



◇ 1. Nüüdisaegsed PCR-masinaid teaduslaboris. PCR-i ekraanil on näha polümeraasi ahelreaktsiooni tsükli aegade, iga etapi vajalik temperatuur ning tsükli arv, et amplifitseerida ehk kordistada uuritav DNA vajalikus hulgas

Polümeraasi ahelreaktsioon: teadlase, arsti ja kriminalisti kindel abiline

Karl Jürgenstein, Sulev Kuuse

Oktoobrinumbris saime selgeks, mis on polümeraasi ahelreaktsiooni tööpõhimõte. Nüüd vaatleme lähemalt meetodi rakendusvõimalusi. PCR kuulub näiteks teadlaste, arstide, põllumeeste ja farmatseutide töövahendite hulka. Seda meetodit saab edukalt kasutada diagnostikas, kohtumediitsinis, patoloogias, paleontoloogias, isaduse tõestamisel, sordiarretuses, organismide geneetilisel muutmisel, kasvajaravis ja paljudes muudes valdkondades.

Kuna PCR on nii universaalne, täpne ja nüüdisajal ka lihtne meetod, ei saa ilma selleta hakkama ükski biolabor (◇ 1).

Kahe väga olulise omaduse, s.o külluse ja spetsiifika tõttu võimaldab ka kõige elementaarsem PCR teadlastel saavutada uurimiseesmärged. Õnnestunud PCR-i tulemusel saadakse katseklaasis miljardeid koopiaid huvipakkuvat DNA-d ja tühis koguses muud ehk mittevajalikku DNA-d. Sestap muutuvad edasised meetodid või analüüsid tõhusamaks. Bioteaduses laialt levinud võtted,

nagu geeni kloonimine (huvipakkuv geen tõstetakse plasmidi, et geeni funktsiooni saaks lihtsamalt uurida) ja sekveneerimine (määratakse DNA-järjestus) toimivad just seetõttu tõhusalt. Sisestades primerite järjestuse üksikuid valesid nukleotiidide, on PCR-i abil võimalik tekitada geeni lisakooptiasse soovitud mutatsioone ja seeläbi uurida eri mutatsioonide mõju geeni otstarbele.

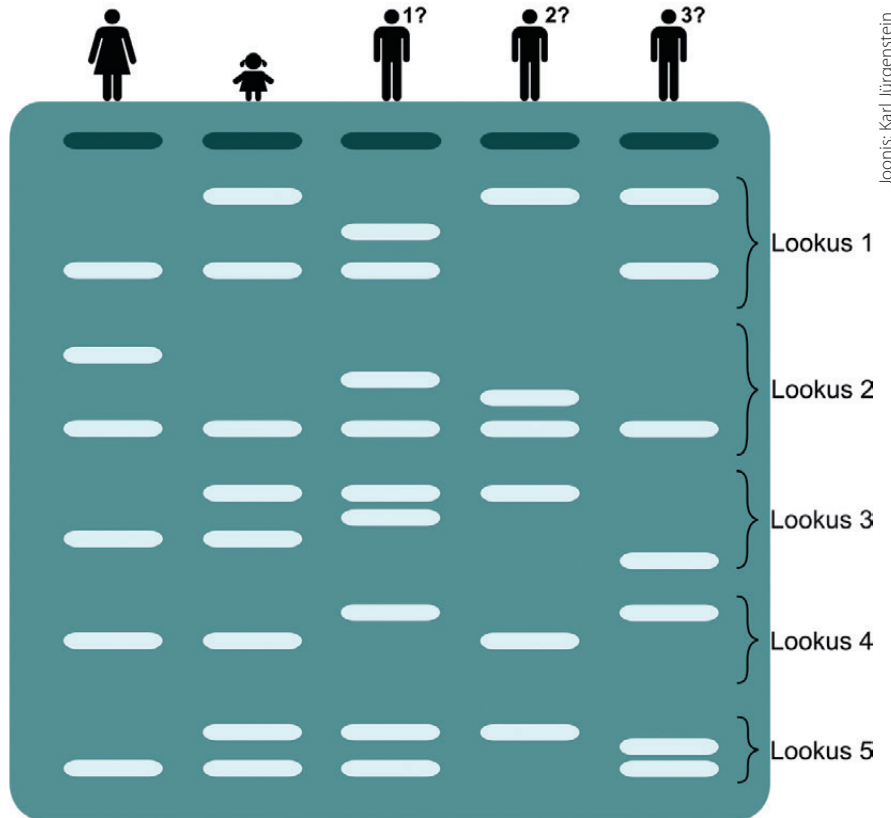
PCR ei ole pelgalt teadustööriist, seda meetodit saab ohtralt rakendada ka teistes valdkondades. Kriminalistid profileerivad selle abil DNA-d, et võr-

relda kuriteopaigalt leitud DNA-d võimalike kahtlusosaluste DNA-ga ning kinnitada või lükata ümber nende osalus kuriteos. PCR võimaldab mitmekordistada lühikesi tandeemseid kordusi (ingl *short tandem repeats* ehk STR) sisaldavaid regioone. Üks segment koosneb tavaliselt kahest kuni seitsmest nukleotiidist ning STRi-piirkonnas võib see korduda 5 kuni 50 korda. Näiteks regioonis TACTACTACTACTACTACTAC on seitse kolmenukleotiidsed segmenti TAC kordust.

Kriminalistikas kordistatakse uuritavast proovist PCR-i abil 10–20 STRi-piirkonda ning määratakse elektroforeesi teel iga regiooni kohta sealsete segmentide korduste arv ehk koopianumber. STR-id on polümorfseid piirkonnad, kus varieeruvus eri inimeste vahel on suur. Kui võrrelda korruga mitut regiooni, muutub tõenäosus, et kaks proovi juhuslikult kattuvad, imepisikeseks.

Näiteks FBI hallatavas CODIS-andmebaasis USA-s võrreldakse 20 STRi-piirkonda. Iga uuritava piirkonna koopianumbrid annavadki indiviidi DNA-profiili, mida kasutatakse ka sugulustestides ja vanemluse kindlakstegemisel (♦ 2). Iga STRi-regiooni ühe variandi pärib laps oma emalt ja teise isalt. Lapse DNA-profiil ei ole täielikult identne kummagi vanema omaga, vaid koosneb nii emalt kui ka isalt päritud STRi-piirkondadest, mistõttu kattub osaliselt mõlemaga. Küll aga ei saa lapse üheski STRi-piirkonnas olla koopianumbrit, mida kummalgi tema vanemal ei ole (piirkonnas toimunud mutatsioonide korral on see väga väikse tõenäosusega siiski võimalik, aga seetõttu analüüsitaksegi korruga mitut regiooni). Sugulustesti tulemusena võib vanemluse välistada või kinnitada 99,9% tõenäosusega.

Meditiiniliselt etendab PCR suurt rolli diagnostikas. Üldsuse tähelepanu pälvis see meetod COVID-19 pandeemia käigus, kuigi haigustekitajate tuvastamiseks on PCR-i kasutatud juba aastakümneid väga lihtsal põhjusel. Nakkushaiguse korral on organismi sattunud patogeeneid ehk tõves-



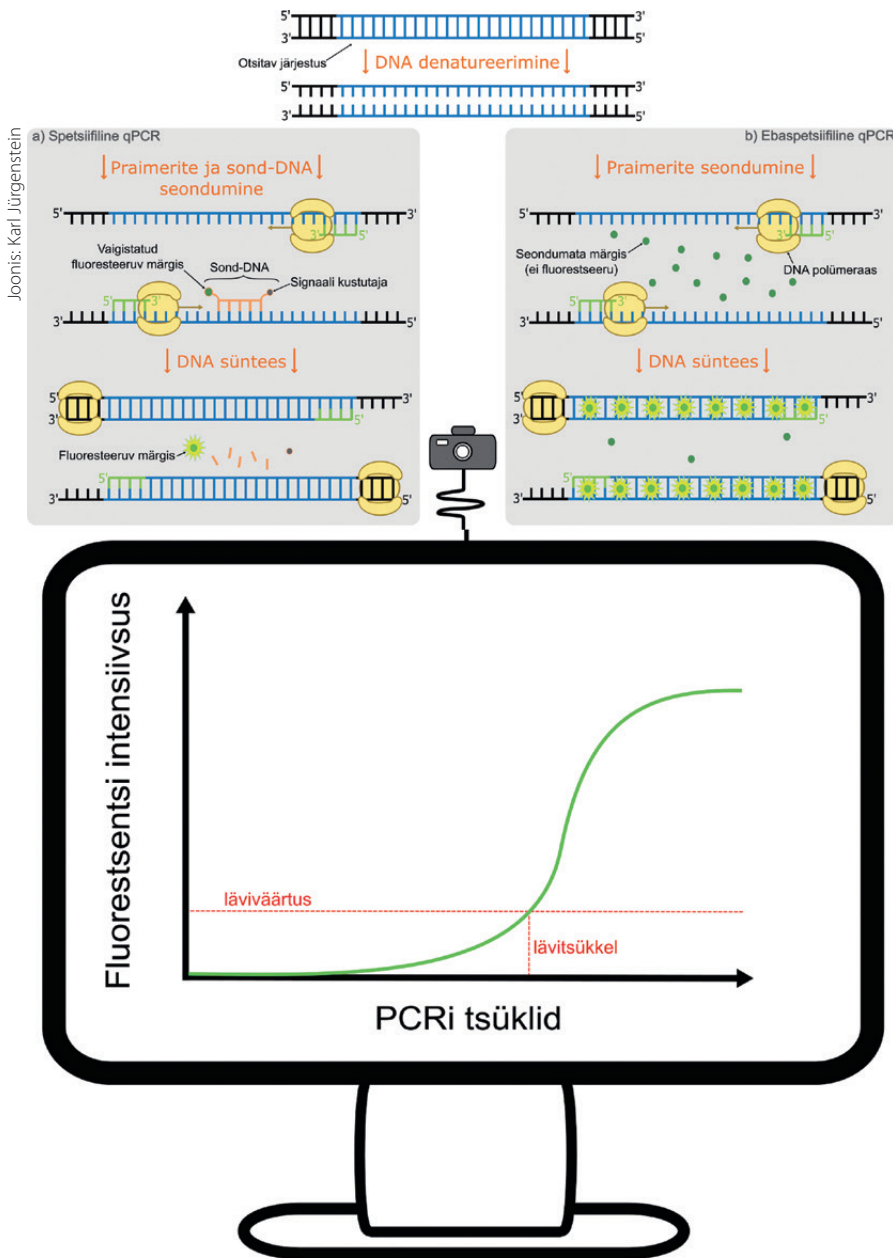
♦ 2. Vanemluse kindlakstegemine. PCR-iga on paljundatud viie inimese (ema, tütar ja kolm võimalikku isa) viis STRi-piirkonda ehk lookust (lookused 1–5); tulemust näeb geelelektroforeesil. Proovid on kantud geelil viiele kõrvuti asetsevale aluspositsioonile (tumedad vöödid). Kui DNA liigub elektrivoolu abil läbi geeli (joonisel ülevalt alla), eralduvad DNA-fragmendid (valged vöödid) üksteisest pikkuse põhjal (lühemad fragmendid liiguvad geelis kiiremini, st asetsevad joonisel allpool). Samal kõrgusel paiknevad vöödid tähendavad, et fragmendid on võrdse pikkusega. Vanemluse tuvastamiseks tuleb võrrelda ema, tütre ja isakandidaadi DNA-fragmentide suurust lookuste kaupa. Mida rohkem lookusi võrrelda, seda tugevam on analüüs. Kui kõiki lookusi võrreldes isakandidaati välistada ei saa, on suure tõenäosusega tegemist päris isaga. Kriminalistikas otsitakse sama meetodi- ga ideaalset kattuvust kahtlusosaluse ja näiteks kuriteopaigalt leitud DNA profiilide vahel. Geelelektroforeesi kõrval rakendatakse praegusajal kapillaarelektroforeesi, mis võimaldab määrata iga STRi-piirkonna täpse koopiarvu.

Vaadake joonist 2 ja proovige aru saada, milline kolmest isakandidaadist on tüdruku isa. Saatke vastus 23. novembriks e-postiga aadressil eestiloodus@loodusajakiri.ee. Õigesti vastanute vahel loosime välja Tartu ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudi meene.

tajad, mille paljunemine kutsub esile keha vastureaktsiooni. Bakterid, viirused, seened ja parasiidid on kõik patogeeneid, mille genoom koosneb nukleiinhapest, seega saab tõvestajapetsiifilisi praimereid kasutades PCR-i abil haigustekitaja olemasolu kindlaks teha. Haigustekitaja genoom on matriits, mille pealt DNA-d kor-

distada. Kui reaktsioon õnnestub ja fragmenti saab paljundada, võib eeldada, et patsiendilt võetud proovis sisaldub haigustekitaja geneetiline materjal ja seega ka haigustekitaja.

Mõnede viiruste, sh COVID-19 haigust põhjustava SARS-CoV-2 viiruse genoom koosneb DNA asemel RNA-st. Sel juhul tuleb PCR-i tehes



praimerist ei ole ta komplementaarne kordistatava fragmendi otsaga, vaid piirkonnaga selle fragmendi keskel. Ühtlasi kannab sond-DNA fluoresteeruvat märgist ja fluorestsentsi kustutatavat märgist.

Kuuludes sond-DNA koosseisu, paiknevad need kaks molekuli lähedikkude, ning valgust ei eraldu. Kui DNA polümeeras sünteesib PCR-i käigus DNA-d, lagundab see matriits-DNA-le kinnitunud sond-DNA, mistõttu eralduvad kustutaja ja fluoresteeruv märgis üksteisest ning märgiselt eralduvat valgust saab reaajas mõõta. Iga tsükliga muutub valgusintensiivsus tugevamaks, kuna fragmente, kuhu sond-DNA saab kinnituda, tekib järjest rohkem. Kui ületatakse kokkuleppeline fluorestsentsi läviväärtus, peetakse proovi positiivseks ning qPCR annab teadlasele lävitsükli väärtuse ehk tsükli, mille järel läviväärtus ületati.

See erineb tavalisest PCR-ist, kus teadlane analüüsib ainult kogu reaktsiooni ehk kõigi tsükli lõpptulemust. Väike lävitsükli väärtus näitab, et algses proovis oli palju otsitavat geneetilist materjali, suur lävitsükli väärtus tähendab, et otsitavat geneetilist materjali oli algses proovis vähe, kuid reaktsiooni toimumiseks siiski piisavalt. Kui läviväärtust ei ületatagi, on proov negatiivne.

Disainimaks sobilikke primereid polümeeraasi ahelreaktsiooni tarbeks, peab teadlasel juba enne eksperimenti olema informatsiooni sihtmärkjärjestuse kohta, mistõttu ei saa selle meetodi abil „pimesi“ DNA-fragmente paljundada. Samas on PCR äärmiselt tundlik meetod ja võib uuritava proovi väiksemagi saastumise korral võõrd-DNA-ga anda eksitava või ebamäärase tulemuse. Saame öelda, et kuigi seda meetodit saab kasutada mitmel moel, on polümeeraasi ahelreaktsioon üksnes nii hea, kui asjatundlik on teadlane, kes seda rakendab. ■

Karl Jürgenstein (1994) on Tartu ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia doktorant.

Sulev Kuuse (1962) on rakubioloog, Tartu ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudi vivaariumi juhataja.

◇ 3. Kvantitatiivne PCR ehk qPCR. See PCR saab teoks a) sihtmärkspetsiifilise sond-DNA-ga, millega seotud märgis hakkab fluoresteeruma, kui DNA-polümeeras lagundab DNA sünteesi käigus sondi ning fluorestsentsmärgis ja signaalkustutaja satuvad eraldi; b) kemikaaliga, mis hakkab fluoresteeruma kaheaheelise DNA-ga seondudes. Mõlemal juhul mõõdetakse fluorestsentsi intensiivsust iga tsükli järel. Tsükli, mille järel ületatakse kokkulepitud läviväärtus, nimetatakse lävitsükliks. Mida väiksem on lävitsükli väärtus, seda rohkem leidus algses proovis uuritavat nukleiinhapet

esimese sammuna sünteesida RNA-le vastav DNA. Selle jaoks kasutatakse ensüümi nimega pöördtranskriptaas ehk revertaas. Sellist meetodit nimetatakse kokkuvõtvalt RT-PCR-iks (ingl *reverse transcription PCR* – pöördtranskriptsiooni PCR).

Peale eelkirjeldatu saab viirust kindlaks teha veel ühe PCR-meetodi

edasiarenduse põhjal: kvantitatiivne ehk qPCR (ingl *quantitative PCR*) võimaldab reaajas jälgida PCRi-saaduse teket. Reaktsioonisegusse tuleb lisada kas spetsiaalset kemikaali, mis hakkab kaheaheelise DNA-ga seondudes fluoresteeruma, või sond-DNA-fragmente (◇ 3). Sond on üheaheeline DNA, kuid erinevalt