

Hur man gör

I detta kapitel ska vi titta mer i detalj på hur genteknik går till. Hur man hittar och analyserar gener, hur man tar genetiska fingeravtryck och hur man egentligen gjorde när man kartlade hela människans arvs massa. Några av förklaringarna i detta avsnitt kräver att man vet ordentligt hur en DNA-molekyl ser ut. Vet man inte det rekommenderas att man läser på i sin ordinarie lärobok.



Klippa, klistra och hitta en gen

Många tror att genteknik är något mycket svårt och komplicerat. Det är inte sant. Den som arbetar i ett gentekniskt laboratorium ägnar större delen av sin tid åt några mycket enkla handgrepp: att rena fram DNA, att klippa DNA, att sortera DNA, att klistra ihop DNA-bitar med varandra och att föra in dem i bakterier.

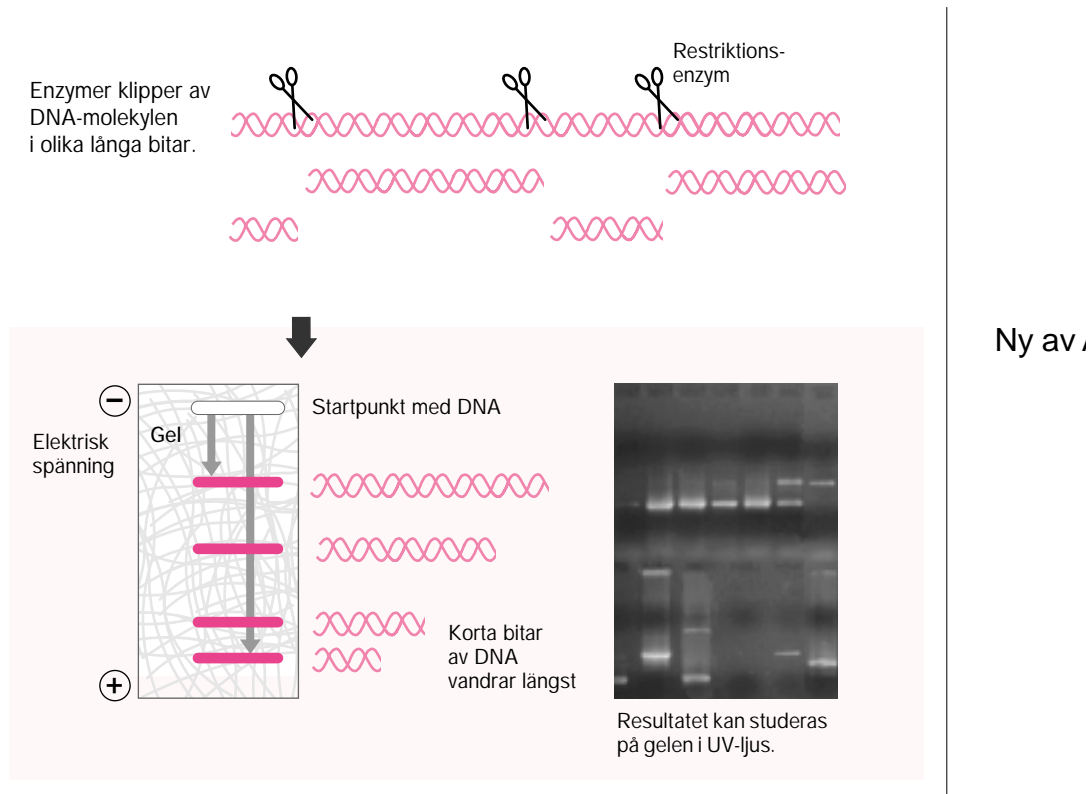
Att rena DNA

I princip är det mycket enkelt att rena fram DNA. Man tar de celler vars arvs massa man vill isolera, lägger dem i ett provrör och slår sönder dem. Det sker antingen genom ultraljudsbehandling, genom att mala dem eller genom att hålla i tvålämnen som löser upp deras cellmembran. De krossade cellerna centrifugeras. Då kommer rester av cellmembran, ribosomer och andra tunga saker att hamna i botten av provröret. Vätskan ovanför innehåller DNA, proteiner och ett ämne som heter RNA. I denna vätska droppar man ett enzym, som bryter ner RNA-molekylerna. Sedan håller man på fenol och skakar provröret. Fenol får proteiner att kleta ihop med varandra. När man låter röret stå, sjunker fenolen till botten. De hopkletade

proteinerna hamnar som ett vitt ludd i gränsskiktet mellan fenolen och den vattenlösning där DNA-molekylerna simmar omkring. Suger man upp vattnet ovanför fenolen och det vita luddet, har man en lösning med enbart DNA. Hela denna procedur tar mellan en halv timme och sex timmar, beroende på hur rent DNA man vill ha.

Att klippa DNA

För att klippa DNA-molekyler i mindre bitar använder man en grupp proteiner som kallas restriktionsenzymer. De fungerar i naturen som bakteriernas försvar mot virus: de känner igen och klipper av DNA-molekyler vid vissa kombinationer av DNA-bokstäver, som bakterierna själva inte har. Dessa proteiner kan därför användas av gentekniker som "målsökande saxar". Håller man ett sådant enzym i en lösning med en viss DNA-molekyl och låter röret stå tillräckligt länge (en timme), kommer DNAt att delas på varje ställe där denna bokstavs-kombination förekommer. Till all lycka för genteknikerna har man hittat ett stort antal olika sådana enzymer som kan känna igen många olika bokstavs-kombinationer.



Att sortera DNA

För att sortera DNA-bitarna använder man något som kallas gel-elektrofores. Man gjuter då en geléaktig platta, där långa grenade molekyler korsbinder varandra och skapar ett vattenfyllt nätverk. DNAt läggs sedan i en fördjupning i ena änden av plattan, och en elektrisk spänning läggs mellan plattans ändar så att de negativt laddade DNA-bitarna tvingas vandra ut i plattan. DNA-molekylernas vandring i nätverket i plattan påminner nu om en armé som ska mar-

schera genom en djungel. Ju längre DNA-molekylen är, desto mer trasslar den in sig i nätverket och desto långsammare går det. När man bryter den elektriska spänningen har därför korta DNA-bitar kommit långt i plattan, medan de längsta är kvar nära startpunkten. DNA-molekylerna har alltså sorterats efter storlek i plattan. Sedan kan man lätt skära ut den del av plattan som innehåller de DNA-molekyler man är intresserad av, och rena fram DNA-molekylerna därifrån.

Att klistra DNA

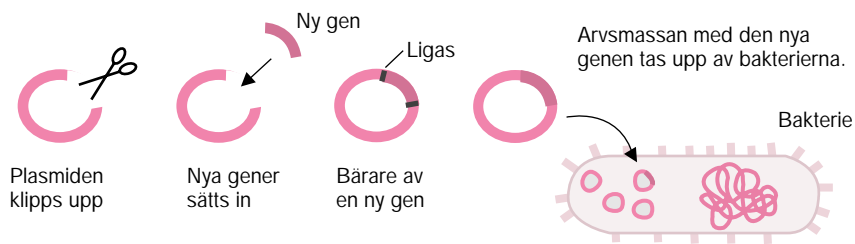
I alla celler finns ett protein som kallas ligas, som kan klistra ihop trasiga DNA-molekyler. Då man ska föga ihop två DNA-molekyler med varandra lägger man dem i samma provrör och tillsätter ligas. Efter några timmar i kylskåpet kommer åtminstone några av DNA-bitarna att sitta ihop.

Plasmider

När en gentekniker genom klippande, sorterande och klistrande skapat en ny DNA-molekyl, vill han kunna göra många nya kopior av den. Man klistrar därför fast DNA-molekylen i en större bärar-DNA molekyl, och för in denna DNA-konstruktion i en bakterie. Bärar-DNA:t ser till att bakterien tar hand om

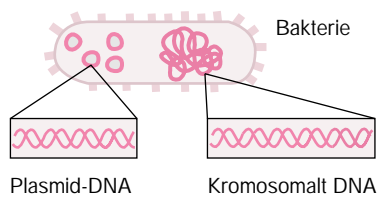
Klippa och klistra i plasmider

Plasmider finns naturligt i många bakterier. Genteknikerna kan använda dem till att bära nya DNA-molekyler.



det nya DNAt, och kopierar detta var gång bakterien ska dela sig. Därmed mångfaldigas DNA-molekylen varje gång bakterien delar sig. Läger man bakterien i lite näringslösning får man därför efter någon dag ett mycket stort antal bakterier, som bär ens DNA-molekyl.

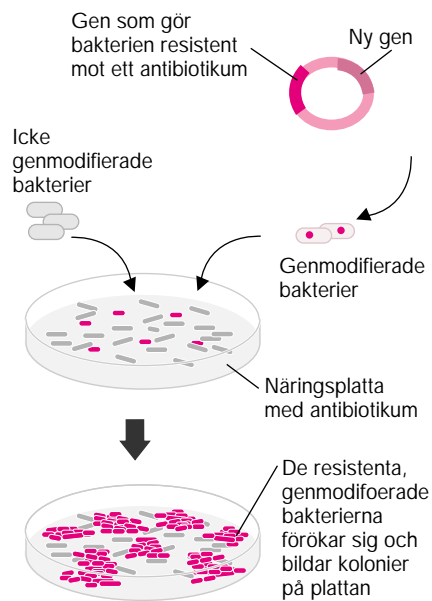
Som bärare använder man ofta så kallade plasmider, små ringslutna DNA-molekyler som finns naturligt i många bakterier vid sidan av bakteriernas normala (så kallade kromosomala) DNA. Plasmiderna innehåller för det mesta extra arvsanlag, som bakterien kan ha nytta av, och de är utformade på ett sådant sätt att bakterien tar hand om dem nästan som om de vore bakteriernas egna DNA-molekyler. De plasmider en gentekniker använder har fått de flesta av sina "naturliga" gener bortamputerade, och innehåller istället en rad saker som är till nytta för genteknikerna.



Att föra in genen i en bakterie

För att föra in DNA i en bakterie gör man sedan så här: man låter bakterierna växa och dela sig tills de växer riktigt snabbt. Då kyler man snabbt ner dem och låter dem simma i en kemikalie som heter kalciumklorid. Sedan håller genteknikern på de plasmider hon eller han

Att hitta en cell



vill att bakterien ska ta upp. Efter tjugo minuter på isbad har ungefär en bakterie av tiotusen tagit upp en plasmid. Man säger då att bakterien transformerats.

Att hitta de genmodifierade cellerna

För att hitta de bakterier, som tagit upp det nya DNAt, använder genteknikerna sig av ett litet trick: tillsammans med den gen de vill få in i bakterien, sätter de en gen som gör bakterien motståndskraftig mot ett antibiotikum, det vill säga ett ämne som hindrar bakterier från att växa och dela sig. Bakterierna hålls sedan ut på en näringsplatta med detta antibiotikum. Bara de bakterier

Bakterie med plasmid som bär på genen för vidhäftningsförmåga i tarmslemhinnan.

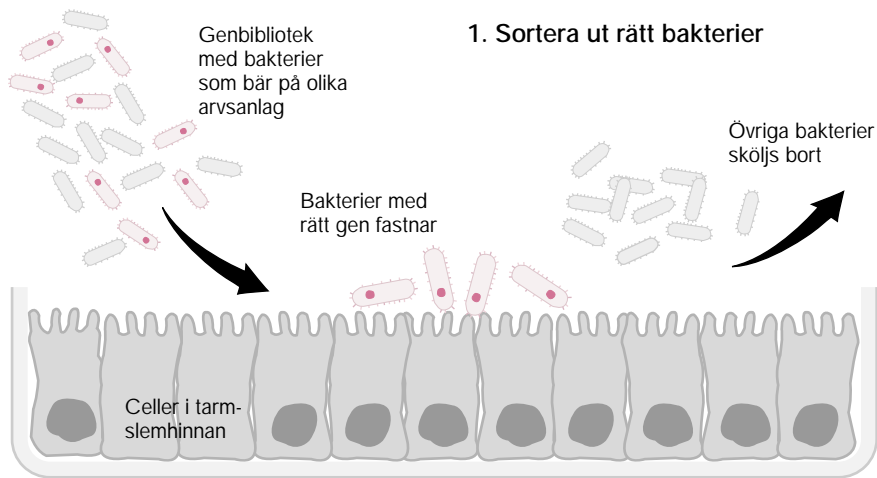
Protein som griper tag i tarmslemhinnan



Bakterie med andra gener

Att hitta en gen

Här ser man hur forskarna har hittat genen som gör att en magsjukbakterie kan binda till slemhinnan i tarmväggen.



som tagit upp de nya generna kommer då att kunna växa och dela sig. Därmed kommer alla bakterier som växer på plattan att vara genmodifierade.

Att hitta den gen man söker

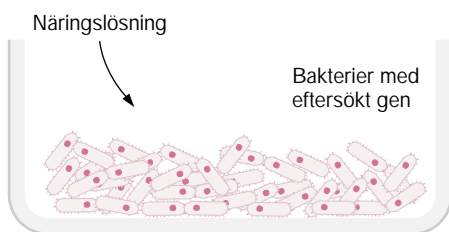
Hur gör genteknikerna för att hitta en viss gen? Låt oss ta ett påhittat exempel. Antag att forskarna är på jakt efter genen för ett av de proteiner som gör att kolerabakterien kan orsaka sjukdom. Närmare bestämt det protein bakterien använder för att gripa tag i slemhinnan i våra tarmar och hålla sig fast medan de tillverkar det gift, som orsakar svåra diarréer.

Forskarna skulle då kunna göra på följande sätt. De renar fram DNA från kolerabakterier. Sedan tillsätter de rest-

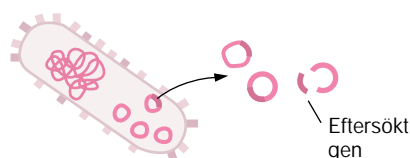
riktionsenzymer, men avbryter klippandet i förtid så att de får olika långa, överlappande DNA-bitar från kolerabakteriens arvsanlag. Bitarna klistras in i plasmider, som förs in i andra bakterier. De plasmider man använder måste bära signaler som får bakterierna att tillverka mycket protein från genen invid.

Forskarna erhåller då en soppa med en enorm massa bakterier som bär på olika delar av kolerabakteriens arvsanlag. Detta kallas ofta för ett genbibliotek. Men till skillnad från våra bibliotek finns där inga kataloger och ingen systematik som gör det lätt för forskarna att hitta den bakterie de söker. Några bakterier i biblioteket bär på just den gen de söker. Men tusentals bakterier bär på andra gener. Forskarna måste därför

2. Öka antalet bakterier



3. Rena fram eftersökt gen



använda något slags trick för att kunna hitta just de bakterier som bär den gen de letar efter.

I detta fall kan forskarna utnyttja att den gen de söker ger bakterierna en helt ny egenskap – att gripa tag i tarm-slemhinnan. De bakterier som har den sökta genen kommer att tillverka ett protein, som gör det möjligt för dem att fästa vid celler från en tarmslemhinna. Forskarna kan därför odla sådana celler på botten av en cellodlingsflaska och sedan hålla på bakterier från genbiblioteket. Efter en stund kommer de bakterier, som har den eftersökta genen, att sitta fast på cellerna. Håller man då bort vätskan och sköljer några gånger kommer bara de bakterier man söker att finnas kvar i flaskan. När man sedan håller på näringslösning kommer bakterierna

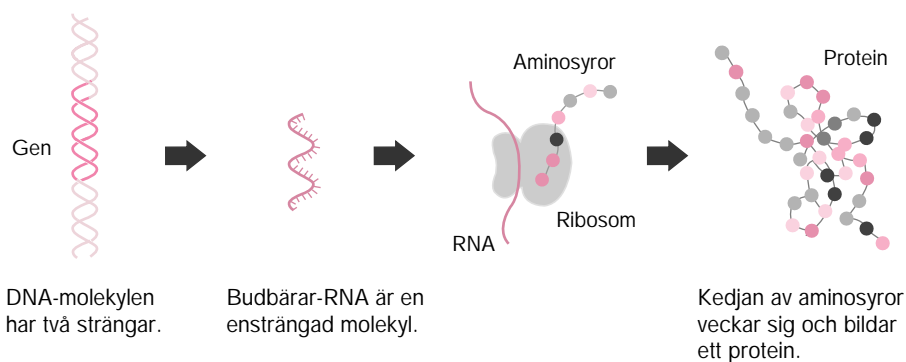
att börja dela sig och bilda en stor kultur med bakterier som bär den eftersökta genen.

Man kan därefter rena fram plasmider från dessa celler, klippa ut genen ur dem och undersöka den. Dessutom kan man odla upp stora mängder av bakterier, som bär på plasmiden, och frysa ner dem eller skicka dem till andra forskare som också vill undersöka genen. Den eftersökta genen är därmed isolerad. Man kallar också detta för att genen är klonad. (Ordet klonad har här en helt annan betydelse än i kapitel 15 och 16).

Att stänga av en gen

I en del fall vill genteknikerna inte lägga till en gen utan istället stänga av en gen i en växt eller ett djur. De kan då använda sig av något som kallas antisenssteknik.

Från gen till protein



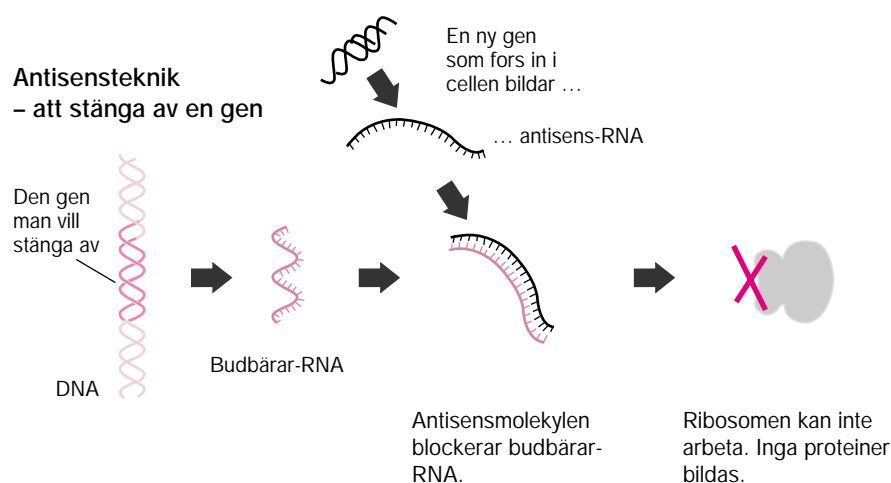
För att förklara den måste vi titta närmare på hur det går till då en levande organism använder instruktionerna i generna för att bilda ett protein.

Då cellen ska tillverka ett protein börjar den med att göra en kopia av genen för proteinet. Kopian tillverkas av ett ämne som kallas RNA, och själva kopian kallas ofta för budbärar-RNA. Denna vandrar sedan till cellens proteinfabriker (som kallas ribosomer), där den fungerar som instruktion då proteinet tillverkas.

Budbärar-RNA molekyler påminner kemiskt om DNA-molekyler. Den viktigaste skillnaden är att en DNA-molekyl består av två strängar som lindar sig kring varandra, där de två strängarna på molekylen känner igen och binder till varandra. En RNA-molekyl består däremot i regel bara av en sträng. Om en

RNA-molekyl möter en annan RNA-molekyl, där bokstävernas ordningsföljd precis passar ihop med den första RNA-molekylens, kan de två molekylerna binda till varandra på ungefär samma sätt som de två strängarna i en DNA-molekyl.

Detta utnyttjar forskarna när de vill stänga av en gen. De för då in en konstgjord gen i växten eller djuret, en gen som beskriver en RNA-molekyl med just en sådan ordningsföljd av bokstäver att den kan binda till RNA-molekylen från den gen man vill stänga av. En sådan RNA-molekyl kallas för antisens-RNA. Den binder då till det budbärar-RNA som bildas från genen, och hindrar ribosomerna från att använda detta budbärar-RNA. Därmed kan inga proteiner bildas från genen. Genen har stängts av.



Rena DNA hemma i köket?

1. Köp några strömmingar på våren då fiskarna leker.
Se till att du får hanar.
2. Sprätta upp buken och ta ut mjölken ur fiskens buk.
3. Ta ungefär en halv mjölke, lägg i en mortel och krossa i lite vatten.
4. Sila genom en tesil ner i ett högt glas.
5. Droppa i 5 droppar diskmedel och rör om.
6. Håll i 1/2 dl mättad saltlösning, det vill säga saltlösning där du inte kan få mer salt att lösa sig, hur mycket du än rör.
7. Sätt ner en sked med långt skaft i glaset.
Håll försiktigt ner 1 dl kall T-röd längs skaftet i glaset.
8. Rör försiktigt med skedens skaft i glaset.
De trådar som då rullas upp på skaftet är tusentals DNA-molekyler som ligger vid varandra och bildar en tråd.

Hur fungerar detta?

- Du måste ha hanar eftersom deras mjölke (som motsvarar människans spermier) i stort sett bara innehåller en cellkärna med massor av DNA. I honornas rom är cellkärnorna bara en liten del av cellerna. Där är DNAt mycket mer utspätt.
- I morteln och tesilen får du bort hinnor som omger cellerna.
- Diskmedel slår sönder cellmembranet och membranet kring cellkärnan. Nu kommer DNA ut ur cellerna. Vätskan blir trögflytande, eftersom de långa DNA-molekylerna inte längre är hopplindade inne i cellerna utan nu bildar en gelé i vattnet.
- Men DNA-molekylerna är delvis upplindade på proteiner. Genom att hålla på salt tränger man bort proteinerna från DNAt. DNA-molekylerna blir då ännu mer utsträckta och lösningen ännu trögare.
- Alkohol får vattnet att tränga undan från DNAt, och man kan därför linda upp DNA-molekyler på skedskaftet.

Att kartlägga människans DNA

Idag har man kartlagt hela människans genom, det vill säga hela hennes uppsättning av arvsanlag. Vi vet därmed ordningsföljden av DNA-bokstäverna A, T, G och C längs var och en av människans kromosomer, och vi vet också ungefär var på dessa kromosomer det finns gener, beskrivningar av proteiner. Detta arbete utfördes under 1990-talet inom något som kallades det humana genomprojektet, vilket förkortades HUGO. Men varför har man kartlagt arvsanlagen? Och hur har man gjort det?

Helhetsbild av människokroppen



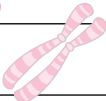
Genforskningen var tidigare en vetenskap som studerade delar. Man hittade ett protein, som man trodde hade en viktig roll, och studerade detta protein i detalj. Man hittade dess gen och gjorde en massa experiment med den. Genom att studera delarna fick man mängder med fantastisk kunskap om hur molekylerna i vår kropp fungerar.

Men kunskapen om delarna skymde ibland förståelsen för helheten. Många gånger hade forskare studerat en gen och hittat mängder med spännande egenskaper hos genen och dess protein i provrörsexperiment. Men när de sedan

skapade en genmodifierad mus, där just denna – som de trodde mycket viktiga – gen slagits ut, fungerade musen ändå utmärkt och var vid god hälsa. Musen klarade sig uppenbarligen bra utan detta protein, trots att det föreföll så viktigt då man studerade det lösryckt ur sitt sammanhang.

Därför har den moderna genforskningen börjat studera hela uppsättningar av gener och proteiner hos olika arter. Man vill försöka få en helhetsbild av hur olika levande varelser fungerar på molekylernas nivå, vad varje protein gör och hur proteinerna samarbetar med varandra. Man vill förstå hur detta samarbete får de olika livsformerna att leva och fungera.

Första steget i en sådan undersökning av människan är att bestämma hela hennes DNA-sekvens, det vill säga ordningsföljden av DNA-bokstäver på alla människans kromosomer. Den dag då man lyckades sekvensbestämma den sista mänskliga kromosomen är därför historisk, på samma sätt som den dag den sista stora vita fläcken på världskartan kunde fyllas i. Man kunde inte i förväg förutsäga exakt vilka konsekvenserna skulle bli av mänsklighetens öka-

Metod	DNA, storlek		
Direkt sekvensbestämning	500 baspar	gen	
Shotgun	1 000 000 baspar	bakteriegenom	
Kromosomkarta, modifierad shotgun	250 000 000 baspar	människokromosom	

de kunskaper i geografi. Men följderna blev enorma. På samma sätt kan vi inte i förväg veta vilken ny kunskap som kan komma ur genomforskningen, och inte heller vilka de praktiska tillämpningarna blir. De ökade kunskaperna leder troligen till dramatiskt förbättrade möjligheter att förutsäga, förebygga och behandla olika sjukdomar. Men det finns säkert många andra spännande konsekvenser, som vi idag inte ens kan gissa.

Utforska genom

Att bestämma DNA-sekvensen hos hela genom är tekniskt komplicerat. Det beror på att de metoder som används för att läsa (sekvensbestämning) DNA bara klarar av att läsa 400-500 DNA-bokstäver åt gången. Ska man bestämma sekvensen hos längre DNA-molekyler måste dessa klippas isär i mindre delar, som läses var och en för sig. De sekvenser

man då erhåller måste sedan pusslas ihop med varandra för att man ska få reda på den ursprungliga molekylens DNA-sekvens.

När man studerat enstaka gener, som oftast bara är några hundra eller några tusen baspar (DNA-bokstäver) långa, har detta inte ställt till med några större problem. Men hela genom är betydligt värre än så. De består ofta av flera miljoner eller miljarder bokstäver. Och då uppstår problem. Renar man fram DNA från en människa eller en bakterie, slår sönder detta DNA i mindre bitar och fogar in var bit i en plasmid, får man en soppa av plasmider. Blandningen innehåller visserligen alla DNA-sekvenser som fanns i människan eller bakterien, men man har ingen aning om vilken plasmid som innehåller vilken bit av genomet. Att börja läsa DNAt på sådana DNA-bitar är som att försöka läsa Strind-

bergs samlade verk, där man tagit en hel upplaga av bokserien, rivit ut alla blad ur böckerna, dolt sidnumreringen och blandat alla sidorna i en stor container.

För att kunna studera hela genom räcker det alltså inte med att kunna sekvensbestämma DNA. Man måste också ha metoder som gör det möjligt att pussla ihop DNA-sekvenserna med varandra, och ta reda på ungefär var i genomet de befinner sig. För bakterier, vars genom bara innehåller några miljoner baspar, kan detta problem numera lösas med hjälp av kraftfulla datorer. Man kallar den teknik som då användes för "shotgun-metoden". Hos växter, svampar och djur kan genomen vara ytterligare tusen gånger så stora. För att sekvensbestämma och kartlägga dessa behövs mer avancerade metoder. De två som idag finns kallas "sekvensbestämning med kromosomkartor" respektive "modifierad shotgun-metod".

Bestämma korta DNA-sekvenser

Att bestämma ordningsföljden av DNA-bokstäver på kortare (några hundra bokstäver långa) DNA-molekyler är inte svårt rent praktiskt. Däremot är tekniken lite komplicerad att förklara. Den beskrivning som nu följer kan därför vara jobbig att följa. Men det går bra att hoppa över den, och fortsätta med att läsa nästa avsnitt i kapitlet.

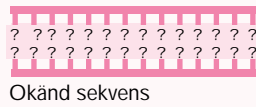
Den DNA-bit som ska sekvensbestämmas måste finnas i väldigt många exemplar. Först säras strängarna på DNA-molekylerna, så att bitarna blir enkel-

strängade. Sedan fördelas bitarna i fyra provrör. Till dessa provrör hålls enzymer som kan kopiera DNA och lösa DNA-byggstenar (bokstäverna A, T, G och C, varav en är märkt med ett radioaktivt ämne). Till varje provrör tillsätts också en liten mängd av en modifierad form av DNA-byggstenar. De kan byggas in i en DNA-kedja som håller på att förlängas, men efter dem kan inte någon ny DNA-byggsten kopplas på. Då en sådan modifierad DNA-byggsten fogas in i en växande ny kedja kommer kedjan inte att förlängas mer, den avslutas. Man kan därför kalla dessa modifierade byggstenar för "stopp"-byggstenar. I varje provrör tillsätts en liten mängd av en sådan byggsten, så att ett provrör får modifierat A, ett annat modifierat T och så vidare.

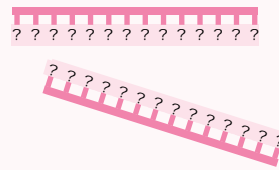
Låt oss nu tänka på det provrör som innehåller modifierat T. Varje gång ett T ska fogas till den växande DNA-kedjan kan antingen ett vanligt T, som det finns mycket av, fogas in. Kedjan fortsätter då att växa. Eller så infogas ett modifierat T, och kedjan slutar växa. Eftersom vi hade många enkelsträngade kedjor, som kopieringsenzymerna börjat arbeta med, kommer det på varje plats, där det borde fogas in ett T, vara några kedjor som får ett modifierat T. Kedjan upphör då att växa. När kopieringsenzymerna hållit på ett tag kommer provröret innehålla ett mycket stort antal nya DNA-kedjor av olika längd. Kedjornas längd visar hur långt in på DNA-kedjan de olika T-na befinner sig. Motsvarande sak har

Sekvensbestämma korta DNA-bitar

Genteknikern har en bit arvs massa och vill ta reda på i vilken ordning baserna (bokstäverna) sitter på molekylens.



DNA-molekylens två strängar säras från varandra.



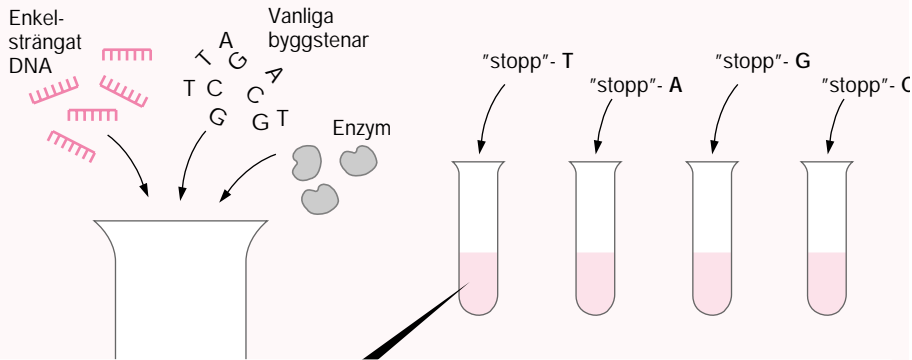
hänt i de andra provrören, som innehåller var sin av de tre andra "stopp"-bokstäverna.

Därefter separerar man de nybildade DNA-strängarna i de fyra provrören invid varandra efter storlek med gelelektrofores. Genom att jämföra storleken på de olika DNA-kedjor, som avslutats med de baserna A, T G och C, kan man räkna ut i vilken ordning de olika baserna förekommer på den ursprungliga DNA-molekylens.

Denna metod fungerar för att bestämma sekvensen hos DNA-bitar som är upp till 400–500 bokstäver långa. För att bestämma sekvensen på längre DNA-molekyler måste molekylerna delas upp i mindre bitar som sekvensbestäms var för sig. Är DNA-molekylens inte längre än några miljoner baspar lång, kan detta göras med något som kallas shotgunmetoden.

1. Först håller man en blandning av enkelsträngat DNA, kopieringsenzym samt en stor mängd vanliga byggstenar i fyra provrör.

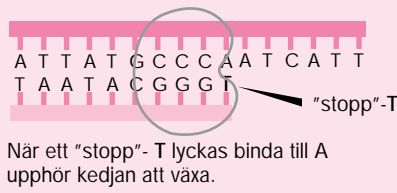
2. Sedan tillsätter man en liten mängd "stopp"-byggstenar, en sort i vardera provrör.



3. Vid rätt temperatur kommer de lösa byggstenarna (vanliga A, T, G och C samt "stopp"-varianterna) sträva efter att binda till varandra: A alltid till T och G alltid till C.

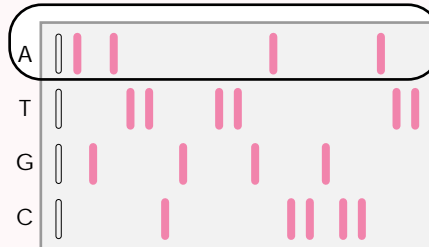


I provröret med "stopp"-T konkurrerar den vanliga byggstenen T med "stopp"-T om att fogas samman med byggstenen A i det enkelsträngade DNA:t.



4. Innehållet i respektive provrör separeras till slut efter storlek på en gel. DNA-bitarnas längd är ett mått på var det har suttit ett A.

DNA från provrör med "stopp"-T där DNA-syntesen slutar vid bokstaven A.

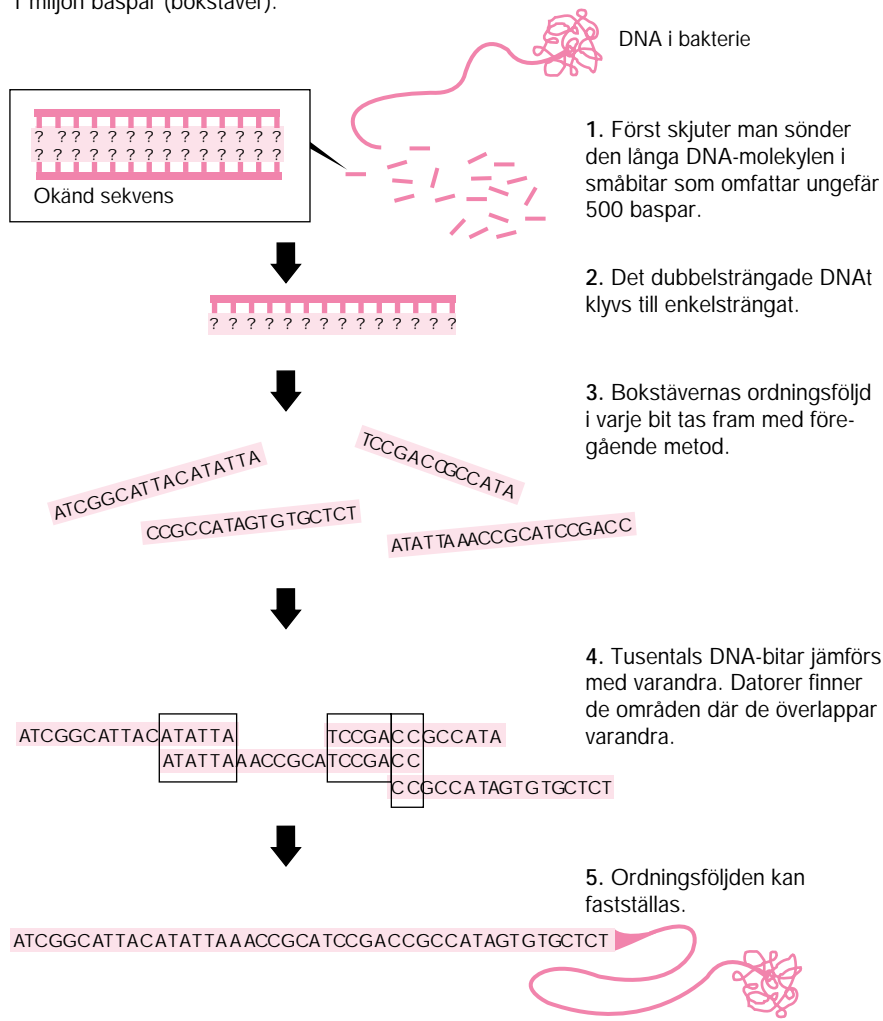


5. Man kan då räkna ut i vilken ordning de olika baserna förekommer på den ursprungliga DNA-molekylen.

Erhållen DNA-sekvens: AGATTCGCTTGACCGCCATT

Principen för shotgun-metoden

Denna metod är lämplig för att sekvensbestämna genom som omfattar cirka 1 miljon baspar (bokstäver).



Hoppussling med shotgun-metoden

Problemet med att klippa upp ett genom i småbitar och sekvensbestämma dem en och en är följande. Då man klippt sönder genomet och klistrat in de olika DNA-bitarna i plasmider, har man ingen aning om var i genomet en viss DNA-bit hör hemma. Man vet alltså inte, när man läser bokstäverna i en bit DNA, var i genomet denna bit befinner sig.

Om de DNA-molekyler man vill sekvensbestämma bara är några miljoner bokstäver långa kan man lösa detta med en teknik som kallas shotgun-metoden. Man struntar då helt enkelt i var på kromosomen den DNA-bit ligger, som man sekvensbestämmer.

Man ser istället till att sekvensbestämma så många DNA-bitar, att man kan vara säker på, att alla delar av DNA-molekylen kommer med. Sedan matar man in alla DNA-sekvenserna i en dator och låter datorn hitta de ställen där sekvenserna överlappar varandra.

På detta sätt pusslas de korta DNA-sekvenser som lästs ihop, till sekvensen hos den långa DNA-molekyl som skulle analyseras.

Denna metod fungerar för DNA-molekyler på några miljoner baspar och har använts för att bestämma DNA-sekvensen hos en rad bakterier, vars arvsanlag ofta har just den storleken. Men tekniken är inte tillräcklig för att kunna sekvensbestämma hela det mänskliga genomet, som består av över tre miljarder DNA-bokstäver.

Kromosomkartor

För att kunna sekvensbestämma hela människans arvs massa formades ett världsomfattande samarbete mellan forskare i det humana genomprojektet (HUGO-projektet). Forskarna bestämde sig på ett tidigt stadium för att sekvensbestämma människans kromosomer en i taget. För att kunna orientera sig på kromosomerna började de med att skapa kartor över kromosomerna. Kända gener, hypervariabla tandemrepeats och andra lokalisierbara ställen prickades in på kartor, tills man fått kartor med mindre än en miljon bokstäver mellan de olika ställen, som var markerade på kartan.

Därefter tog man ett stort antal av den kromosom man hade en karta över och slog den i mindre bitar, som i genomsnitt var någon miljon bokstäver långa. Man isolerade ett stort antal av DNA-bitarna och undersökte om några av de ställen, som var markerade på kartan, fanns där. På så sätt kunde man plocka ut ett litet antal DNA-bitar, som tillsammans täckte hela kromosomen. Dessa sekvensbestämdes sedan var och en för sig med shotgun metoden. Med hjälp av kartorna kunde sedan de runt en miljon bokstäver långa DNA-sekvenser fogas ihop med varandra på rätt sätt.

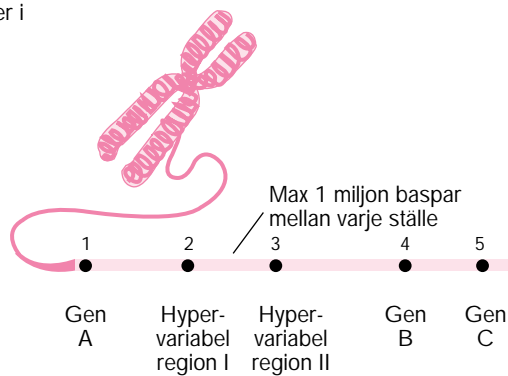
Huvuddelen av den tid HUGO-projektet varade, gick åt att skapa genkartor som var tillräckligt detaljerade, att utveckla redskap – maskiner som snabbt och automatiskt kan läsa DNA-sekvenser – och datorer som kan hantera de

Sekvensbestämna stora genom

Arbetet med att sekvensera stora genom, till exempel människans arvs massa, sker i flera steg.

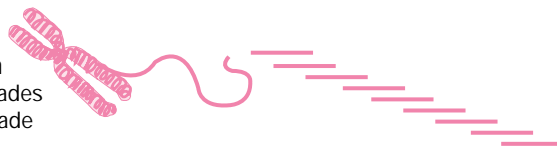
1. Kromosomkarta

Man upprättade en kromosomkarta genom att lokalisera kända gener och andra kända platser, hypervariabla regioner, på den kromosom man vill sekvensbestämna.



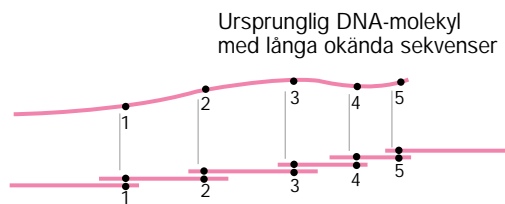
2. Dela upp kromosomen

Samma kromosom sönderdelades i mindre bitar. Varje bit omfattade ungefär en miljon baspar.



3. Urval

Man undersökte vilka bitar som innehöll olika ställen markerade på kromosomkartan. Sedan valdes bitar ut som man visste att hela kromosomen täckte tillsammans.



4. Shotgun

Bokstävernas ordningsföljd i varje bit bestämdes med shotgun-metoden.

ATCGGCATTACATATTA
TCCGACCGCCATA

5. Kromosomens sekvens

Bokstävernas ordningsföljd kunde fastställas i hela kromosomen.

ATCCGACCGCCATAGTGTGCTCTATCGGCATTACATATTA
CATAGTGTGCTCTATCGGCATTACATATTAACCGCATCCGACCGC
ATCGGCATTACATATTAACCGCATCCGACCGCCATAGTGTGCTCTG

enorma mängder information som ansamlades. Själva arbetet med den mekaniska sekvenseringen av DNA tog bara en mindre andel av tiden.

Modifierad shotgun-metod

Detta "officiella" HUGO-projekt blev dock i slutfasen av sitt arbete utmanat av ett privat företag, Celera, som hade föresatt sig att komma först med att bestämma människans DNA-sekvens.

Detta företag hade utvecklat en ny metod för att pussla ihop korta sekvenser med varandra. De tog ett stort antal människoceller, renade fram DNA från dem och slog sönder DNAt i kortare delar. Man tog sedan ett stort antal bitar som var ungefär 2 000 bokstäver långa, och ett något mindre antal bitar som var ungefär 10 000 bokstäver långa. Man

mätte hur långa var och en av dessa bitar var, och bestämde sekvensen hos de 500 bokstäverna i början och i slutet av biten. Därigenom fick man kunskap om ett stort antal DNA-sekvenser, ungefär 500 bokstäver långa, som hängde ihop två och två. Dessutom kände man till avståndet mellan dem. Med hjälp av denna information blev det möjligt för datorer att foga ihop sekvenserna med varandra med någorlunda god säkerhet. De sekvenser som på detta sätt växte fram kontrollerades sedan mot de kromosomkartor, som det officiella HUGO-projektet tagit fram. Därmed kunde misstag och felaktigheter rättas till.

Denna så kallade modifierade shotgun-metod visade sig vara så framgångsrik att även det officiella HUGO-projektet gick över till den i slutet av sitt arbete.

Vad gör alla de gener man hittat?

Att bestämma ordningsföljden av DNA-bokstäver i hela människans arvs massa är bara det första steget i den moderna genomforskningen. För att all den information man skaffat sig ska få någon mening måste man också ta reda på vad alla de olika proteiner gör, som beskrivs av de gener man hittat.

Sekvensjämförelser:

Det första en forskare gör, då hon eller han vill försöka förstå vilken uppgift en dittills okänd gen har, är att låta en dator jämföra genens sekvens med alla andra kända DNA-sekvenser. Om man då upptäcker att genen påminner

mycket om en tidigare känd gen, är det troligt att de proteiner generna beskriver har liknande funktioner. Båda proteinerna kan till exempel vara enzymer och katalysera samma typ av kemiska reaktion. Det betyder dock inte att enzymerna nödvändigtvis är inblandade i samma biologiska processer. Det ena enzymet kanske klyver ett ämne i ämnesomsättningen, medan det andra utför en liknande kemisk reaktion i en signalkedja som reglerar när en cell ska dela sig.

Slå ut genen:

Då forskare studerat arvsanlagen hos olika livsformer finner de stora likheter. Människans DNA är till över 98 procent identiskt med schimpansens. De flesta gener som finns hos möss finns också hos människor, och ungefär hälften av jästsvampens gener delar den med både människor och andra djur. Detta är naturligtvis intressant då man funderar över människans roll och plats i naturen. Men det är också till oerhörd nytta för de forskare, som försöker studera

vad människans alla gener har för funktion.

Funderar man över vad en viss gen har för funktion kan man nämligen göra en genmodifierad jästsvamp, bananfluga eller mus, där genen i fråga är utslagen. Genom att se, om något fungerar konstigt hos de jästceller,flugor eller möss som då bildas, kan man få ledtrådar till genens funktion. Om exempelvis en mus, som saknar en viss gen, blir blind är det rimligt att anta att det protein genen beskriver är inblandat i seendet.

Studera var i kroppen proteinet finns:

Man kan även få ledtrådar om vilka roller olika proteiner har genom att studera i vilka delar av kroppen de före-

kommer och i vilka celltyper. Man har därför under de senaste åren utvecklat metoder för att snabbt undersöka i vilka celltyper och organ en viss gen används. Finner man då en grupp gener, som används i precis samma kombination av celler och organ, är det rimligt att tänka sig att dessa gener kan vara inblandade i samma typ av uppgifter.

Jämföra olika arter:

Eftersom man nu i snabb takt bestämmer hela DNA-sekvensen även för ett antal andra djur och växter, kan man dessutom få idéer om vilka roller olika gener kan ha bara genom att studera i vilka levande varelser dessa gener finns och i vilka de inte förekommer.

Genetiska fingeravtryck och sjukdomsanalyser

Analysen med genteknik används idag för att svara på en rad olika frågor. Det kan gälla om en människa eller ett foster bär genen för en ärftlig sjukdom, ifall en intorkad blodfläck kommer från en misstänkt brottsling, ifall man riskerar svåra biverkningar av ett läkemedel, hur nära släkt vi är med neandertalarna eller hur otrogna flugsnappare är

PCR – ett sätt att masskopiera DNA

En metod, som spelar en viktig roll i de flesta sådana DNA-analyser, kallas PCR, (Polymerase Chain Reaction). Den gör det möjligt att skapa många kopior av en bit DNA som bara finns i ytterst små mängder i ett prov. Det räcker i princip med att det finns ett enda exemplar av det DNA som ska mångfaldigas. Det är denna teknik som gör det möjligt att analysera DNA som återvunnits från saliv på baksidan av ett frimärke, eller att analysera DNA från benrester av neandertalare och mammutar.

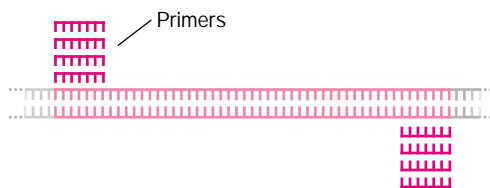
Metoden kräver dessutom att man vet sekvensen hos ungefär 20 baser i början och slutet av det DNA som ska mångfaldigas. Dessa korta DNA-bitar (som kallas primers) låter man tillverka i stor skala och håller i provet. Genom att se-

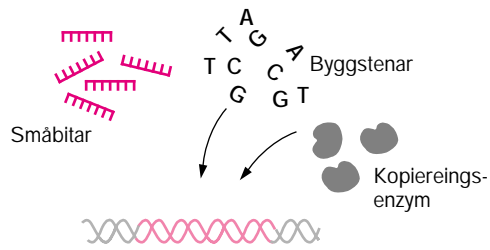
dan behandla provet på rätt sätt kan man få dessa små bitar att förlängas till kopior av det DNA man ville mångfaldiga. Hur detta går till i detalj visas i bilden invid.

PCR

För att utföra masskopiering av DNA med PCR måste man veta ordningsföljden på ungefär 20 bokstäver i början och slutet av den DNA-sträcka man vill mångfaldiga.

1. Man låter en syntesmaskin tillverka ett stort antal av de kända småbitarna i början och slutet av provet som ska analyseras. Dessa kallas primers.





2. Småbitarna blandas med det prov man ska analysera. Man håller också i lösa byggstenar och en värmetålig variant av ett enzym som kan kopiera DNA.



3. Temperaturen höjs och basparen mellan de två strängarna i DNA-molekylen släpper. DNA:t blir enkelsträngat.



4. Därefter sänker man åter temperaturen till precis den grad då DNA-molekylernas baspar börjar fästa sig vid varandra igen. Det visar sig då att småbitarna man tillverkat kommer att fastna på de långa strängarna först, och hindrar därmed de långa att binda till varandra.



5. Temperaturen sänks ytterligare och kopieringsenzymet börjar arbeta. Enzymet tar tag i ena änden av de små bitarna och börjar förlänga dem.



6. Den del av DNA-molekylen som skulle mångfaldigas finns nu i två exemplar.



7. Processen upprepas och för varje steg fördubblas antalet exemplar av den sökta DNA-biten.



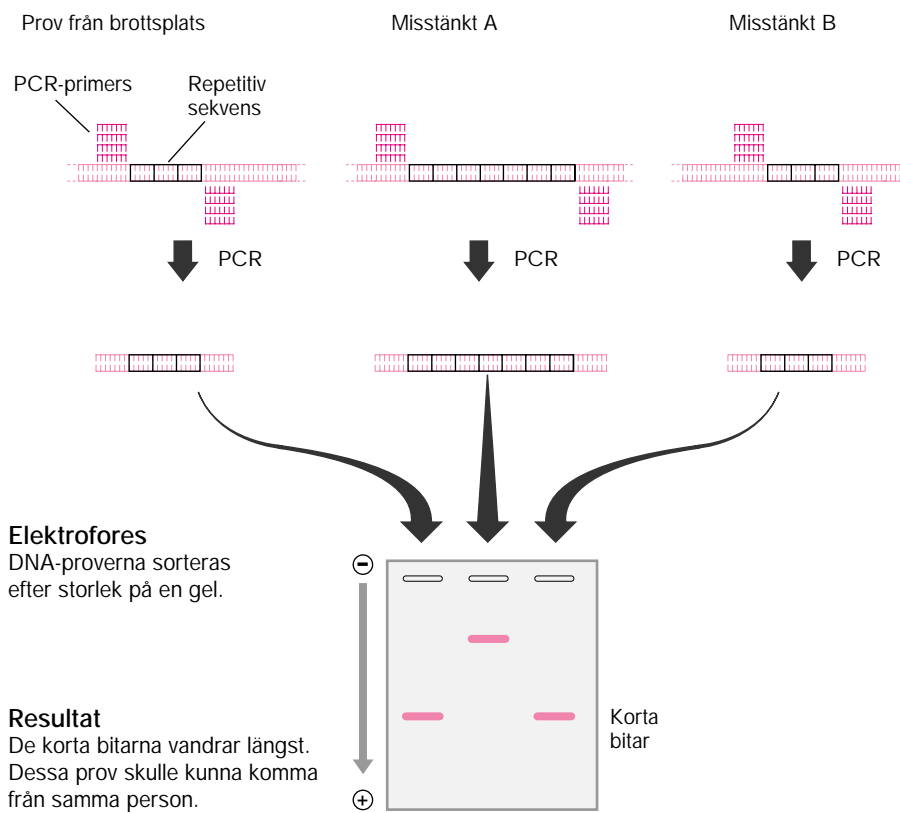
Genetiska fingeravtryck

Då man tar ett genetiskt fingeravtryck undersöker man ett antal ställen på DNA-molekylerna där en kort DNA-sekvens upprepas gång på gång, liksom en grammofonskiva som hakat upp sig. Antalet upprepningar varierar hos olika människor. Analyserar man tillräckligt många sådana så kallade hypervariabla

ställen med repetitiva sekvenser, kan man nästan säkert avgöra om två DNA-prover kommer från samma människa eller ej. Dessa analyser görs med PCR. Man väljer då de 20 baspar korta enkelsträngade snuttarna så, att de ligger precis före och efter området med den repetitiva sekvensen. Därmed kommer den DNA-bit som mångfaldigas att bli olika

Identifiering med genetiska fingeravtryck

Med hjälp av PCR-metoden analyseras det DNA-prov man tagit på brottsplatsen och prov från de misstänkta.



lång, beroende på hur många enheter man har av den repetitiva sekvensen. Om man låter de DNA-bitar som mångfaldigas i testerna vandra bredvid varandra på en elektroforesgel, kan man enkelt se om de DNA-bitar som då mångfaldigats blivit lika långa eller ej. Idag görs detta med tio olika ställen med repetitiva sekvenser. Sannolikheten för att två personer av en ren slump skulle ha samma antal av dessa sekvenser på bägge kromosomerna på alla tio ställena är mycket liten.

Analys av gen för anemi

En rad ärftliga sjukdomar beror på att det är något fel på genen för ett viktigt protein. Antingen är genen utslagen, så att man inte kan bilda något av det viktiga proteinet, eller så är den förändrad så att proteinet börjar bete sig egendomligt i kroppen.

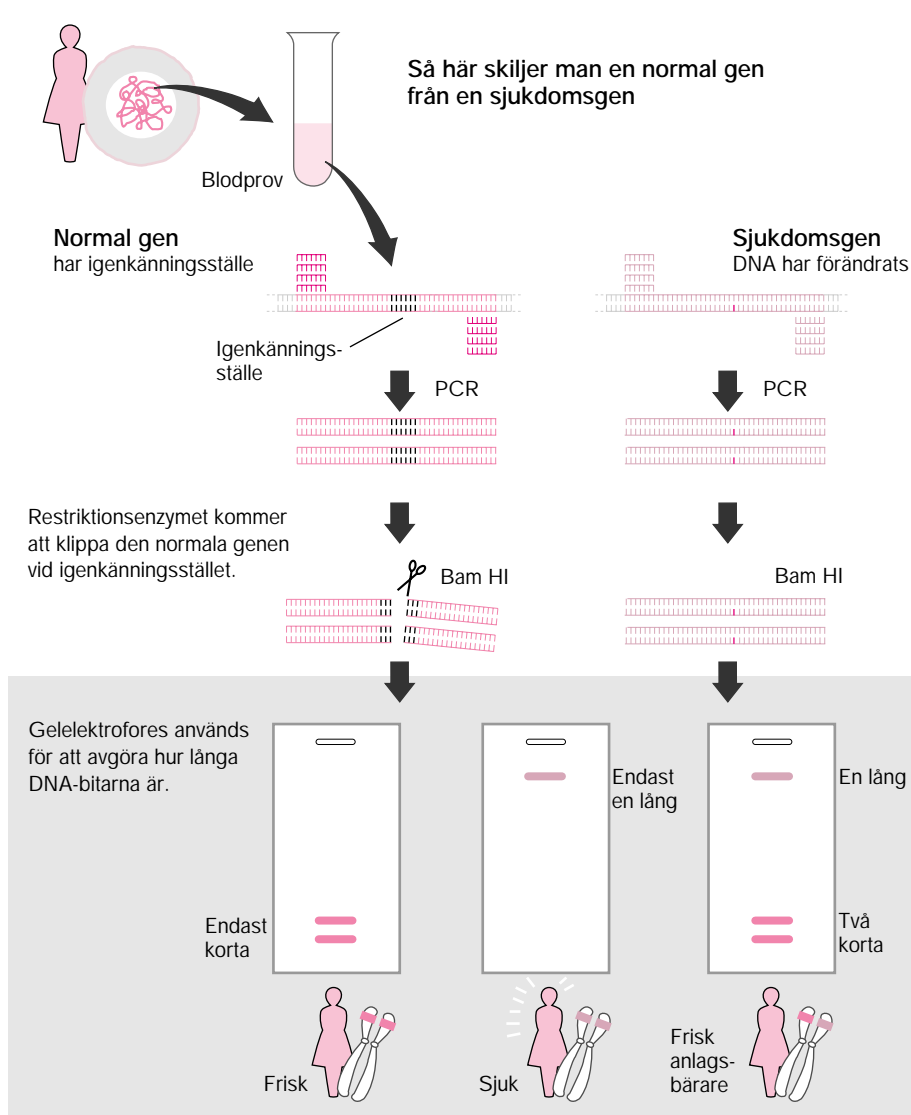
En sjukdom av det senare slaget kallas sickle cell-anemi. Man har då en liten förändring i genen för hemoglobin, ett protein som finns i stora mängder i röda blodkroppar där det transporterar syre. Har man denna förändrade gen på ena kromosomen blir hälften av hemoglobinmolekylerna normala och hälften något annorlunda än normalt. Det leder inte till något problem för människan. Tvärt om kan förändringen vara till nytta. Den annorlunda hemoglobinmolekylen gör det omöjligt för malaria-parasiter att överleva i blodkroppen. Denna genvariant på ena kromosomen gör därmed sin bärare okänslig för malaria.

Har man den annorlunda genvarianten på bägge kromosomerna får man däremot problem. Alla hemoglobin-molekyler blir då förändrade, och de lägger sig i långa travar inne i blodkropparna. Dessa sträcks därmed ut, och får en form som påminner om en nymåne eller den skära druiden Miraculix använder för att skära mistel.

Denna form på blodcellerna har gett sjukdomen dess engelska namn, ty sickle är det engelska ordet för skära. De uttöjda blodkroppar klarar inte av att göra sitt jobb och kletar lätt igen trånga blodkärl. Därmed är sjukdomen för de flesta dödlig, även om åldern för sjukdomsutbrott varierar kraftigt från individ till individ.

Skillnaden mellan den normala och förändrade genen för hemoglobin är en enda DNA-bokstav. Bokstaven sitter mycket lägligt till (ur en genteknikers synvinkel), nämligen mitt inne i en sekvens som restriktionsenzymet BamHI känner igen. Detta gör det är mycket lätt att designa ett gentest för att avgöra om man bär på sjukdomsgenen eller ej.

Man tar ett prov med några celler från den som ska testas. Med PCR skapar man sedan ett stort antal kopior av området kring detta igenkänningsställe. Det DNA som skapades genom PCR-reaktionen lägger man i ett provrör tillsammans med restriktionsenzymet. Alla DNA-molekyler från en normal gen kommer nu att klippas av och alla från en förändrad gen kommer att förbli oberörda.



Sedan använder man gelelektrofores för att avgöra hur stora DNA-bitarna i provet är. Om provet innehåller två korta DNA-bitar har man normala gener. Om det bara innehåller en lång DNA-bit har

man sjukdoms gen på bägge kromosomerna. Finns där både en lång och två korta DNA-bitar har man den normala genen på ena kromosomen och den förändrade på andra kromosomen.