

Teorikompendium - Biotech Academy Camp 2024

Velkommen til Biotech Academy Camp 2024!

I år kommer Biotech Academy Camp til at handle om mikrobiologi med særligt fokus på svampe. Du vil i dette kompendie blive introduceret til nødvendige baggrundsviden, som vil give dig et overblik over de bioteknologiske redskaber, som vi kommer til at bruge på campen. Der vil flere gange i kompendiet blive henvist til Biostriben. Biostriben er en del af Biotech Academys hjemmeside, og her finder du en masse gode videoer om de emner, der bliver gennemgået i dette kompendie. Vi anbefaler, at du både læser teorikompendiet, laboratoriekompendiet samt ser videoerne på biostriben, som en del af din forberedelse før du møder op.

Vi forventer ikke, at du husker alt, hvad der står i kompendiet, men at du læser op, hvor du har behov. Vi kommer til at gennemgå teori på campen, men vi har ikke tid til at gennemgå alt, hvilket er hvorfor vi beder alle deltagere om at forberede sig på forhånd. Man må meget gerne skrive spørgsmål ned, hvis der er noget som er svært, eller ikke helt klart i teksten. Du får rig mulighed for at spørge ind til det, når vi mødes.

God læselyst! Vi glæder os til at se dig.

Bedste hilsner fra Marc og Victoria

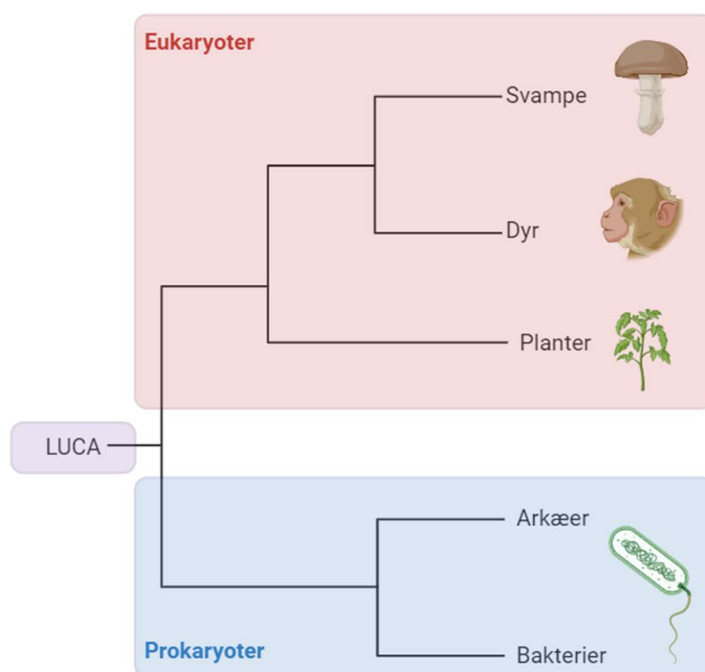
Indholdsfortegnelse

| | |
|--|----|
| Fungi | 3 |
| Opbygning | 3 |
| Symbiose og patogenese | 4 |
| Reproduktion..... | 4 |
| Overordnede grupper af svampe | 5 |
| Microsporidia..... | 5 |
| Chytridiomycota | 5 |
| Mucoromycota | 5 |
| Glomeromycota..... | 6 |
| Ascomycota..... | 6 |
| Basidiomycota..... | 6 |
| Det genetiske udtryk | 6 |
| DNA..... | 7 |
| RNA..... | 8 |
| Proteiner..... | 8 |
| Det Centrale Dogme | 9 |
| Transskription: Fra DNA til RNA | 9 |
| Initiering..... | 9 |
| Elongering..... | 10 |
| Terminering..... | 10 |
| Translation: Fra mRNA til polypeptid..... | 11 |
| Ribosomal initiering..... | 12 |
| Ribosomal elongering | 12 |
| Ribosomal terminering..... | 12 |
| Vækstmedie..... | 13 |
| Selektion af mikrober..... | 13 |
| Metoder i laboratoriet | 14 |
| Polymerase Chain Reaction (PCR)..... | 14 |
| Valg af primere - kopiernes start og stop..... | 14 |
| Faserne i en PCR-cyklus | 15 |
| Tissue PCR..... | 16 |
| Gelelektroforese | 16 |
| Opsæt en gel..... | 16 |
| Gen sekventering | 17 |

Fungi

Se evt. s. 635-642 i Brocks biology of microorganisms (Den bog i får udleveret)

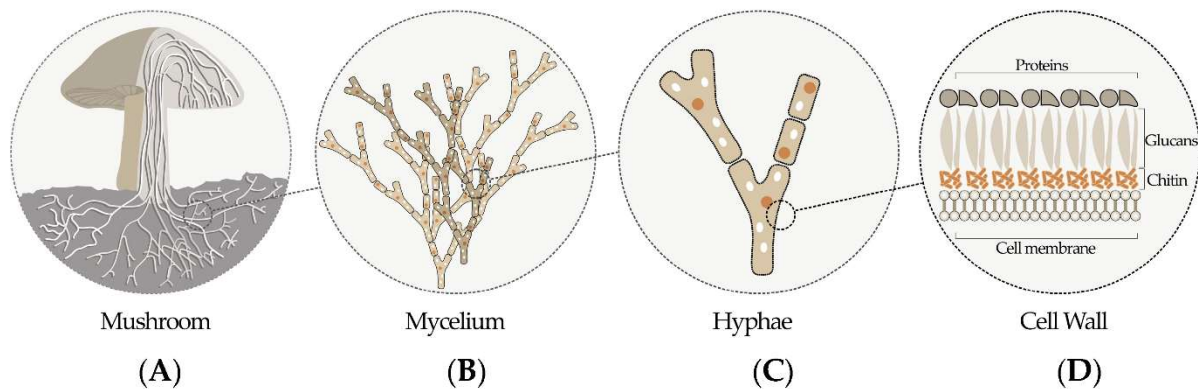
Svampe er eukaryote organismer, der ikke kan klassificeres som hverken planter eller dyr, men de er tættere beslægtede med dyreceller end andre eukaryoter (**Figur 1**). De udfører ikke fotosyntese som planteceller, dog har de cellevægge ligesom planteceller, men består hovedsageligt af kitin og ikke cellulose. Der findes et utal af svampearter, med hver deres unikke egenskaber. De fleste svampe er mikroskopiske og lever hovedsageligt i jorden, hvor de nedbryder og optager næringsstoffer fra dødt organisk materiale. Udover dette har svampe mange andre funktioner: Nogle arter kan forårsage sygdomme hos planter, dyr og mennesker, mens andre danner symbioser med planter og hjælper dem med at optage mineraler fra jorden. Desuden bruges nogle svampe til at producere antibiotika eller bidrage til fermenteringsprocesser. Selvom mange svampearter er blevet beskrevet, viser DNA-analyser, at over 90% af svampene endnu ikke blevet opdaget og undersøgt i laboratoriet, der er derfor et stort potentiale gemt i jorden.



Figur 1: Fylogenetisk træ. LUCA står for "Last Universal Common Ancestor". Den første forgrening opdeler eukaryoter og prokaryoter. Prokaryoter bliver yderligere opdelt i Arkæer og Bakterier. Ved eukaryoter fraskilles planter fra de andre på et tidligere stadie end dyreceller og svampe udvikler sig i hver deres retning, hvorfor svampe er genetisk tættere beslægtet med dyr. Illustration er genereret i Biorender.

Opbygning

De fleste svampe er flercellede organismer, som danner et netværk af trådformede strukturer kaldet hyfer. Disse hyfer vokser sammen og danner et synligt mycelium, hvorfra sporer produceres og spredes til nye levesteder (**Figur 2**). Nogle svampe danner store frugtlegemer, som fx kuglesvampe, der frigiver millioner af sporer. Du kender formentlig en række spiselige svampe med såkaldte frugtlegemer, herunder champignoner og kantareller. Selve svampen, som findes under jorden, er dog meget større, nogle kan endda strække sig over flere kvadratkilometer. Andre svampe, som gær, vokser som enkeltceller. Svampecellevægge består primært af kitin og andre polysakkarider, dette giver dem deres stærke og seje struktur. Svampe er desuden i stand til at gro på meget diverse overflader, herunder, træflis, tapet og endda beton.



Figur 2: Opbygning af svampe. (A) svampestruktur, (B) Mycelium, (C) hyfer, og (D) enkelt hyfecelle. Figur er hentet fra følgende artikel: Mohseni, A.; Vieira, F.R.; Pecchia, J.A.; Gürsoy, B. Three-Dimensional Printing of Living Mycelium-Based Composites: Material Compositions, Workflows, and Ways to Mitigate Contamination. *Biomimetics* 2023, 8, 257. <https://doi.org/10.3390/biomimetics8020257>

Symbiose og patogenese

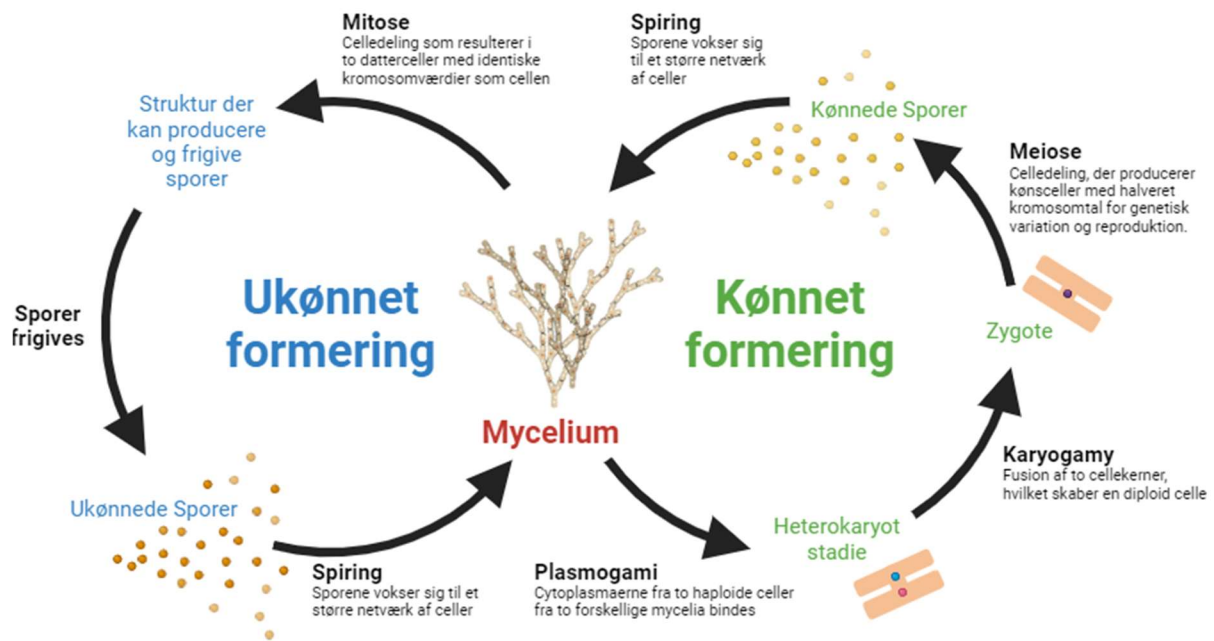
Svampe kan både have en positiv og negativ effect på planter og dyr, afhængigt af den specifikke svamps egenskaber. Mange planter er afhængige af svampe for at optage næringsstoffer fra jorden gennem symbiotiske forhold kaldet mykorrhiza. Der findes to typer mykorrhiza:

- Ektomykorrhiza, som er et typisk symbiotisk forhold mellem basidiomyceter og træers rødder
- Endomykorrhiza, som er et forhold mellem glomeromyceter og ikke-træagtige planter.

Svampe kan også danne symbiose med cyanobakterier eller alger og danne lav, som ofte ses på træer og klipper. Dog er ikke alle forhold mellem svampe og andre organismer fordelagtige for begge parter, nogle svampe kan nemlig forårsage sygdomme hos både planter og dyr. Plantesygdomme forårsaget af svampe kan medføre store tab af afgrøder, mens svampeinfektioner hos mennesker, kaldet mykoser, kan variere fra mindre hudirritationer som fodsvamp til livstruende systemiske infektioner som pneumoni.

Reproduktion

Svampe kan formere sig enten kønnet eller ukønnet. Nogle svampe kan også formere sig på begge måder, her er det levebetingelserne der typisk vil afgøre om det sker på den ene eller anden måde. Ved ukønnet forering dannes svampe, som er identiske til den svamp som har afgivet sporene. Hvis svampen har gode levebetingelser, vil den lave ukønnet forering, fordi der ikke er nogen grund til at skabe genetisk variation. Under kønnet forering vil alle de svampe der dannes være forskellige fra hinanden og forskellige fra de svampe, som sporene kommer fra, ligesom et barn er forskellig fra dets forældre. Denne forering sker ofte, når svampen har dårlige levevilkår. Ved den kønnet forering forsøger svampen altså ved genetisk variation at skabe et afkom som er bedre tilpasset til miljøet. Både kønnet og ukønnet forering er illustreret i flere detaljer i **Figur 3**.



Figur 3: Overblik over kønnet og ukønnet formering hos svampe. Illustration er genereret i Biorender.

Overordnede grupper af svampe

Der findes som mange grupper af svampe, her gennemgås nogle af de overordnede grupper, for at give et overblik over hvor forskellige svampe er og hvilke egenskaber de har.

Microsporidia

Microsporidia er små, encellede parasitter på 2-5 mikrometer som ikke indeholder mitokondrier. Disse svampe kan kun overleve og formere sig inde i en vært, denne vært kan være både dyr og encellede organismer. Udenfor værten findes de som sporer, og når de nærmer sig en værtscelle, skyder de en lille tråd ind i værten og sprøjter deres indhold ind i cellen. Inde i værten formerer de sig og producerer nye sporer, som til sidst bryder ud af værtscellen for at inficere nye celler. Et eksempel på en microsporidia er *Encephalitozoon* som kan forårsage kroniske sygdomme i menneskelige organer, men ses mest hos personer med svækket immunsystem, som fx HIV/AIDS-patienter.

Chytridiomycota

Chytridiomycotas (chytrider) sporer er specielle, da de har flageller, hvilket gør dem motile. De er derfor i stand til at bevæge sig i vandmiljøer som ferskvand og fugtige jordbunde, hvilket er hvorfor de primært findes i vandige miljøer. Nogle chytrider lever frit og nedbryder organisk materiale, mens andre er parasitter i dyr, planter og encellede organismer. En chytrid, *Batrachochytrium dendrobatidis*, forårsager chytridiomycosis hos frøer, en sygdom, hvor svampen inficerer huden og forstyrrer frøens evne til at opretholde en væskebalance. Dette har ført til store fald i frøbestanden globalt, da ændringer i klimaet, har øget spredningen af denne svamp.

Mucoromycota

Mucoromycota er kendt for deres rolle i fødevarespild. Det er en gruppe svampe som er coenocytiske, hvilket betyder at deres celler har flere cellekerner. De kan derfor formere sig både kønnet og ukønnet. En velkendt Mucoromycota er *Rhizopus nigricans*, også kendt som sort skimmelsvamp på brød. I dens ukønnede fase danner den sporer, som kan spredes og starte nye kolonier. I den kønnede fase fusionerer celler fra forskellige køn, og der dannes en modstandsdygtig zygosporer, som kan overleve under barske

forhold. De fleste arter i *Rhizopus*-slægten er uskadelige og nedbryder organisk materiale. Dog kan nogle af dem forårsage alvorlige lungeinfektioner hos mennesker, hvis de indåndes i store mængder sporer, eftersom disse sporer ofte bærer på toksiske molekyler.

Glomeromycota

Glomeromycota er en mindre gruppe svampe, som danner symbiotiske forhold med planter, især i form af endomykorrhiza, hvor svampens hyfer vokser ind i plantens celler. Svampen hjælper planten med at optage fosfat fra jorden, mens den får kulhydrater fra planten. Glomeromycota har derfor været afgørende for planters kolonisering af landjorden. Denne gruppe svampe er ligesom *Mucoromycota* coenocytiske men kan udelukkende formere sig ukønnet. Den bruges ofte i landbrug til at fremme væksten af afgrøder som tomater og bønner gennem en symbiotisk gødningsmetode.

Ascomycota

Ascomycota (ascomyceter) er den største og mest varierede svampegruppe. Den indholder alt fra encellede gærarter til filamentøse skimmelsvampe. Ascomyceter findes både i vand og på land og de fleste ad svampene i denne gruppe er i stand til at udføre både kønnet og ukønnet formering.

Gærceller som *Saccharomyces* og andre encellede ascomyceter er runde eller ovale, og celledeling sker typisk ved budding, hvor en ny celle vokser ud fra den gamle. Gær er generelt større end bakterier og kan genkendes mikroskopisk på deres størrelse og indre strukturer, unikke for eukaryoter, som cellekernen. Gær trives desuden i sukkerholdige miljøer som frugter og blomster og kan vokse både aerobisk eller ved gæring (anaerob). Nogle gærarter lever i symbiose med dyr, især insekter, og nogle arter er patogene for mennesker.

Basidiomycota

Basidiomycota er en stor svampegruppe med over 30.000 beskrevne arter. Mange af dem er de svampe, vi kender som champignon og fluesvampe. Nogle er spiselige, mens andre er patogene, og forårsage sygdomme hos dyr, planter og encellede organismer.

I størstedelen af deres liv eksisterer svampe som haploide mycelier i jorden eller på rådne træer. Den seksuelle reproduktion resulterer i den synlige svamp, hvor mycelier af forskellige parringstyper smelter sammen. Det resulterende dikaryotiske mycelium (med to kerner) vokser hurtigt og danner svampens frugtlegerne, kaldet basidiokarp. Dette begynder som en lille knop under jorden, som vokser til en fuld-voksen svamp, der ses over jorden. Basidierne findes på undersiden af basidiokarpen og danner basidiosporer, som spredes med vinden til nye steder for at starte cyklussen igen.

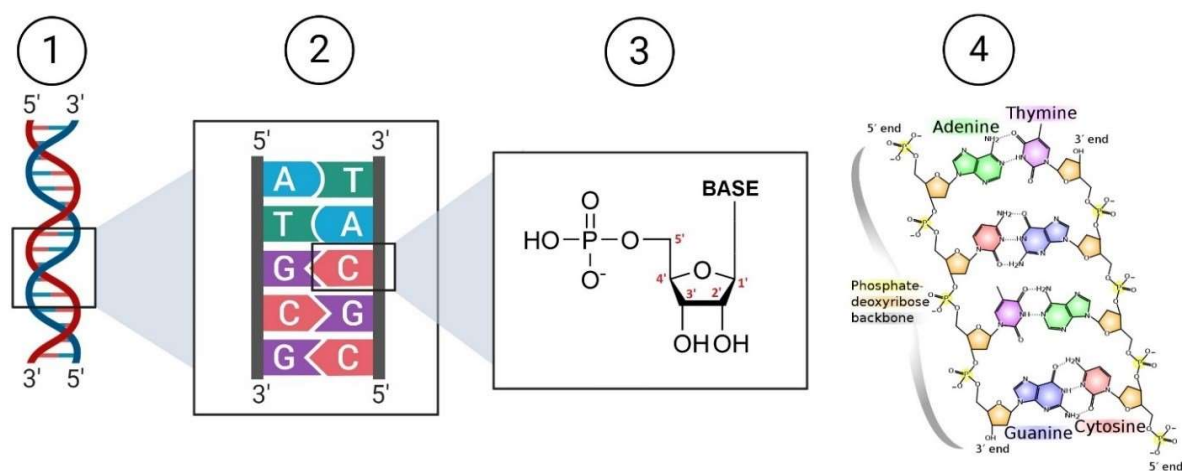
Det genetiske udtryk

I moderne bioteknologisk produktion, benyttes forskellige mikroorganismer til forskellige processer, svampe benyttes bl.a. til fermentering. Før disse kan bruges, er det dog nødvendigt at indsamle, isolere og identificere dem. For at kunne forstå teorien bag de metoder der skal bruges i laboratoriet, nemlig at isolere og identificere mikroorganismer, er det nødvendigt med en fundamental forståelse for DNA, RNA og proteiner først. Disse tre komponenter vil du nemlig møde mange steder, når du gennemgår teorikompendiets emner.

DNA

DNA er et molekyle, der bærer genetiske instruktioner til udvikling, funktion, vækst og reproduktion af alle kendte organismer og mange vira. DNA står for deoxyribonukleinsyre, og består af to DNA-streng. Hver DNA-streng består af en masse **nukleotider**, der er kovalent bundet sammen. Et nukleotid består af en fosfatgruppe, et pentosesuktermolekyle (deoxyribose) samt en nitrogenholdig base. I DNA findes der fire forskellige baser; **cytosin (C)**, **guanin (G)**, **adenin (A)** og **thymin (T)**.

DNA-strengen har to ender, der adskiller sig fra hinanden. Disse to ender kaldes for henholdsvis **5'-enden** og **3'-enden (Figur 4.1)**. 5'-enden bliver ofte beskrevet som DNA-strengens begyndelse, hvor det første nukleotid har en fosfatgruppen, som stikker ud fra pentosesukkerets 5. carbon atom. 3'-enden bliver ofte kaldt for DNA-strengens afslutning. Her indeholder det sidste nukleotid i DNA-strengen en hydroxylgruppe (OH-gruppe) fra pentosesukkerets tredje carbon atom, der bliver eksponeret (**Figur 4.3**). Når nye nukleotider skal tilføjes til DNA-strengen, vil nukleotidet, der skal inkorporeres i strengen, danne en binding mellem sit 5'-fosfat til DNA-strengens 3'-hydroxylgruppe. Strengen vokser fra sin 5'-ende mod sin 3'-ende og bliver på den måde længere i 3'-enden.



Figur 4: Opbygning af DNA. 1) Dobbelt strengtet DNA helix. 2) De fire komplementære nukleobaser. 3) Nukleobaser består af en sukkerdel, en fosfordel og en nitrogenholdig base. Der er fem carbonatomer i suktermolekylet, navngivet 1'-5' på følgende måde. Det er ud fra disse carbonatomer, at DNA-strengene er navngivet 5' eller 3'. 4) DNA'ets endelige opbygning med backbone på ydersiden og nukleobaser på indersiden. Hentet fra Wikipedia (Madeline Price Ball).

De to DNA-streng er snoet omkring hinanden og danner en struktur, der minder om en snoet stige. Denne struktur kaldes for en **dobbelthelix**. På ydersiden af dobbelthelixer sidder DNA-strengenes fosfatgrupper og suktermolekyler. Dette kaldes også for DNA'ets **backbone**. De fire forskellige typer baser findes på indersiden af helixen. De sørger for, at de to kæder sidder sammen, da baserne danner par med hinanden via hydrogenbindinger (**Figur 4.4**).

De fire forskellige baser laver specifikke pardannelser med hinanden. Cytosin (C) danner altid par med guanin (G), og adenin (A) danner altid par med thymin (T) (**Figur 4.2**). De to DNA-streng i dobbelthelixer løber i modsatte retninger. Det betyder, at 5'-enden af en streng er parret med 3'-enden af dens komplementære streng. Man siger derfor, at DNA-strengene er **antiparallele (Figur 4.4)**.

Alle celletyper opbevarer deres arvemasse som DNA. Den totale mængde arvemasse, på DNA-form, er cellens genom. I eukaryote celler findes DNA'et i cellekernen: genomet ligger som et langt, lineært dobbeltstrengtet DNA-molekyle, tæt pakket og strengt reguleret. Prokaryoter er mindre avancerede, og

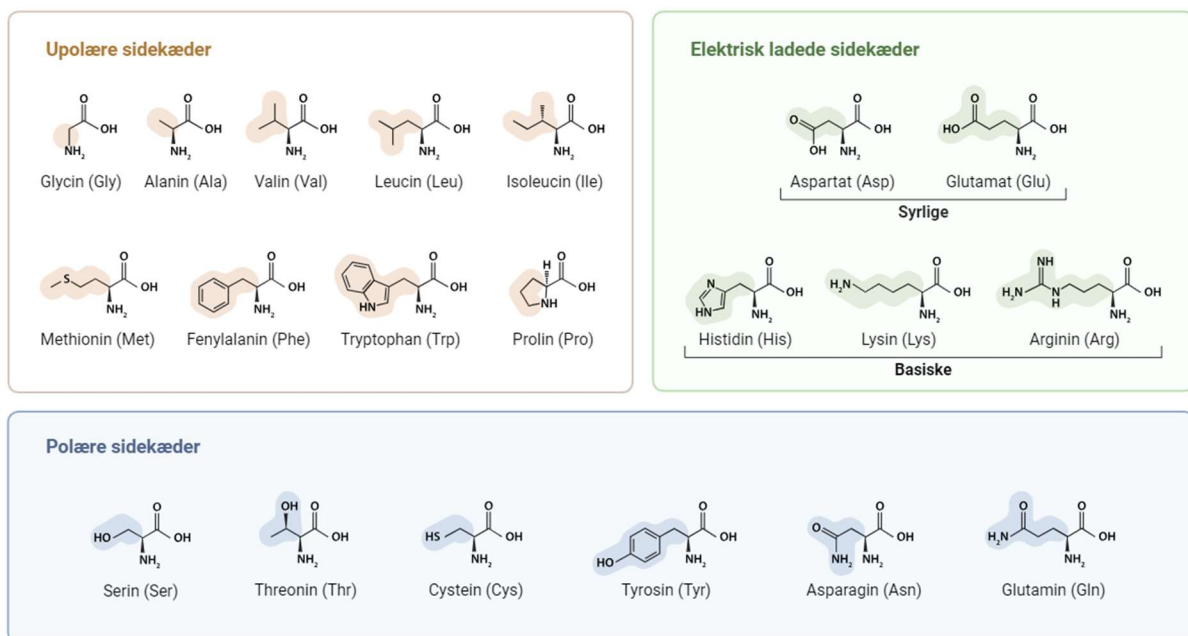
har cirkulære genomer, som ligger frit i cytoplasmet. De kan også indeholde genetisk information på mindre cirkulære DNA-enheder, som kaldes plasmider.

RNA

Ribonukleinsyre (RNA) består, ligesom DNA, af en kæde af nukleotider, og har utrolig mange forskellige funktioner i cellen. I modsætning til DNA, er RNA enkeltstretet, og det har en anderledes opbygning af sin sukkergruppe. En anden vigtig forskel mellem DNA og RNA er, at en af de fire nitrogenholdige baser i RNA er anderledes. I RNA erstattes basen thymin (T) med basen uracil (U). Der er mange forskellige typer RNA, herunder messenger-RNA (mRNA), ribosomalt-RNA (rRNA) og transfer-RNA (tRNA), samt primære. mRNA er den type RNA, der bliver aflæst når, der skal dannes et nyt protein via translation i ribosomerne. rRNA er (sammen med proteiner) en vigtig bestanddel af ribosomerne. Endelig har tRNA den vigtige rolle, at de transporterer aminosyrerne til ribosomet under proteinsyntesen.

Proteiner

Proteiner er et vigtigt element i celler, og der er mange forskellige typer af proteiner i hver eneste celle. Proteiner er opbygget af én eller flere kæder af **aminosyrer**. Disse kæder kaldes for **polypeptider**. Der er 20 forskellige aminosyrer, der kan bruges til at lave et protein, og hver aminosyre har sin egen struktur og kemiske egenskaber, som afhænger af dens specifikke sidekæde (**Figur 5**). Antallet af aminosyrer i polypeptidet varierer fra protein til protein. Antallet af polypeptider, som et protein er opbygget af, varierer også. Proteiner kommer derfor i enhver størrelse, form og type, og hvert enkelt protein har et specifikt formål. Korte peptidkæder, har mange funktioner og bruges fx ofte som signaler hængt fast i enden på proteiner, der angiver hvor proteinet skal sendes hen i, eller udenfor cellen. Tilsammen er proteiner livsnødvendige for cellens overlevelse.

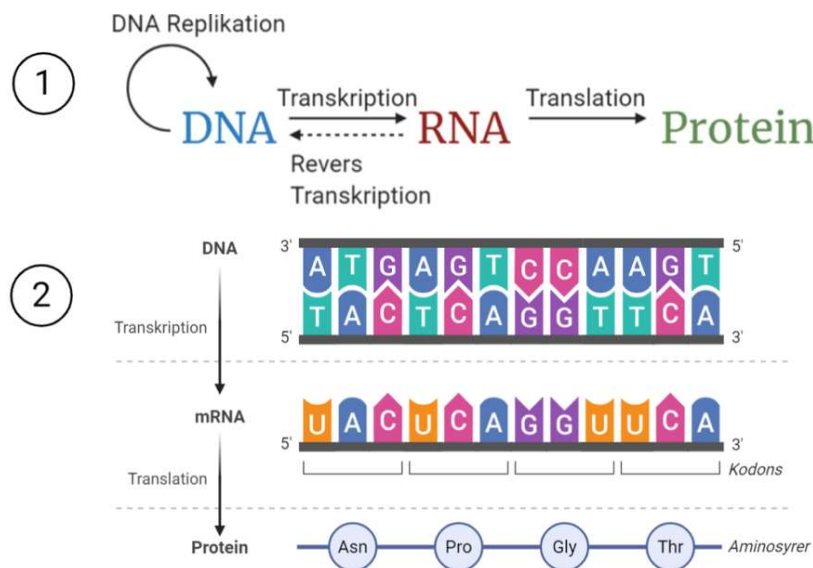


Figur 5: De 20 Aminosyrestrukturer inddelt efter polaritet og elektriske ladninger. Illustration er genereret i Biorender.

Det Centrale Dogme

For at forstå hvordan proteiner bliver dannet, og dermed hvordan vi selv kan manipulere denne process, skal vi forstå hvad Det Centrale Dogme er. Det Centrale Dogme er en af de vigtigste koncepter indenfor molekylærbiologi og beskriver strømmen af genetisk information i en celle. Overordnede set beskrives de to trin på følgende måde: DNA'et oversættes til RNA gennem transskription, og fra RNA-koden produceres proteiner ved translation (**Figur 6**).

DNA kan desuden kopieres, og dermed kan der videregives genetiske information til en ny celle via replikation. Når den genetiske information er videregivet til proteinniveau, så er den genetiske information fastlåst og kan ikke længere videregives.



Figur 6: Det Centrale Dogme. (1) DNA kan blive kopieret ved hjælp af en proces, der kaldes for DNA-replikation. Dette er vigtigt for at en celle kan videregive sin genetiske information. DNA'et bliver udtrykt i cellen ved hjælp af to processer kaldet transskription og translation. (2) Når et gen skal udtrykkes, skal DNA-sekvensen først transskriberes til RNA. Den kodende region i RNA'et bliver dernæst lavet til et polypeptid med en korresponderende aminosyresekvens via translation. Denne aminosyresekvens er bestemt ud fra såkaldte kodon i det kodende RNA. Den kodende kodonsekvens for mRNA'et er den samme som for 5'-3'-DNA-strengen (den kodende DNA-streng), som det stammer fra. Den eneste forskel mellem dem er, at thymin (T) er blevet erstattet med uracil (U) i RNA-strengen. Illustration er genereret i Biorender.

Transskription: Fra DNA til RNA

Ordet **transskription** beskriver en proces, hvori oplysninger skrives om. I biologiens verden beskriver transskription en proces, hvor en gensekvens (altså en DNA-sekvens) bliver kopieret og oversat til den korresponderende RNA-kode. Transskription er det første led i at få et gen udtrykt, altså få koden i genet omsat til et funktionelt produkt såsom et protein. For et proteinkodende gen bærer RNA-kopien den information, der er nødvendig for at opbygge et polypeptid, der senere foldes til et funktionelt protein. Transskription af et gen foregår i tre trin: 1. Initiering, 2. Elongering og 3. Terminering (**Figur 7**). Cellerne regulerer omhyggeligt transskription af hvert enkelt gen eller en lille klynge af gener, der bliver transskriberet samtidig. På den måde kan cellen styre, at gener kun bliver udtrykt, når der er behov for dem.

Initiering

Når cellen starter transskriptionen af et gen, binder **RNA-polymerase** sig til en sekvens i DNA'et, der kaldes for en **promotor**. Denne sekvens findes i nærheden af genets begyndelse. Hvert gen har sin egen promotor, der fungerer som en tænd/sluk knap for genet. Når RNA-polymerasen binder til promotoren, kan RNA-polymerase skille DNA-strengene ad. Dette blotlægger den enkeltstrengede DNA-skabelon,

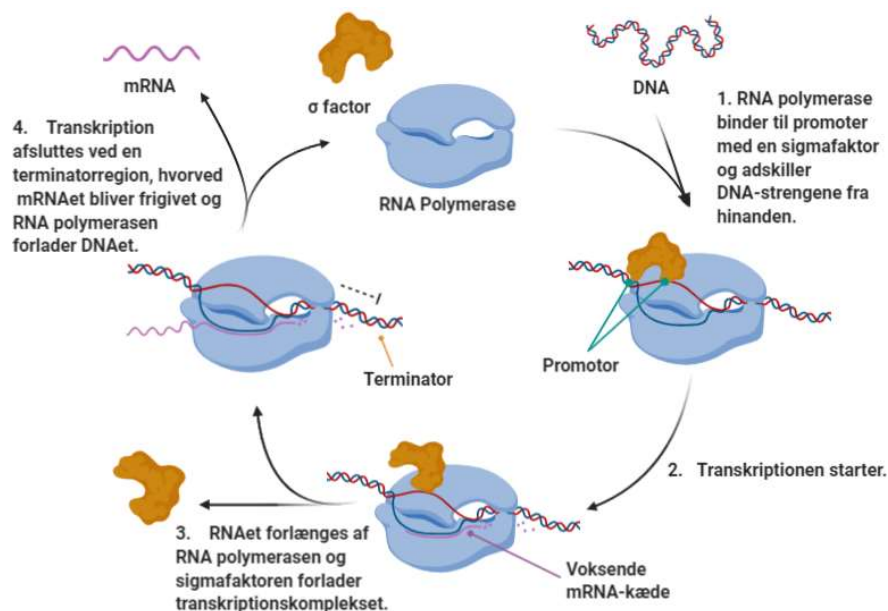
der er nødvendig for transskription. For at de rette gener transskriberes, er det derfor yderst vigtigt, at RNA-polymerasen binder til den rette promotor. Dette gøres ved hjælp af et protein, der kaldes for en **sigmafaktor (σ -faktor)**. Dette protein muliggør specifik binding af RNA-polymerase til promotoren. Den specifikke σ -faktor, der bruges til at initiere transskription af et givet gen, vil variere afhængigt af genet og af de miljømæssige signaler, der er nødvendige for at starte transskription af dette gen. Den valgte promotor for RNA-polymerasen afhænger derfor af σ -faktoren (**Figur 7.1**).

Elongering

Når RNA-polymerasen har bundet sig til promotoren sammen med σ -faktoren, bliver DNA-skabelonens sekvens læst én base ad gangen (**Figur 7.2**). Samtidig med baserne bliver læst, bygger RNA-polymerasen en RNA-streng med komplementerende baser. Denne RNA-streng vokser, ligesom DNA i 5' til 3' retningen. RNA-strengen bærer den samme sekvens, som den DNA-streng, der ikke bruges som DNA-skabelon, med undtagelse af basen uracil (U) som systematisk byttes ud med thymin (T). DNA-skabelonen kaldes også for den **kodende DNA-streng**. Efter at de første baser er sat på den voksende RNA-streng falder σ -faktoren af, og RNA polymerasen fortsætter syntetiseringen af RNA-strengen på egen hånd (**Figur 7.3**).

Terminering

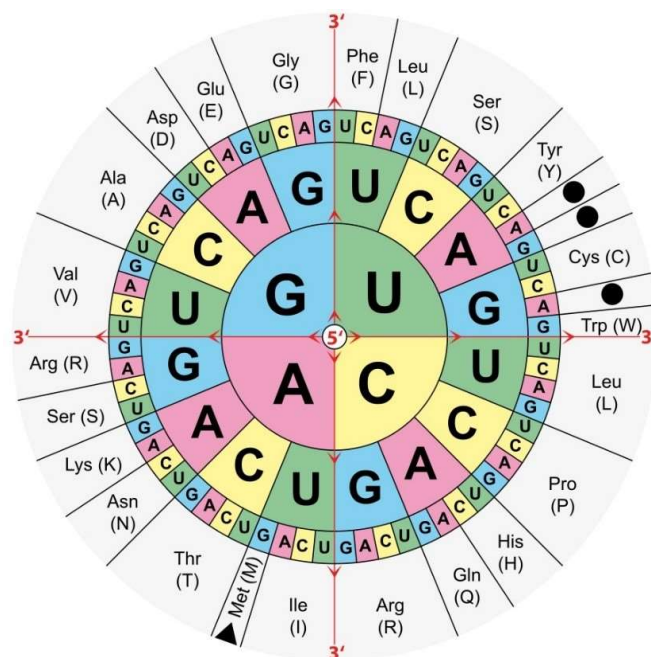
RNA-polymerasen fortsætter transskriptionen, indtil den møder en sekvens på DNA'et, der får den til at stoppe. Dette sker, når RNA-polymerasen transskriberer en DNA-sekvens, der kaldes for en **terminator**. Når RNA-polymerasen møder en terminator, får det RNA-polymerasen til at stoppe transskriptionen, og RNA-polymerasen falder af DNA-strengen (**Figur 7.4**). En RNA-sekvens, der er klar til at blive oversat af ribosomet, kaldes et **messenger-RNA (mRNA)**. I bakterier er mRNA-strengen klar til at blive oversat til protein lige efter transskription. Translationen af mRNA'et kan faktisk starte, mens transskription stadig foregår, og ribosomer er ofte knyttet til mRNA-strengen, mens den bliver syntetiseret.



Figur 7: Transskriptionen af DNA til RNA. Denne process udføres af enzymet RNA-polymerase, der binder til en specifik promotorregion på DNA'et, med hjælp fra en specifik sigma-faktor. RNA-polymerasen er derefter i stand til at initiere transskription ved at åbne DNA'ets doppelhelix, hvilket tillader, at det enkeltstrengede DNA kan fungere som en skabelon. Efter inkorporering af de første få nukleotider begynder enzymets affinitet til promotoren at falde, indtil sigma-faktoren frigøres fra RNA-polymerasen. Transkriptionen fortsætter indtil den når en terminatorregion, hvorefter mRNA'et bliver frigivet, og RNA-polymerasen kobler sig fra DNA'et. Illustration er genereret i Biorender.

Translation: Fra mRNA til polypeptid

Ved translation bliver informationerne, der er gemt i mRNA'et, brugt til at opbygge et polypeptid, som er en kæde af aminosyrer, der opbygges ved hjælp af et ribosom. Et polypeptid kan efterfølgende foldes til et fuldt funktionsdygtigt protein. mRNA indeholder instruktionerne til opbygningen af et polypeptid. Instruktionerne læses i grupper af tre RNA-nukleotider, altså grupper bestående af tre baser: adenin (A), uracil (U), cytosin (C) og guanin (G). Disse tripletter kaldes for **kodons**. Et enkelt kodon koder for én specifik aminosyre, dog kan flere kodons kode for samme aminosyre, derfor siges der at være en overflødighed af kodon. Et **startkodon**, ofte med sekvensen AUG, koder for aminosyren methionin og beskriver, hvor i mRNA-sekvensen translationen skal begynde. Efter startkodon afkodes mRNA-sekvensen kodon for kodon uden overlap eller mellemrum, indtil ribosomet møder et **stopkodon** (UAA, UAG eller UGA), der markerer translationens afslutning. I modsætning til alle andre slags kodons, så koder stopkodon IKKE for en aminosyre. Oversættelsen af kodons til aminosyrer betegnes **den genetiske kode**. Hvilke aminosyrer de forskellige kodons koder for. **Figur 8**.



Figur 8: Figuren viser hvilke aminosyrer som de forskellige kodons koder for. For at finde ud af hvilken aminosyre ens kodon svarer til, starter man på midten, følger herefter de nukleotider, der findes i ens kodon. Startkoden er AUG, hvilket også er angivet med en sort pil. Slutkodons er UAA, UAG og UGA. Dette er anvist med sorte prikker. Billedet er hentet fra Wikipedia (Robert Kohlmann).

Transfer-RNA (tRNA) spiller en vigtig rolle i translation. tRNA kobler et mRNA-kodon sammen med den specifikke aminosyre, som den koder for. På den nederste del af hvert tRNA er en sekvens på tre nukleotider, der kaldes for et **antikodon**. Et antikodon kan binde til specifikke mRNA-kodons. Det vil sige at tRNA'et altså er det modsatte kodon end det, der er på mRNA'et f.eks. hvis mRNA'ets kodon er CCG så er tRNA'et GGC. Den øverste del af tRNA'et bærer den aminosyre, der er specificeret af det pågældende kodon. Der er derfor mange forskellige typer tRNA. Hver type genkender én eller få kodons og bringer herefter den matchende aminosyre til den voksende polypeptidkæde.

Ribosomer er de strukturer, hvor i polypeptiderne bliver bygget. De består primært af protein og **ribosomalt-RNA (rRNA)**. Hvert ribosom har to underenheder, en stor og en lille, der samles omkring mRNA'et, der skal oversættes. Ribosomet fungerer samtidig også som et enzym, der binder aminosyrerne sammen og skaber en kæde.

Translationen kan inddeles i samme 3 faser som transskriptionen: Initiering, elongering og terminering. Den overordnede proces kan ses på **Figur 9**.

Ribosomal initiering

Først samles ribosomet omkring mRNA'et, der skal læses, og det første tRNA binder sig på mRNA-strengen. Dette tRNA bærer aminosyren methionin, der matcher startkodonet AUG. Denne opsætning kaldes for initieringskomplekset, hvilket er nødvendigt for at oversættelsen kan gå i gang.

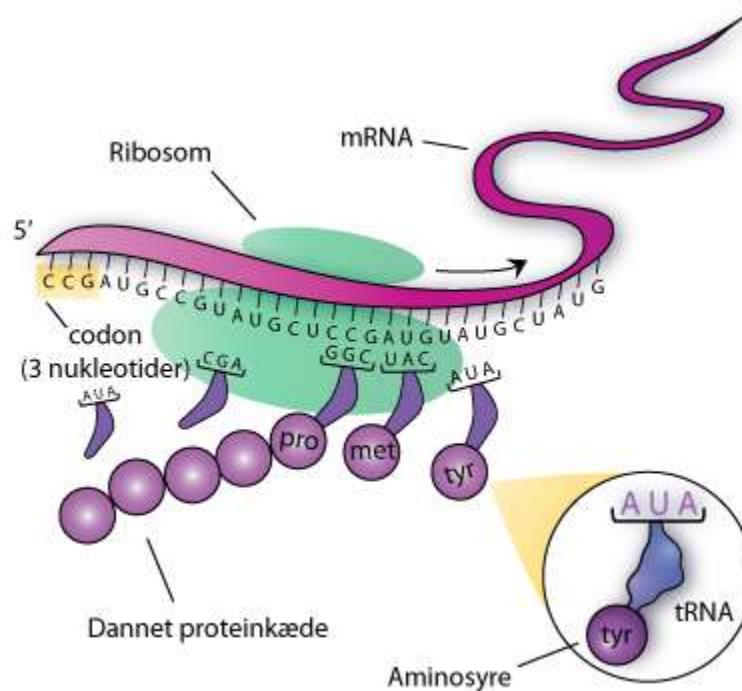
Ribosomal elongering

Efter initeringskomplekset vil aminosyrekæden blive forlænget. Her oversætter ribosomet et kodon ad gangen, og den korresponderende aminosyre tilføjes til den voksende aminosyrekæde. Hver gang et nyt kodon oversættes, overføres et tRNA med den rette aminosyre til polypeptidet, som sidder i ribosomet. Herefter mister den naboliggende tRNA sin aminosyre, og dette tRNA frigøres og skubbes ud af ribosomet. Det tRNA, som sidder tilbage, og nu har en ekstra aminosyre, er klar til at give den voksende kæde videre til det næste tRNA, der binder til åbningspositionen i ribosomet.

Ribosomal terminering

I den sidste fase skal det færdige polypeptid frigøres. Polypeptidet bliver frigjort, når et stopkodon bliver genkendt af ribosomet. Sekvensen på dette stopkodon kan være UAG, UAA eller UGA. Disse kodonsekvenser udløser en række hændelser, der adskiller polypeptidkæden fra tRNA'et, og den kan herefter løsrive sig fra ribosomet. Herefter er translationen afsluttet. Efter translationens afslutning kan polypeptidet stadig mangle at gennemgå forskellige modifikationer, før det er færdigfoldet til et funktionelt protein. Det skal f.eks. ofte sendes et andet sted hen i cellen eller kombineres med andre polypeptider, før det kan gøre sit job som et funktionelt protein.

Hvis du vil vide mere om molekylærbiologiens centrale dogme, anbefaler vi at du ser videoerne dedikeret til emnet på biostriben: <https://bit.ly/3mupSnh>.



Figur 9: Translationen hvor et protein dannes fra et mRNA. tRNA baseparrer til det næste ledige codon på mRNA-strengen. tRNA'et indsætter dermed den passende aminosyre i den voksende aminosyrekæde, der bliver til det nye protein.

Vækstmedie

For at Svampe eller andre mikroorganismer som bakterier kan gro, skal man sørge for, at de har de rigtige vækstforhold. Svampe har brug for organiske stoffer, som f.eks. simple kulhydrater, mineraler og salt for at kunne vokse. Hvis man blander disse stoffer i de rette mængder, kan man producere et **vækstmedie**. Der findes mange forskellige vækstmedier med forskelligt indhold og forskellige forhold af indholdsstoffer. Dette skyldes, at det ideelle vækstmedie er forskelligt for forskellige organismer.

Når celler podes til (tilsættes) et flydende vækstmedie, vil cellerne gro nede i væsken. Alternativt kan man tilsætte 15 g/L agar når man blander sit vækstmedie, og støbe det til et fast medie. Når agar varmes op over 85 °C, smelter det og bliver flydende. Agar størkner ved igen ved 32-40 °C så inden da skal man hælde blandingen i en petriskål.

Petriskåle, der indeholder et fast vækstmedie baseret på agar, kaldes agarplader. Agarplader bruges til at dyrke celler på en overflade. Celler, der spredes ud og dyrkes på en agarplade, er lette at identificere. Det skyldes, at de vokser i kolonier, som kan ses med det blotte øje som små prikker, hvis der er tale om bakterier eller gær, eller store masser hvis det er svampe. Hver koloni er et resultat af én celle eller spore, der har delt sig til mange millioner af celler, der ligger lige op ad hinanden (**Figur 10**). Alle cellerne i en koloni antages altså at være genetisk identiske. Det er vigtigt at kunne sprede cellerne rigtigt ud på en agarplade, så hver enkelt koloni kan isoleres eller tælles.

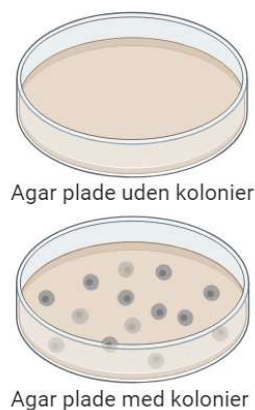
Selektion af mikrober

Der findes mange mikroorganismer i luften, der kan falde ned på en agarplade og kontaminere den, hvis den står uden låg (eller hvis man sidder og snakker når man plader ud). Der findes forskellige metoder, hvorpå man kan sikre sig, at det kun er de mikroorganismer man arbejder med, som gror på pladen. Dette kan bl.a. løses ved selektive agarplader, hvor vækstbetingelserne er særlig fordelagtige for de ønskede mikrober, mens hæmmende uønskede microbes vækst.

Til det laboratoriearbejde I skal udføre, anvendes to forskellige slags agar baserede vækstmedier til udpladning af jordprøver. Det ene er Dichloran glycerol 18% agar (DG18) og den anden er, Surt Malt Extract Agar (MEAox), som har en pH værdi på 3,5 (**Error! Reference source not found.**). Vi bruger to forskellige vækstmedier, som er designet til at være optimale for et bredt spektrum af svampe, dog er de lidt forskellige. På grund af det sure forhold på en MEAox plade vil der gro acidofile svampe (glade for surt miljø). Derfor ved brug af forskellige typer plader får vi en større repræsentation af mikroorganismerne i f.eks en jordprøve.

Eftersom agarplader også kan benyttes til at gro bakterier på, er det vigtigt at forhindre bakterievæksten, så man undgår kontaminationer. DG18-pladerne indeholder to slags stærke antibiotika og de sure MEAox-plader har en lav vandaktivitet som bakterier ikke bryder sig om, derved sikres, at væksten på pladerne kun er svampe.

Senere benyttes Potato Dextrose Agar (PDA) plader til renstrykning og isolering af svampe. Kartoffel-ekstraktet giver de nødvendige næringsstoffer, mens dextrose fungerer som kulhydratkilde. Den lave



Figur 10: Agarplader med og uden vækst. Illustration er genereret i Biorender.



Figur 11: To forskellige agarplader, som kan benyttes til arbejde med bakterier. Illustration er genereret i Biorender.

pH på 3,5 hæmmer bakterievækst og fremmer svampevækst. Rose Bengal tilsættes for yderligere at hæmme bakterier og begrænse svampenes størrelse.

Metoder i laboratoriet

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction er en molekylærbiologisk teknik, der bliver brugt til at opformere specifikke DNA-sekvenser, så der er nok materiale til sekventering. PCR bliver brugt som et led i detektion og identifikation af organismer eller andet biologisk materiale, der indeholder DNA. PCR bliver også brugt som et vigtigt redskab til kloning og genmodificering.

Til PCR bruges DNA-polymerasen (fra Det Centrale Dogme) til at opformere en specifik DNA-sekvens, der kaldes for **gene of interest (GOI)**. GOI er en lille del af et længere stykke DNA, som kaldes for en **DNA-skabelon**. PCR gennemgår en række cyklusser, hvor hver DNA-sekvens bliver kopieret én gang per cyklus. Det vil sige, at hvis man starter med 2 ens DNA-streng, så vil man efter første cyklus have 4 DNA-streng. Hvis man kører en PCR med 30 cyklusser, ender man derfor ud med hvad der svarer til 1.073.741.824 DNA-streng.

Valg af primere - kopiernes start og stop

DNA har som bekendt to streng, der løber i hver sin **retning** (3' til 5' og 5' til 3'). Derfor vil DNA-polymerase i PCR også kopiere de to streng i hver sin retning. Dette indebærer, at der skal bruges to forskellige primere - én til start af kopiering af DNA'et i hver sin retning (forward og reverse). DNA-polymerase bygger nemlig udelukkende nye streng op i retningen fra 5' til 3'. Den streng, enzymet bruger som skabelon, skal altså gå modsat, dvs. fra 3' til 5'. Det betyder, at de to nødvendige primers sekvenser skal vælges, så den ene baseparer til startstedet på den ene streng, og den anden baseparer til den anden strengs startsted. Da strengene er modsatte, ligger den enes startsted automatisk samme sted som stopstedet på den modsatte streng (**Figur 4**).

Hvorfor startstedet på én streng samtidig er slutstedet på den anden streng, kan være lidt svært at forstå. Men det skyldes, at de DNA-streng, som dannes i den første cyklus, også vil fungere som skabelon i den næste fordoblingscyklus, men nu for den modsatte streng og retning. Derfor er der ikke mere DNA-streng tilbage, når DNA-polymerasen kommer frem til det oprindelige startsted - som derfor bliver et stopsted.

Vi skal i løbet af ugen benytte to forskellige primere: ITS og TUBULIN (**Tabel 1**). Der er helt særlige årsager til valget af de to primer. Essentielt for et godt 'target' for identifikation er, at genet er til stede i næsten alle arter. Derfor skal genet være funktionelt essentielt dog skal der i genet være en vis genetisk variation på tværs af arter for at muliggøre differentiation mellem arterne ud fra en gensekvens. ITS står for 'Internal Transcribed Spacer' og er en af de regioner i en svamps DNA med mest variation når det kommer til forskellige arter. Det er derudover også den mest sekvenserede del af svampes genom. Af denne grund er ITS et fantastisk 'target', da det giver stor mulighed for identifikation af ukendte svampe, med en stor database at søge i.

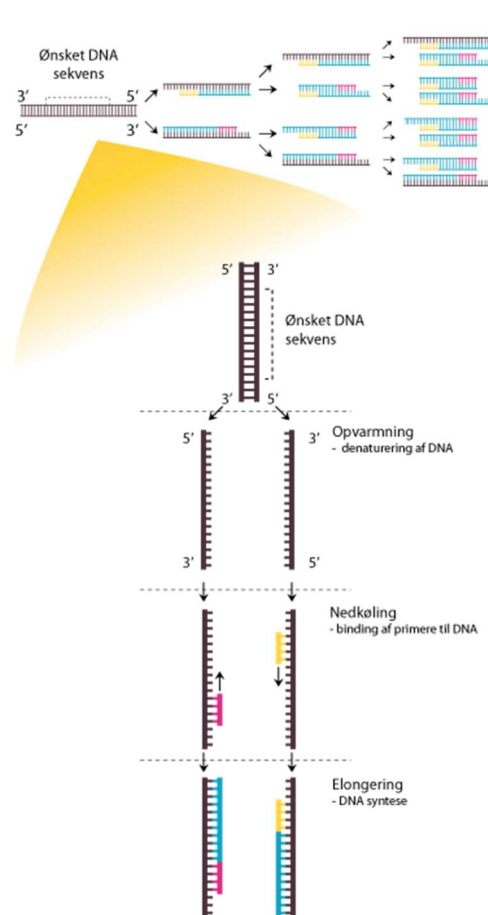
Tubulin er et funktionelt protein som er essentielt for opbygningen af cellens struktur og funktion. F.eks indgår tubulin i mikrotubli, rørformede strukturer der giver svampecellen stabilitet. Tubulin er også nødvendig for intracellulær transport, celledeling og bevægelser af cellen. Dog på trods af sin centrale rolle, som gør det til et velbevaret gen os de fleste svampearter, er der signifikant generisk variation af genet på tværs af arterne. Derfor fungerer genet også som et godt 'target' ved identifikation.

Tabel 1: Overblik over primerne Tubulin og ITS.

| Tubulin (tub or benA) | | |
|-------------------------|---------------------------------|-----|
| Primer forward Tubulin3 | ACG ATA GGT TCA CCT CCA GAC | O23 |
| T10-F | ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC | O24 |
| Primer reverse Cmd6-R | | |
| ITS (rDNA locus) | | |
| Primer forward V9G-F | TTA CGT CCC TGC CCT TTG TA | O19 |
| Primer reverse LS266-R | GCA TTC CCA AAC AAC TCG ACT C | O20 |

Faserne i en PCR-cyklus

Hver cyklus i en PCR er delt op i tre forskellige faser, der har hver deres temperatur og varighed (Figur 12) e angivne temperaturer varierer efter hvilke primere, der anvendes.



Figur 12: PCR. Opformering af en specifik DNA-sekvens med PCR ved tilsætning af primere (gul og rød), der binder til startstedet for kopieringen på hvert af de to enkeltstrengede DNA-streng.

1. Opvarmning (denaturering af DNA)

Det dobbeltstrengede DNA, der skal bruges som skabelon i reaktionen, skal først denatureres (adskilles) ved høj temperatur (ca. 95 °C) i nogle sekunder. Dette gør DNA'et enkeltstrengt, så hver streng kan få bygget en ny komplementær streng senere i PCR-cyklussen.

2. Nedkøling (binding af primere til DNA)

Temperaturen sænkes til omkring 60 °C (denne temperatur afhænger specifikt af de primere man bruger), hvor de tilsatte primere vil kunne binde til startstederne på det enkeltstrengede DNA.

3. Elongering (dannelse af de nye, komplementære DNA-streng)

Temperaturen hæves til 72 °C, hvor DNA-polymerase binder til primere ved startstederne og bygger videre på de nye, komplementære DNA-streng. DNA-polymerasen fortsætter, så længe temperaturen ikke hæves, og så længe der stadig er skabelon-DNA til rådighed. Varigheden af trinnet beregnes derfor, så cyklussen først genstarter, når hele den interessante DNA-sekvens er forlænget (elongeret) til dobbeltstrengt DNA. En PCR med 30 cyklusser varer gerne 2-3 timer.

Hvis du vil vide mere om PCR, anbefaler vi at du ser videoerne dedikeret til emnet på Biostriben: <https://bit.ly/35DMjjP>

Tissue PCR

Tissue PCR er en undertype af PCR-teknikken. Det er en metode til at amplificere DNA direkte fra vævsprøver uden forudgående DNA-ekstraktion. Små vævsprøver bruges dermed direkte i PCR-reaktionen, dog er det nødvendigt at disse vævsprøver har en høj koncentration af DNA. Metoden er hurtig, enkel og kræver minimal prøvebehandling, men kan være mere udsat for forurening og dermed indeholde flere urenheder sammenlignet med andre PCR-typer.

Gelelektroforese

Gelelektroforese er en teknik, hvorved man kan separere og identificere forskellige DNA-strengene eller proteiner i en opløsning. Gelelektroforese er et nyttigt redskab, da adskillelsen af DNA på baggrund af antallet af basepar kan bruges til at bekræfte om ens forsøg, har resulteret i en DNA-sekvens med den korrekte DNA-længde. Resultatet af en gelelektroforese, kan ses som lysende bånd der er løbet varierende længder i gelen. Disse bånd indeholder millioner af DNA-fragmenter og vil variere i deres tydelighed alt efter hvor stor mængde af DNA de indeholder. Gelelektroforese kan altså bruges til at undersøge, om det forventede DNA er til stede i en prøve.

I gelelektroforese udnytter man, at DNA naturligt er negativt ladet. Denne negative ladning stammer fra fosfatgrupper, der optræder i hvert nukleotid i DNA-strengen. I en gelelektroforese bliver DNA'et udsat for et elektrisk spændingsfelt, der har en negativ pol og en positiv pol. Da DNA er negativt ladet, vil det blive tiltrukket af den positive pol. Da alt DNA har samme ladning-til-masse-forhold, så vil de korteste DNA-strengene rejse længst igennem gelen, da de møder mindre modstand gennem gelen. Dette kan dermed bruges til at skelnes mellem store og små DNA-fragmenter, da store stykker ikke vil løbe så langt som mindre stykker.

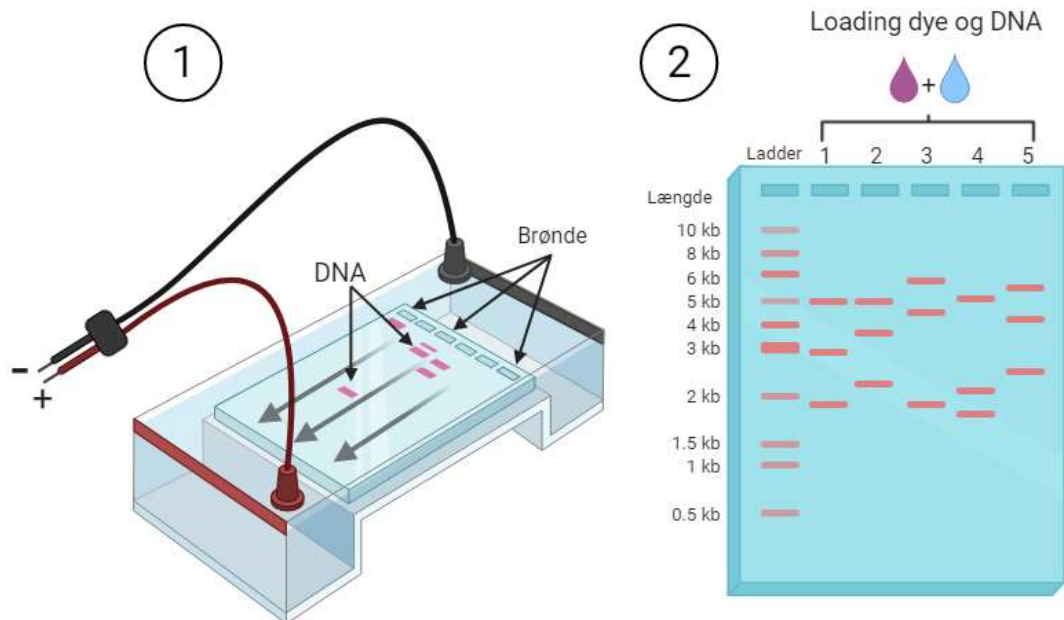
Opsæt en gel

Der indgår syv komponenter i en gelelektroforese: 1. DNA, 2. Gel, 3. Elektroforesekammer med et spændingsfelt, 4. DNA-markør, 5. Loading dye, 6. DNA-stainer og 7. Buffer. Fremgangsmåden er beskrevet herunder.

- Når man laver en gelelektroforese, støber man først sin gel. En gel består af polysacchariden **agarose**, der blandes sammen med buffer og en **DNA-stainer**, der er vigtig for at kunne visualisere båndene under UV-lys. Gelen bliver først varmet op, og når den efterfølgende er kølet ned, vil agarosen størkne, og blandingen få en geléagtig tekstur.
- Gelen bliver nedsænket i et elektroforesekammer, hvorefter en **bufferopløsning** hældes ned i elektroforesekammeret, så den lige akkurat dækker gelen. Bufferopløsningen er med til at holde en stabil pH-værdi og beskytter gelen mod at udtørre. Ioner i bufferopløsningen er med til at lede strømmen igennem karret under gelelektroforesen (**Figur 13.1**).
- De ellers usynlige DNA-fragmenter bliver blandet med en lille smule **loading dye**, der er farvet og indeholder en koncentreret sukkeropløsning (ofte glycerin). Dette gøres for at visualisere DNA'et.
- Herefter placerer man sin DNA-prøve i fordybninger, kaldet brønde, der er placeret i den ene ende af gelen. Glycerinen, fra loading dye'en, sørger for, at DNA'et synker lettere til bunds i brøndene. Udover at tilføje DNA'et fra prøven til sine brønde, tilføjer man også en **DNA-ladder**, der er en blanding af DNA-fragmenter i kendte længder (**Figur 13.2**). Da man kender længden på DNA-fragmenterne i DNA-ladder, kan man sammenligne de resulterende bånd fra DNA-prøve med båndene fra DNA-ladder og dermed få et godt overblik over hvor lange DNA-fragmenterne er.
- Efter at vores DNA-prøve og DNA-ladder er tilføjet til brøndene, starter man gelelektroforesen ved at tænde for spændingsfeltet. Når man tænder for spændingsfeltet, vil det negativt ladede DNA

blive tiltrukket af den positive pol i elektroforesekommeret. Det betyder, at DNA'et vil vandre gennem gelen mod den positive pol. En gel fungerer som et filter, som DNA'et skal anstrenge sig for at komme igennem. Det er sværere for langt DNA-fragmenter at bevæge sig gennem gelen, og derfor bevæger de sig kortere i gelen, end de korte DNA-fragmenter.

- Efter at gelelektroforesen er gennemført, kan man ved hjælp af UV-lys se DNA'et som små bånd på gelen (**Figur 13.2**). Grunden til at man bruger UV-lys er, at den tilføjede DNA stain binder sig til DNA'et og lyser op under UV-lys.



Figur 13: Gelelektroforese. 1) Gelen ligger nedsunken i en bufferopløsning. DNA'et bliver tiltrukket af den positive elektrode og vandrer derfor i polens retning gennem gelen. 2) Man tilføjer sin DNA-ladder i den første brønd og loading dye og DNA i de resterende brømde. Efter at gelen er kørt, kan man se hvordan DNA-fragmenterne har bevæget sig ved hjælp af UV-lys. I brønden til venstre er DNA-ladder, hvor længderne på DNA-fragmenterne er kendt. Ved at sammenligne ved DNA-ladder kan man se hvor lange DNA-fragmenterne er i prøverne der er i brøndene navngivet 1-5.

Hvis du vil vide mere om gel elektroforese, anbefaler vi at du ser videoerne dedikeret til emnet på Biostriben: <https://bit.ly/3kp39XS>

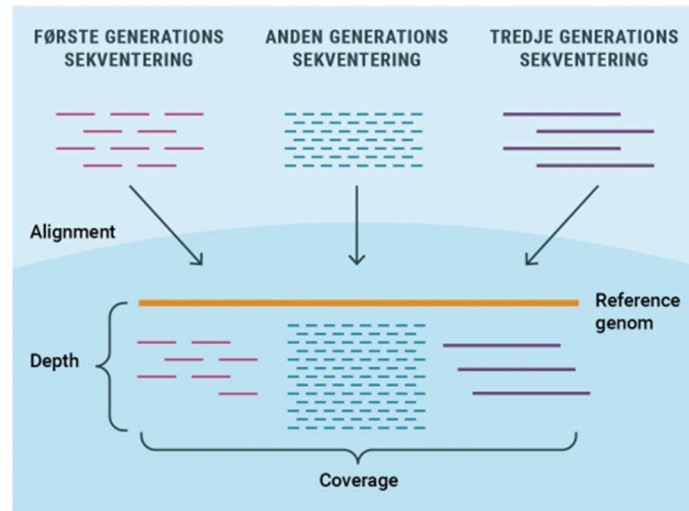
Gen sekventering

Sekventering kortlægger rækkefølgen af baser (A, C, G, T) i genomet hos en bestemt organisme. Det bruges til at undersøge både kendte og ukendte organismer, fx for at finde mutationer hos kendte organismer eller opdage nye gener fra ukendte organismer. Der er tre generationer af sekventeringsteknologier (**Tabel 2**).

Tabel 2: Sammenligning af første, anden og tredje generations sekventeringsmetoder

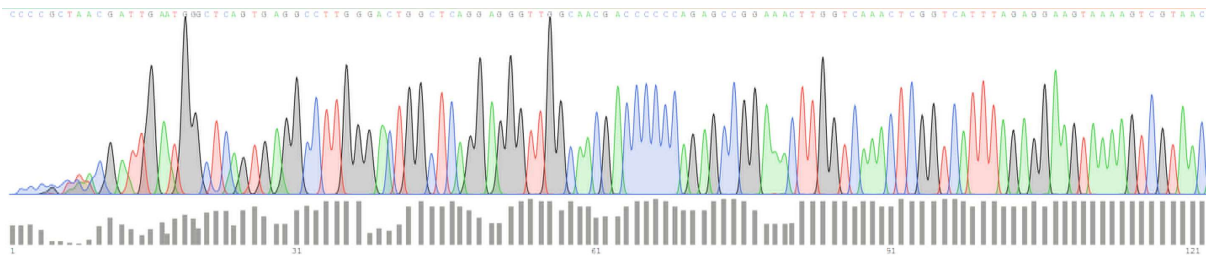
| | Fordele | Ulemper | Read længde (bp) |
|-----------------------------------|--|--|------------------|
| Første generation (Sanger) | Priseffektivt og hurtigt for et småt antal af prøver | Dyrt, langsomt, laboratorie intensivt for mange prøver | 600-1000 |
| Anden generation (NGS) | Hurtigt, billigt, høj følsomhed ved et stort antal af prøver, mere data med samme mængde DNA | Korte reads, ineffektivt ved et lavt antal prøver | 50-300 |
| Tredje generation (TGS) | Lange reads, realtime | Høj fejlrate. Der produceres mindre data end ved NGS. | 2500-50.000 |

Efter sekventering skal 'reads' samles (kaldet assembly) og kvaliteten vurderes. Dette kan gøres ud fra to faktorer: 'Coverage', som er det gennemsnitlige antal af gange ens data dækker kendte positioner i genomet og 'Depth', hvilket er antal reads der dækker et bestemt nukleotid på hver position i genomet (Figur 14).



Figur 14: Assembly. Efter sekventering skal de forskellige reads 'alignes' til et referencegenom. Dette danner et 'assembly'. Jo flere og jo længere reads der overlapper, des bedre kvalitet assembly dannes. Dette benævnes som 'coverage' og 'depth', henholdsvis. Figur hentet fra Biotech Academys hjemmeside.

Output for en sekventiering kan ses i **Figur 15**. Her kan den genetiske kode aflæses på baggrund af de farvede toppe. Højden af toppen svare til styrken af signalet.



Figur 15: Eksempel på gensekvens. A (Grøn), C (Blå), G (Sort), T (Rød).