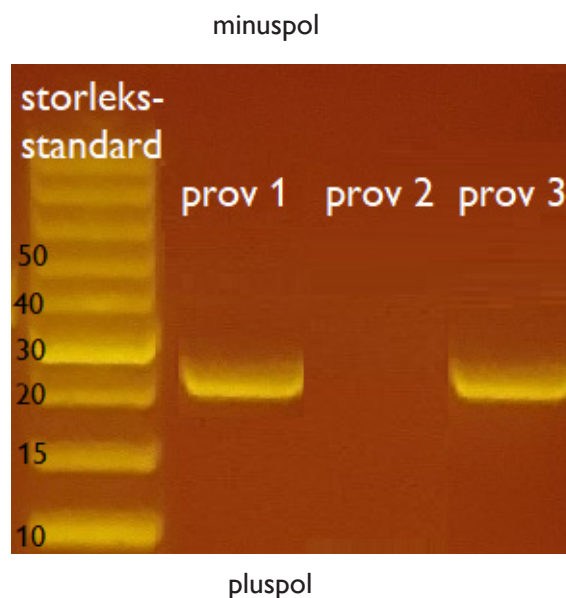
1. Hittade du spår av DNA från någon av de tre invasiva främmande arterna i vattenprovet? Vilken art var det i så fall?

2. Vad är en DNA-sekvens?

Uppgift 2

Gelelektrofores är en metod för att ta reda på om det har bildats en produkt efter att ha kört en PCR-reaktion. Beroende på vilka primers man har använt blir DNA-sekvenserna från de olika djuren olika långa (med olika antal baspar). För att ta reda på hur långa de är kan proverna laddas på en gel.

- Metoden är att man suger upp PCR-blandningen i en pipett och sätter ned en droppe i ena änden på en gelplatta (i bilden till höger skulle det motsvara den övre delen av bilden).
- Sedan läggs en elektrisk spänning över gelplattan (se minuspol och pluspol i bilden).
- DNA är negativt laddat och börjar röra sig i gelplattan ner mot pluspolen.
- Gelplattan innehåller ett färgämne som fastnar på DNA när de rör sig i gelplattan.
- PCR-produkter syns som streck (se bilden). Om det inte finns något ljusstreck nedanför där proverna har lagts - då har det inte bildats någon PCR-produkt i det provet.
- Korta DNA-bitar hinner röra sig längre än de som är långa.
- För att se hur långa DNA-bitar som ingår i PCR-produkten kan man använda en storleksstandard. I bilden visar strecken till vänster i bild hur långt DNA-bitar som är 10 baser långa (längst ned i bild), 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70 och 80 har hunnit i gelen.



Frågor att svara på:

Tänk att bilden här ovanför visar resultatet av en PCR-analys där vi sökt efter arten kinesisk ullhandskrabba i tre olika vattenprover.

1. I vilket/vilka vattenprover finns det spår av kinesisk ullhandskrabba?
2. I vilket/vilka vattenprover finns inte spår av kinesisk ullhandskrabba?
3. Hur vet vi att det är just kinesisk ullhandskrabba som vi undersökt?
4. Ungefär hur långa är PCR-produkterna för kinesisk ullhandskrabba enligt bilden?