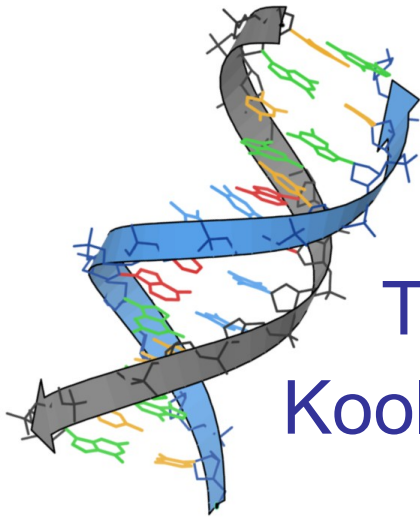


Ülevaade DNA-st ja isiku tuvastamisest



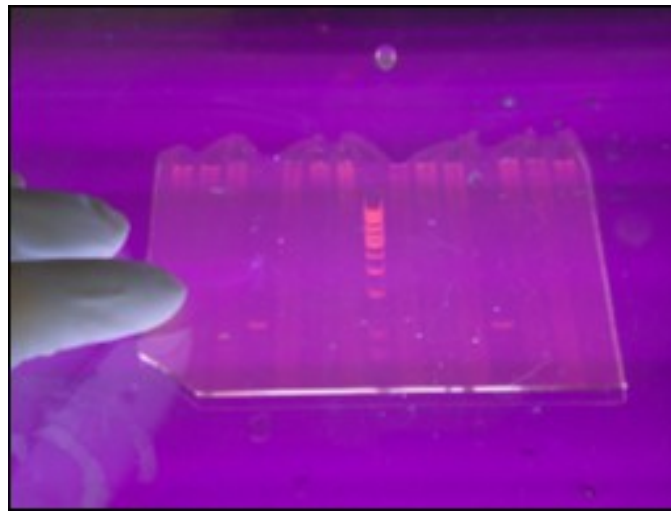
HITSA veebiseminar

Urmas Tokko,

Tartu Tamme Gümnaasium,

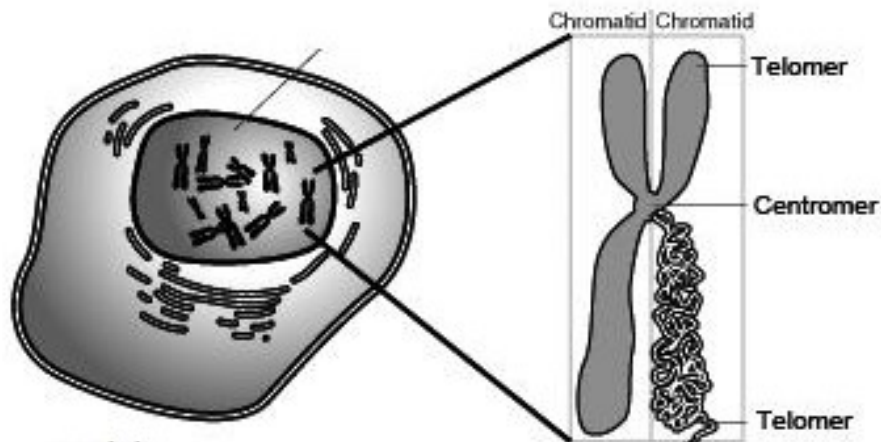
Koolielu bioloogia ainemoderaator

tokko@tamme.tartu.ee



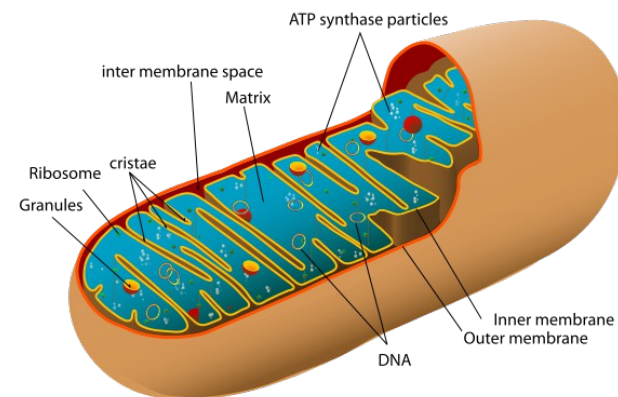
29. oktoober 2014

kromosoom



rakk

mitokonder



DNA
aluspaar

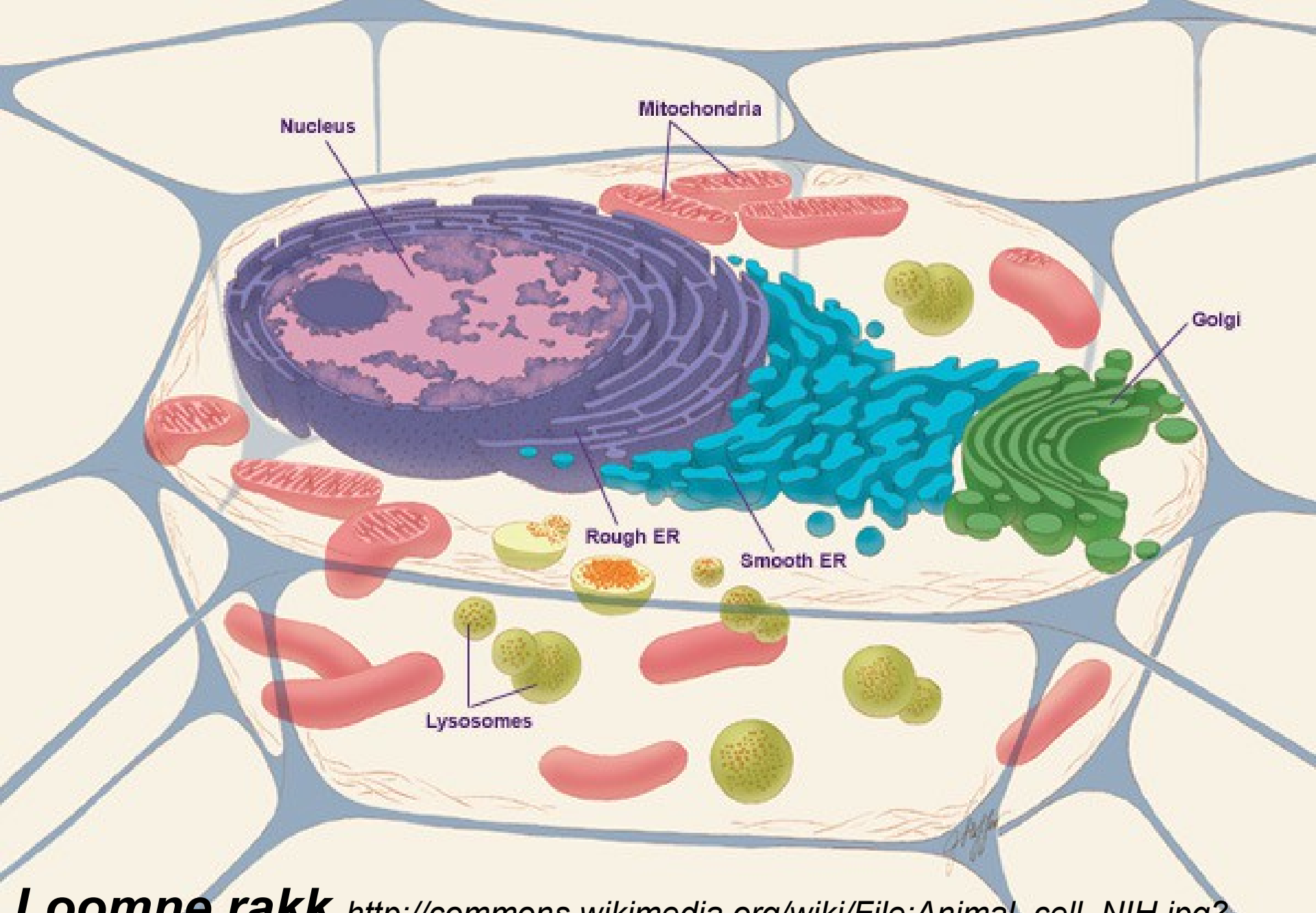
valgud

DNA-
Doppelstrang

DNA
kaksikspiraal

http://commons.wikimedia.org/wiki/Mitochondrion#mediaviewer/File:Animal_mitochondrion_diagram_en.svg

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chromosom_Chromatide_Feinstruktur.png?uselang=et



Nucleus

Mitochondria

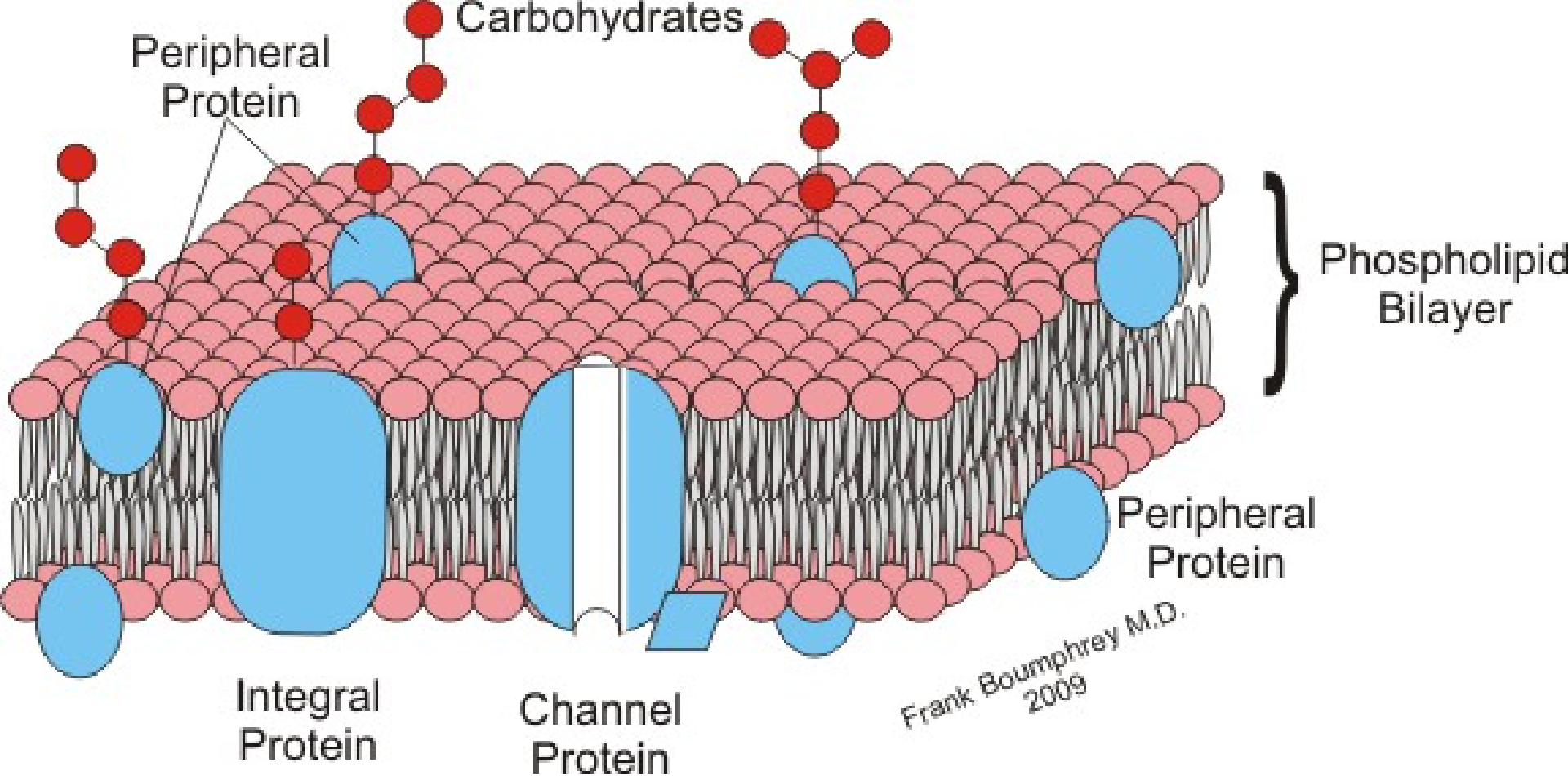
Golgi

Rough ER

Smooth ER

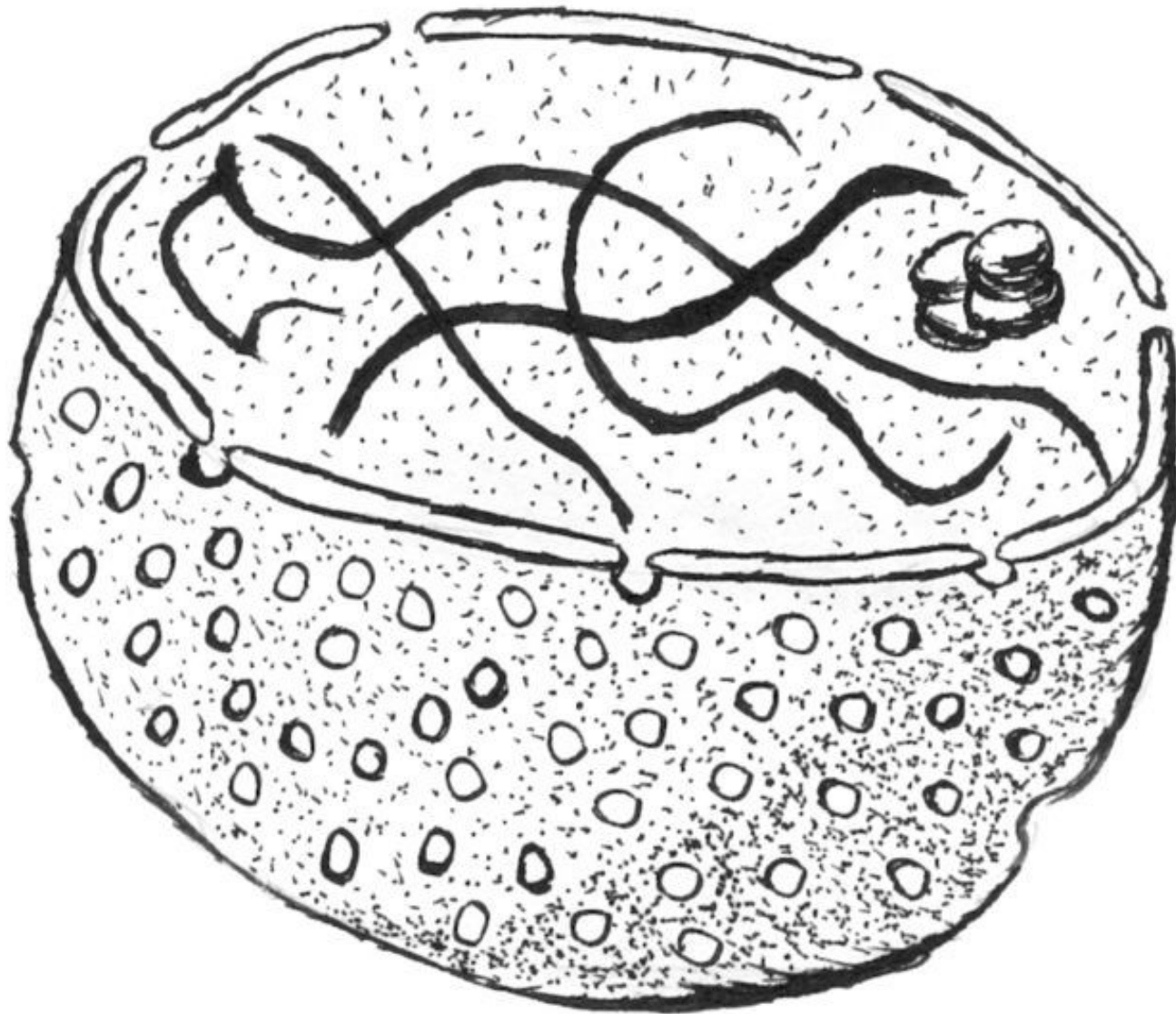
Lysosomes

Loomne rakk [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Animal_cell_NIH.jpg?](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Animal_cell_NIH.jpg?uselang=et)
uselang=et



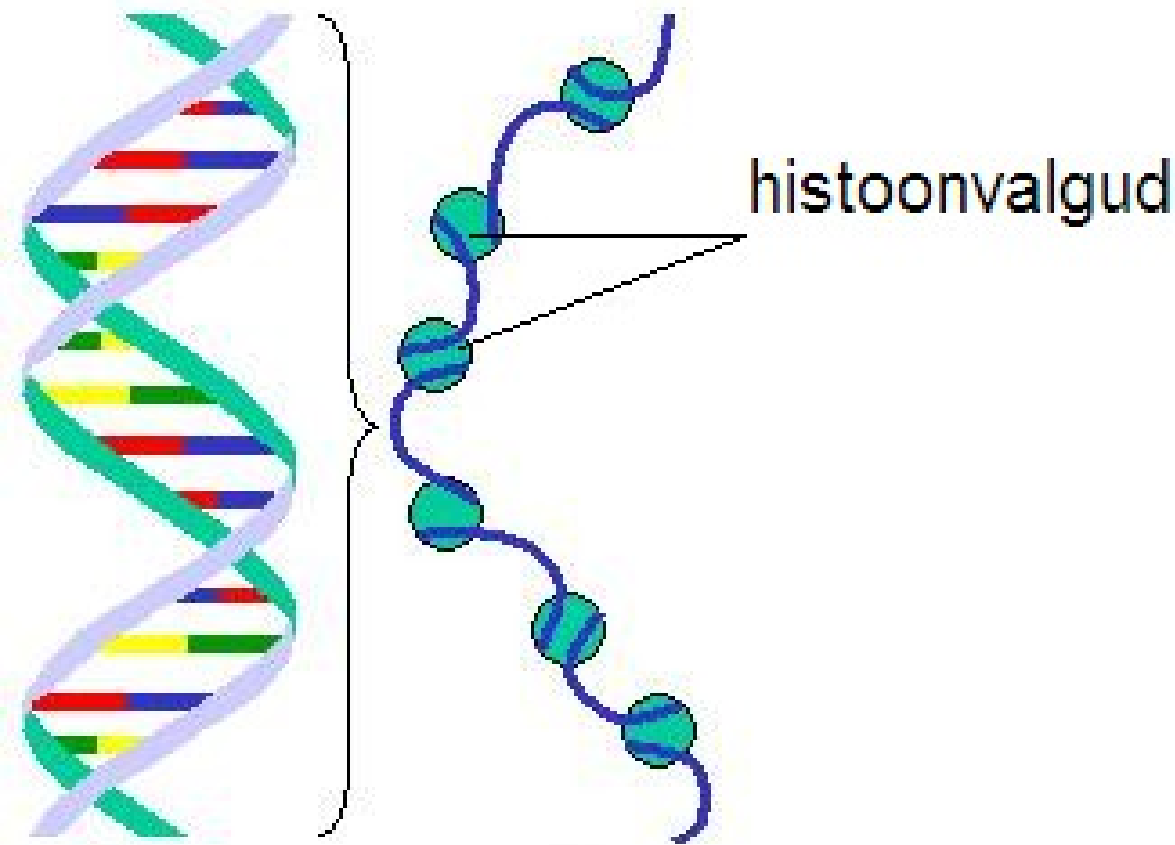
***Rakumembraan, molekulaarne ehitus
(fosfolipiidide kaksikkiht, valgud)***

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cell_membrane3.png



Rakutuuma skeem:
kahekordne membraan, poorid, kromosoomid

<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Nucleus.jpg?uselang=et>

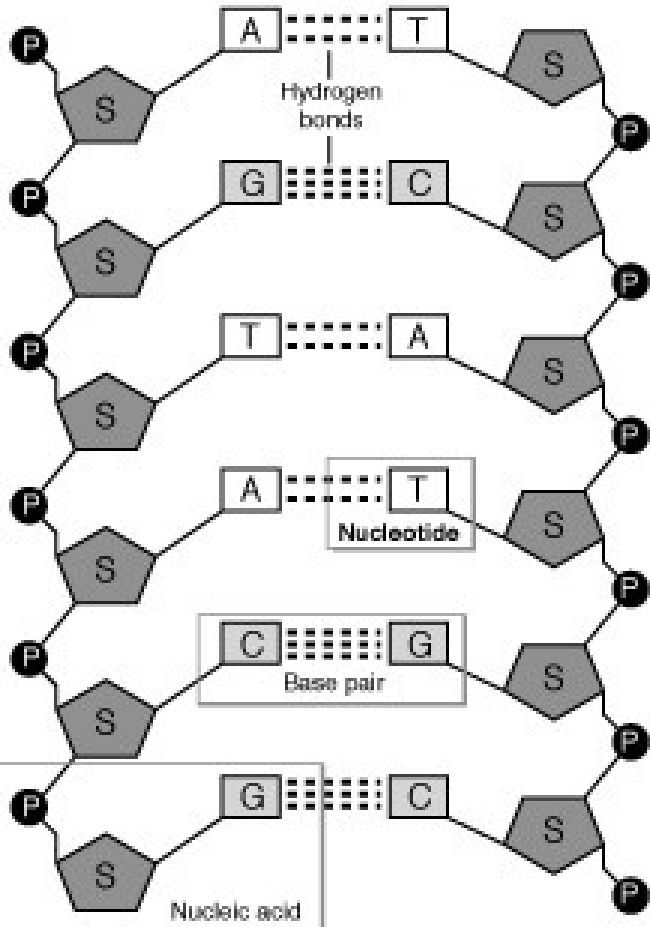


DNA

DNA kaksikspiraal pakitakse
valkude abil kokku, tekib nn
superspiraal

DNA koosneb nukleotiididest

5' ph
3'



Nucleot

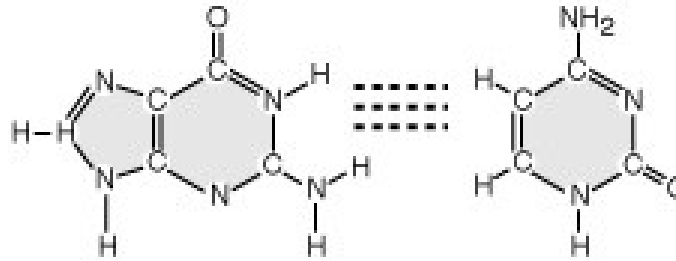
G

Guanine

Guaniin

Cytosine

Tsütosiin



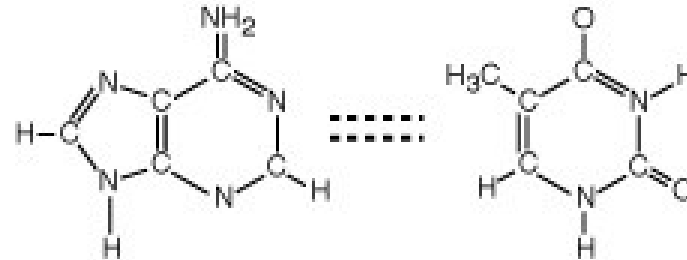
A

Adenine

Adeniin

Thymine

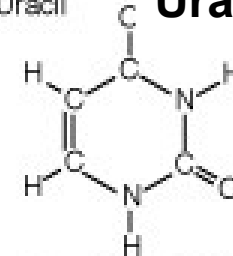
Tümiin



U

Uracil

Uratsiil



replaces Thymine in RNA

L
Ä
M
M
A
S
T
I
K
A
L
U
S
E
D

Pärilik info seisneb DNA nukleotiidses järjestuses

Igas inimese rakus on ca 3 meetrit DNA-d, ehk umbes 3,3 miljardit nukleotiidipaari (aluspaari – *basepairs* – *bp*). Selles on kirjas inimese kõikide valkude ehitus.

DNA on jaotatud kromosoomidesse. Inimesel on keharakkudes 46 kromosoomi, sugurakkudes 23

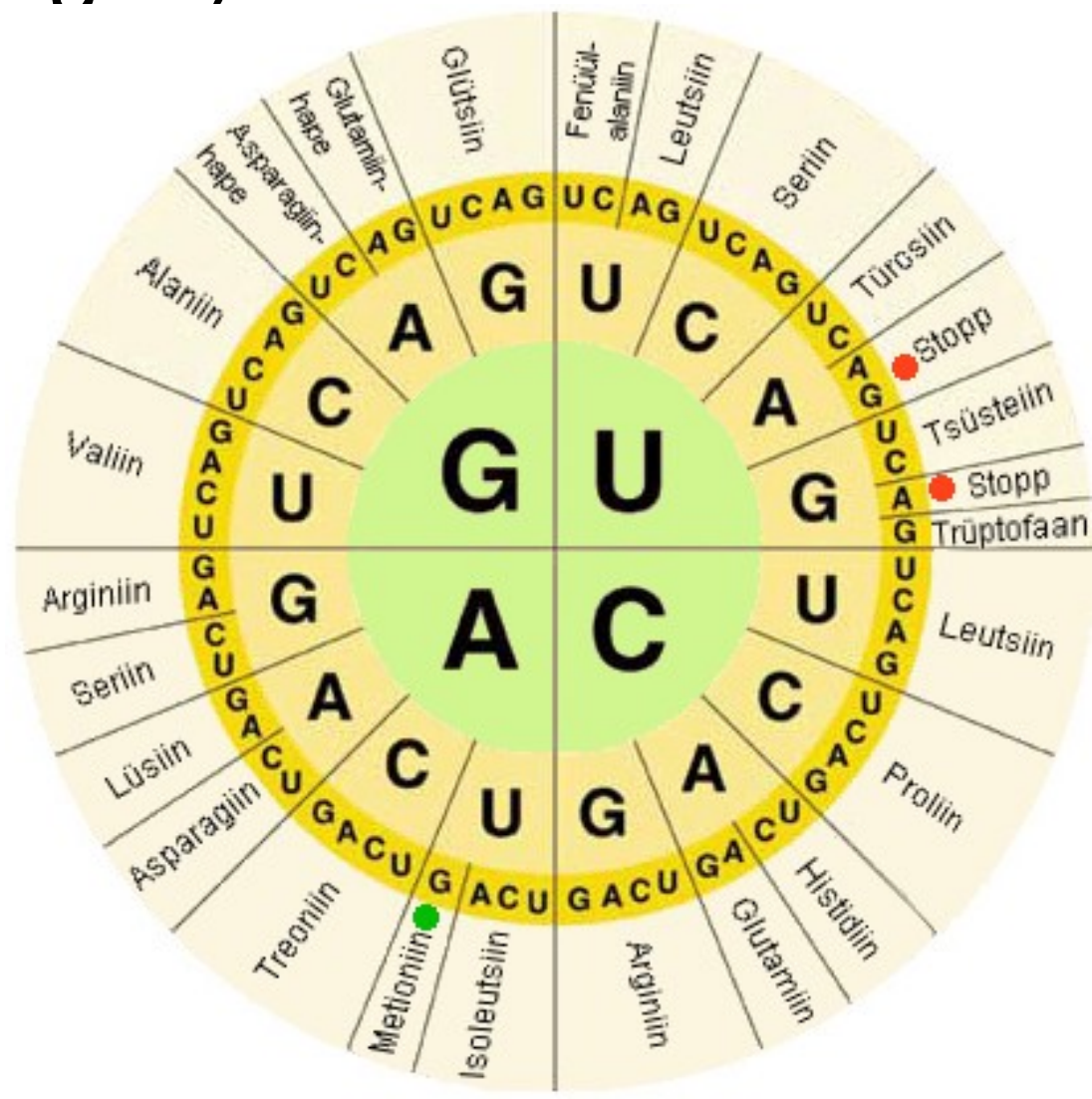
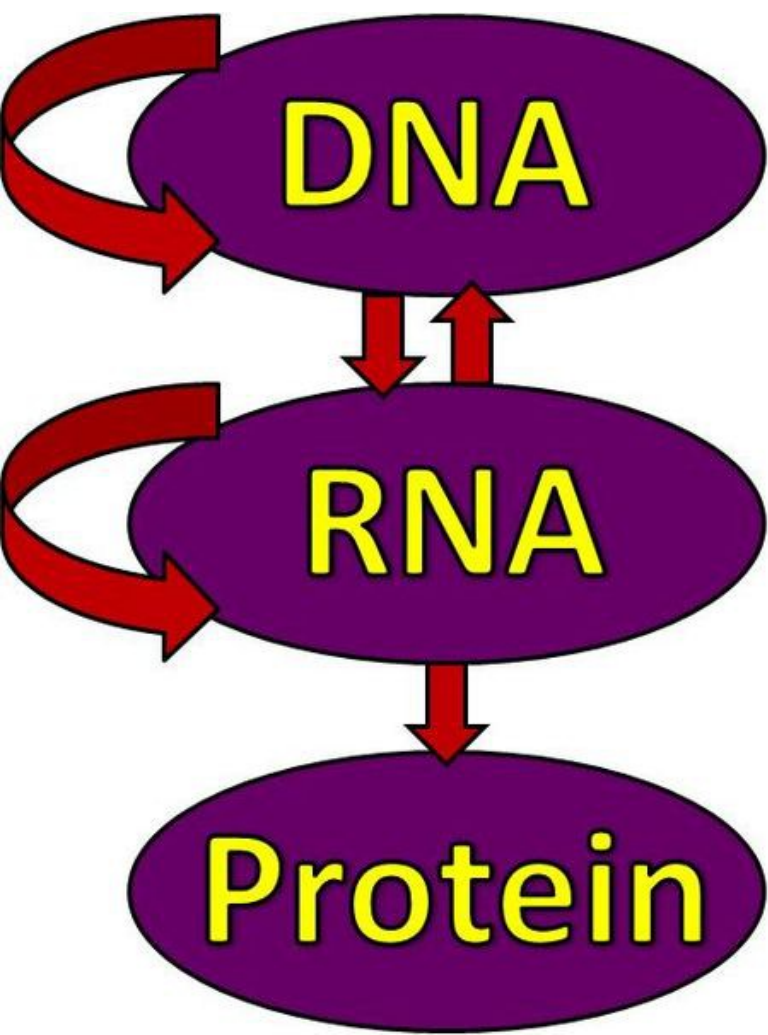
Üks kromosoom koosnebki ühest DNA molekulist, mis on pakitud paljudele valgumolekulidele

Nukleotiidi nimetus vastab selle koostises oleva lämmastikaluse nimetusele

GAATTC TCTTTGGTATCCAATGAAGAAATCGAATCCATACCCATAGCTATAAAAAACAT
TTCAGGAGAAAATAAGACCGAAGCTGCTCAATTAGGCGCAATTGATTCGTTTTCAAAAAT
GTGAAACTTGCCAGCTTACTTCGGCATGTCCTGGTCATTTTTGGAAAATTTTCATCTTACT
CAACCATTATTTAAAGTCGCATTTAAAAAACTTGTTGAAAATATTTTTAAATATACTTG
TTCTTTCTGTGGTGGCTTTACAAAATCTTGAACCTTCTGGAATTGATCAAGCAGATAGACG
AACGAAATACTGGAATAACAGTTAAAGATCGTGCTGCTTTTTAAAAAAATTTTAGAAGCT
ACCAAACAAGCAAATTCAGTGTATTGCACCTAATTGCCAAAAACAAGTCTCTCCTTT
ACAATATTCGAAAAATAATAACTTTATATATAATTCCGGTACTACAAAGGGTATAGTTT
TGGATAACAGGCATGTGTTTAATATCTTACAAAATCTTCCACAAACGTTTAAATTATTG
TTAACCCCTTCGAATGCTCATCAAATCGTATCTCCCGAAAATGTCTTTTATGCTAATAG
TATCTTACTTCCACCACATAATCTACGAACTATCAATGTTTATGATGGTCAGGTTACGA
GTTTGTAAACAAGTGATTTGAATCTGATAATGCGAAGAGTTGCTAATAATGAGACAAAT
GCAAAAATACAAAAAATCTTGGATTCTATCGATAACAGCCGAGGTGCCAATCCATATGC
TACAAATAAAAAGCTTACTTTGGATACTTTGACAGGTGGACACTCAAAGAATCTTATT
TGCGAAGTTATATTAATGGCAAACGTATTCCTGAGACTGCCAGAGCTGTAATCGAACCC
TCTATGAATAAAACTGGCTTTATTGAAGTACCATCTTACATTTTAAACAAGTTAAGAGA
TGTTGTCTTTTATAATCACGTTACGAAAGATAACATACTCAAAGTCTTCAAACGAAC
AAGCTTTTCTAACATATATCAAAGTGATCATAATTCTGAAAATCCTTATATGGTTTAT
GATTTAGCACAGAAGAATGGATATTTAACCTTGGCTCCTAATTTTCGGTGATATTTTCGA
AAAAGGAAAGAGGAAGGTGGTTTTGTAACTATTTGCAGACATCCATCTATCTGGTTAA
CTAATATCCAATCTGGTATAATAAAAAGATCAGAAGGGTTTACTATTAACATCCCAACC
ACAATTTGCACATCTTTTAAATGCTGATTTTGATGGAGATGAGATGACAATATATTCTTT
CAAATCCCCATGTGCCAATCTCGAACAAAGCTTTGATTATGAACTCACGAAATCTCTTCA
AAAATTCTATAACAAGCAATCCAATGTTCCGGCTTGGTCCAAGATCAAATACCAGCCTTG
AATAAGTTATATAGACGACAAAATTATACATATAACGATGCGTTGGTGATTTTAGGACA
ATTCGGATTTCTGTAAACACCTGGAAAAGATAATTATACCGGAAAAGATATACTTTCTT
GTGTATTTCCAAAACATTATACACTCAAAGGAATTGTTGAAAATGGCGAACTTATTTTG
GAGAATTTTACAAATAAACTCGTTTTCCGCAAATTCCTCAAAGTCCATCTTTGGGCATCT
TGTTTTATTTTATGGACAAGAGTATTCCTTTGACTATATTGGATACAATTCGAGATATTC
TTCAAAAATTTATACACAATTTGGTTTCAGTGTAAAAATCCGAGATATGATCCCAAGC

Lämmastikaluseid on DNA-s 4 erinevat: A, T, C, G

DNA nukleotiidide järjestus määrab valgu ehituse (aminohapete järjestuse proteiinis/valgus) - ...tunnuse



DNA eraldamine süljest, **töövahendid**

- katseklaas (kitsas plasttops, vms)
- keeduklaas (klaas/tops)
- nõudepesuvahend/detergent (*Fairy*)
- hambatikk vms (segamiseks)
- keedusool (NaCl)
- vesi
- jäävann (või külmiku külmkamber)
- 70-kraadine piiritus (kange viin)

DNA eraldamine süljest (praktiline töö)

1. Enne katset ärge mäluge nätsu ega sööge vähemalt 30 minutit.
2. Valmistage umbes 18% line NaCl lahus (18g NaCl + 82g vett)
3. Eraldage/sülitage ca 1-2 ml süolge katseklaasi (kitsasse plasttopsi)
4. Lisage 2-3 tilka Fairyt, segage hambatikuga ca 2 minutit
5. Lisage oma proovile 1 ml 18%-list soolalahust, segage
6. Lisage jääkülmas hoitud 60-70 kraadist piiritust, valades ettevaatlikult **mööda katseklaasi seina**, et tekiks eraldi sültjas/niitjas kiht
7. See suhteliselt läbipaistev hõljuv ollus katseklaasi ülaosas ongi Teie DNA

Inimeste DNA erinevus

- Genoom on umbes 99 % kõigil inimestel sama
- Umbes 1% protsent erinevusi teeb meid üksteisest erinevaks ning seega võimaldab isiku tuvastamist

DNA erinevused:

- 1) nukleotiidse järjestuse polümorfism
- 2) (DNA teatud lõikude) pikkuspolümorfism

DNA järjestuse polümorfism

- Kindlas DNA järjetuse kohas on erinev(ad) nukleotiid(id), nt SNP ehk *Single Nucleotide Polymorfism* (~10 millionit SNP-d inimese genoomis)

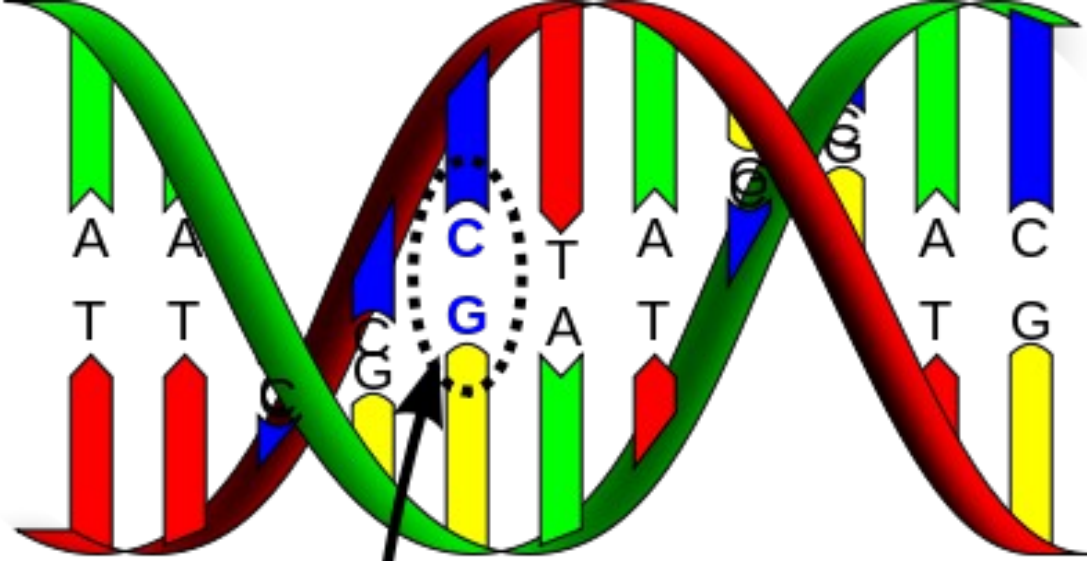
Näiteks:

Isik nr 1: ATGCA**T**GC

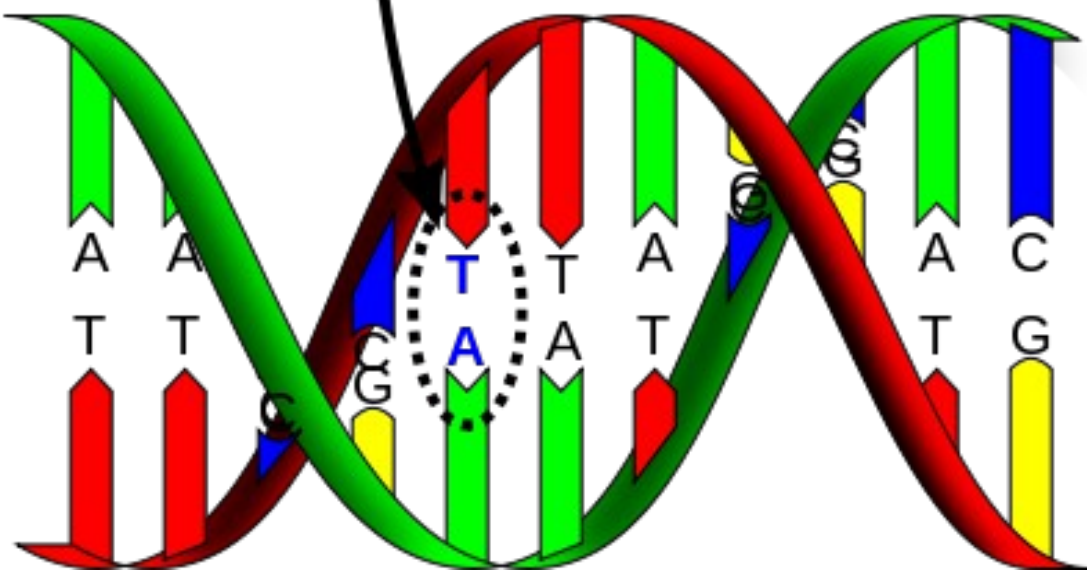
Isik nr 2: ATGCA**A**GC

Isik nr 3: ATG**G**AAGC

* *Polümorfism – mitmekujulisus; varieeruvus isenditi*



SNP



<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/2e/Dna-SNP.svg>

DNA pikkuspolümorfism - samasuguse

järjestusega DNA lõigud korduvad erineval arvul

- Pikad kordused ehk satelliit-DNA: sadu ja tuhandeid nukleotiide (ühes korduses)
- Keskmise pikkusega kordused ehk minisatelliidid (VNTR): ~10 – 100 nukleotiidi
- Lühikesed kordusjärjestused ehk mikrosatelliidid ehk **STR** (*Short Tandem Repeats*): ~2 – 6 nukleotiidi
- * kõik korduvad järjestusühikud ei pruugi olla täpselt sama nukleotiidse järjestusega või sisaldada täielikku kordusühikut, kuid isikute eristamisel on oluline nende lõikude pikkus

Tuvastamisel just STR eelistatud

Näiteks, kordusühik (STR): “AGAA”

Isik nr 1: (AGAA)(AGAA)(AGAA) – 3X

Isik nr 2: (AGAA)(AGAA)(AGAA) (AGAA) – 4X

Inimese DNA-s on kirjeldatud tuhandeid polümorfseid mikrosatelliite (STR järjestusi), nad on jaotunud suhteliselt ühtlaselt üle kogu genoomi ja esinevad keskmiselt iga 10 000 nukleotiidi järel

(mäletate: kokku on inimesel 3 300 000 000 nukleotiidipaari) .

DNA piirkond ehk lookus (vrd: DNA lõigu “aadress”)

- Isikutuvastamiseks kasutatavad lookused on standardiseeritud, neid rakendatakse üle maailma
- Nende hulgas on isikuti varieeruvamaid ja vähem varieeruvaid
- Võrreldakse ca 10 erineva (Eestis kohtuekspertiisis 15) kromosoomipiirkonna/DNA lõigu pikkust, mitte kogu DNA järjestust

**NB! Inimese vere punaliblel pole tuuma/kromosoomi, seega ei saa neid isiku tuvastamisel kasutada. Verd aga küll.*

***Leitud DNA võib olla juba osaliselt lagunenu ega võimalda isiku tuvastamist. Siis tehakse tuvastamine mitokondri SNPde abil (nt USA “9/11”).*

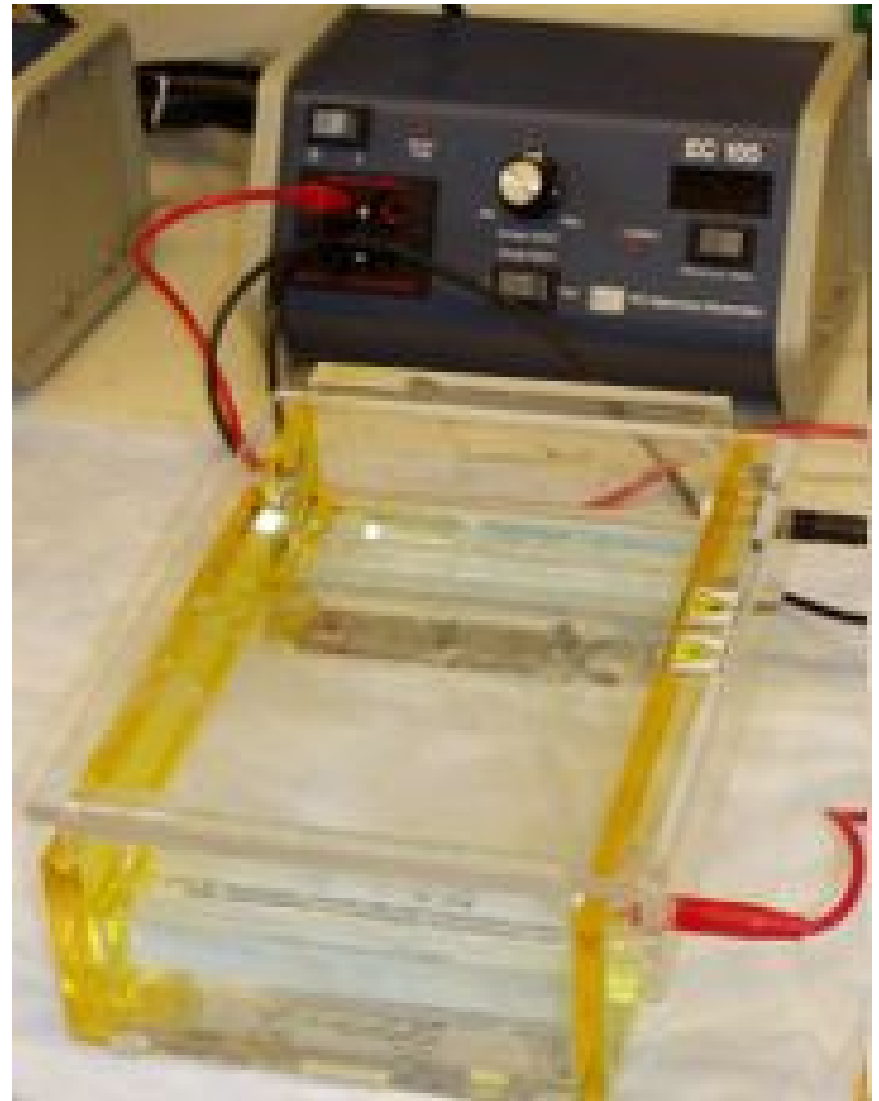
DNA tüpiseerimise ehk profileerimise peamised etapid

- Proovi (luu, sülg, veri, ...) võtmine
- DNA eraldamine muust rakulisest materjalist
- DNA koguse ja kvaliteedi hindamine
- DNA teatud lõikude paljundamine PCR meetodil (polümeraasi ahelreaktsioon, sellest pärastpoole)
- Elektroforees – eri pikkusega DNA lõikude eraldamine geelil
(satelliidid otse geelile, kuid SNPdele tehakse ensüümidega tihti restriksioon, et määrata SNP)
- Tulemuste analüüs, isikute ja/või leitud DNA võrdlemine

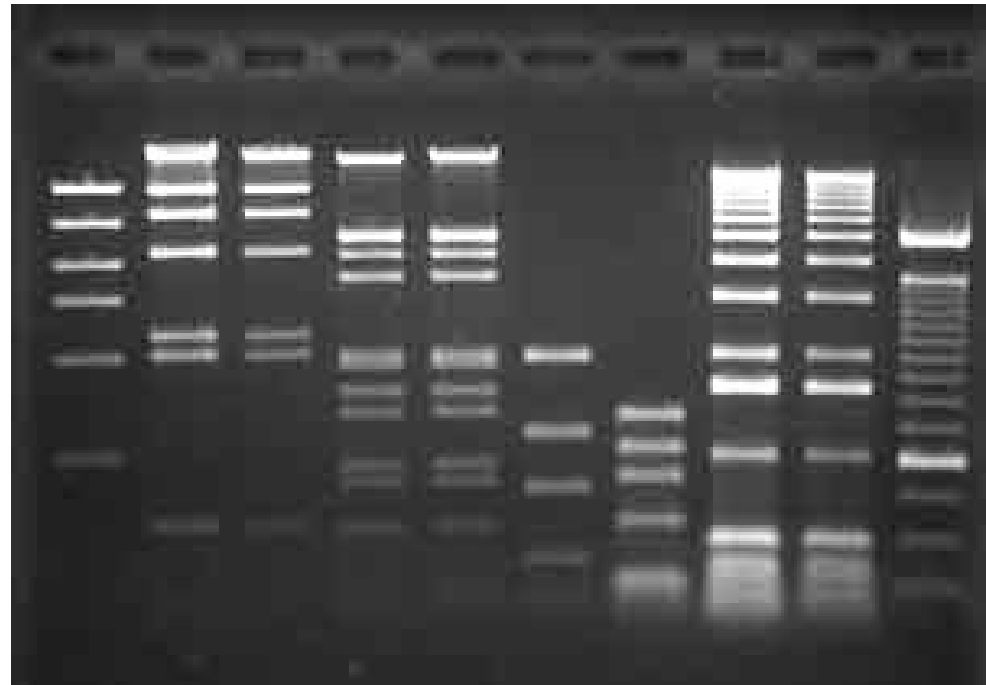
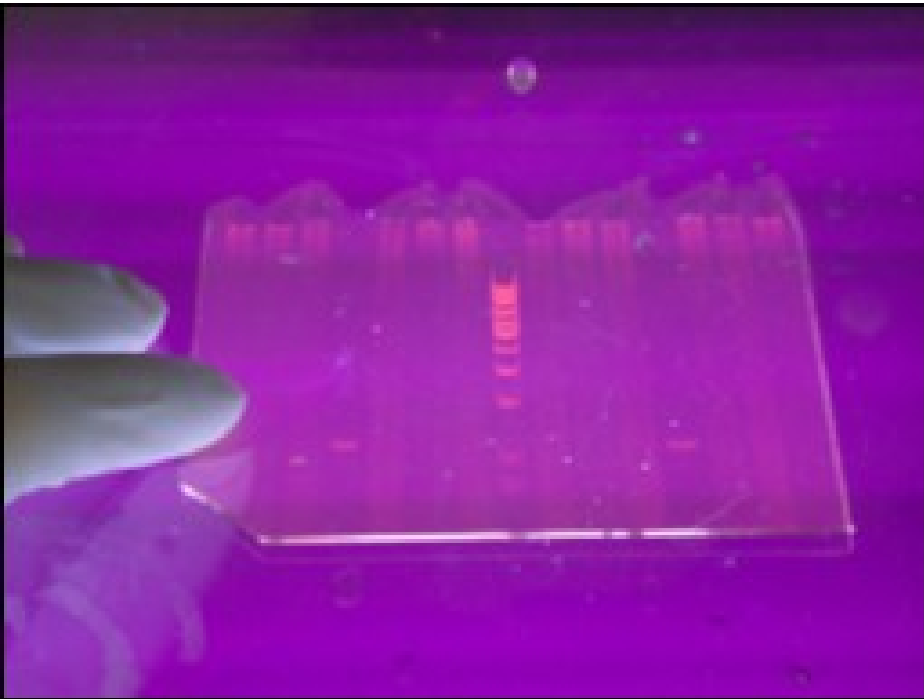
Geel-elektroforees

- DNA proov kantakse geeli “hambasse”
- Elektroforeesil (suunatud liikumisel elektriväljas) liiguvad eri pikkusega DNA järjestused erineva kiirusega, lühemad kiiremini
- Võrdluseks liiguvad geelil ka standardsed pikkusmarkerid (mille pikkus, nukleotiidide hulk on teada)
- Kasutatakse ainult DNA-ahelale seonduvat fluorestseeruvat värvi, mis võimaldab neid elektroforeesijärgselt detekteerida (*õppelaboris nt etiidium-bromiid, EtBr*).
- Eri pikkusega DNA lõikude kogumikele vastavad kriipsukesed (“bändid”) geelil või sellest tehtud pildil

- Geel asetatakse elektroforeesivanni
- DNA proov kantakse geeli “hambasse”
- DNA on negatiivse laenguga, liigub positiivse elektroodi poole
- Väiksemad/lühemad lõigud kiiremini - kaugemale



UV-kiirguse abil näeme lahutatud DNA-lõikude “bände” (umbes tunni aja pärast)



Saame isikute sarnasusi või erinevusi näha ja võrrelda

Decreasing
Fragment Size

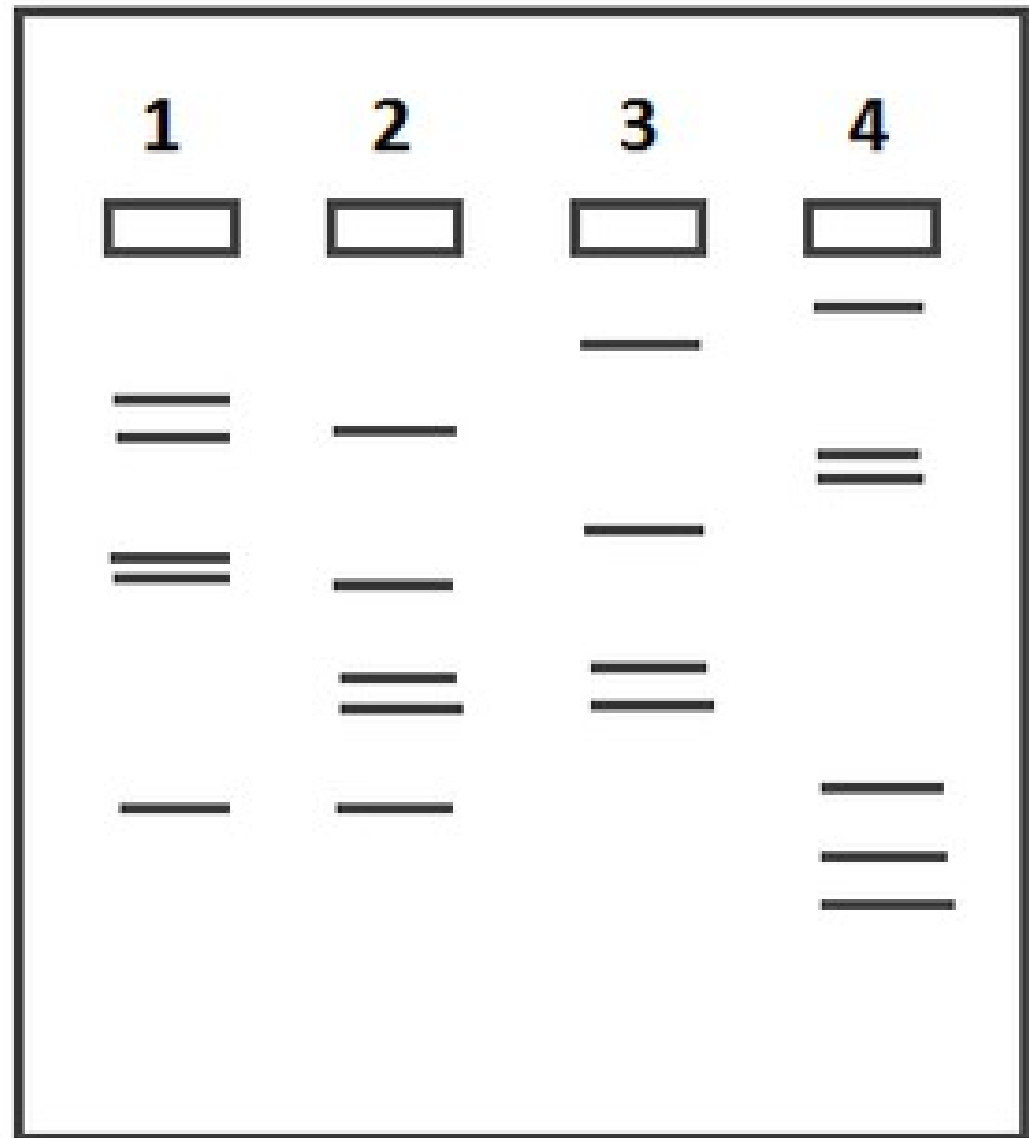


Lane 1 Mother

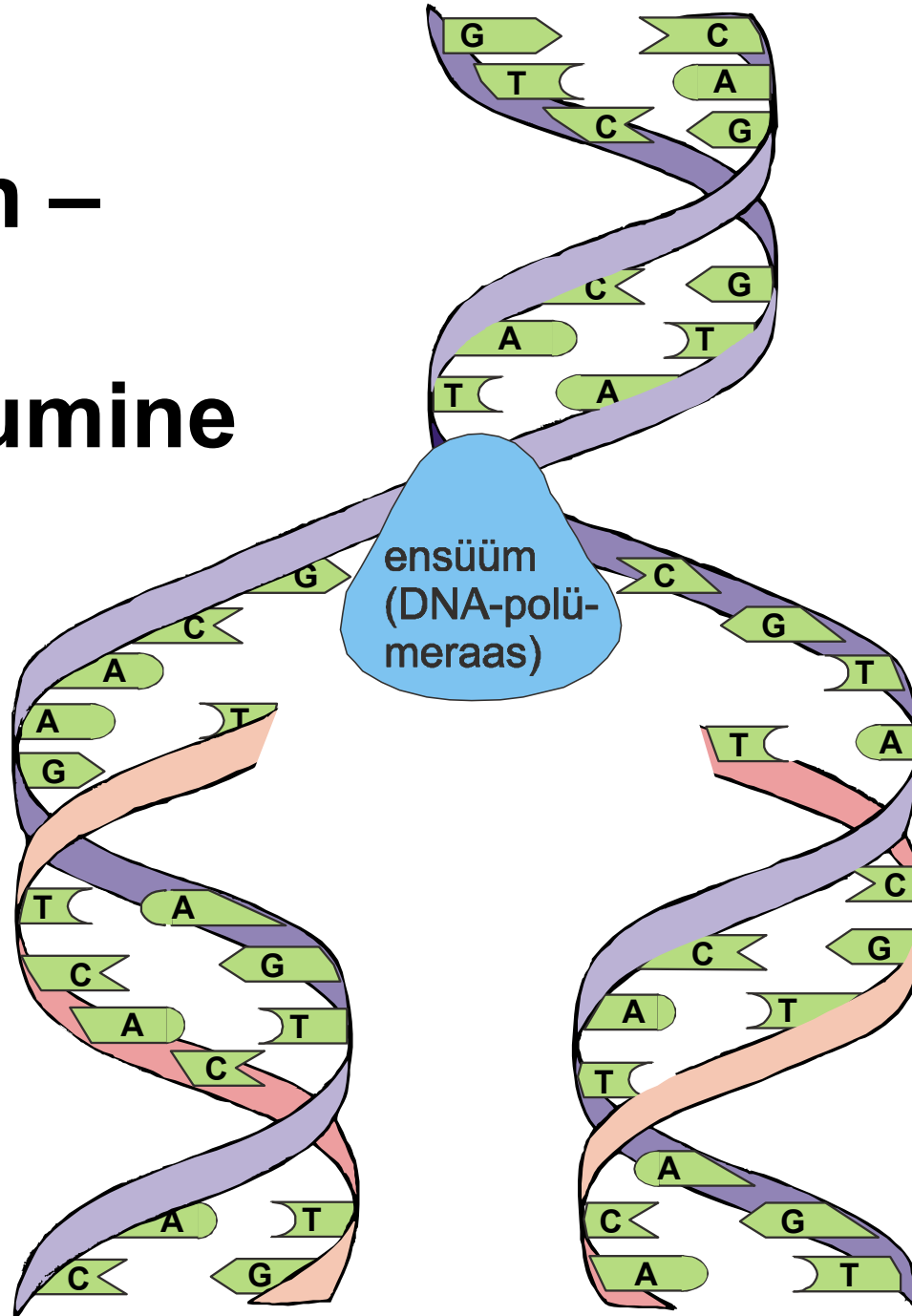
Lane 2 Child

Lane 3 Father

Lane 4 Unrelated

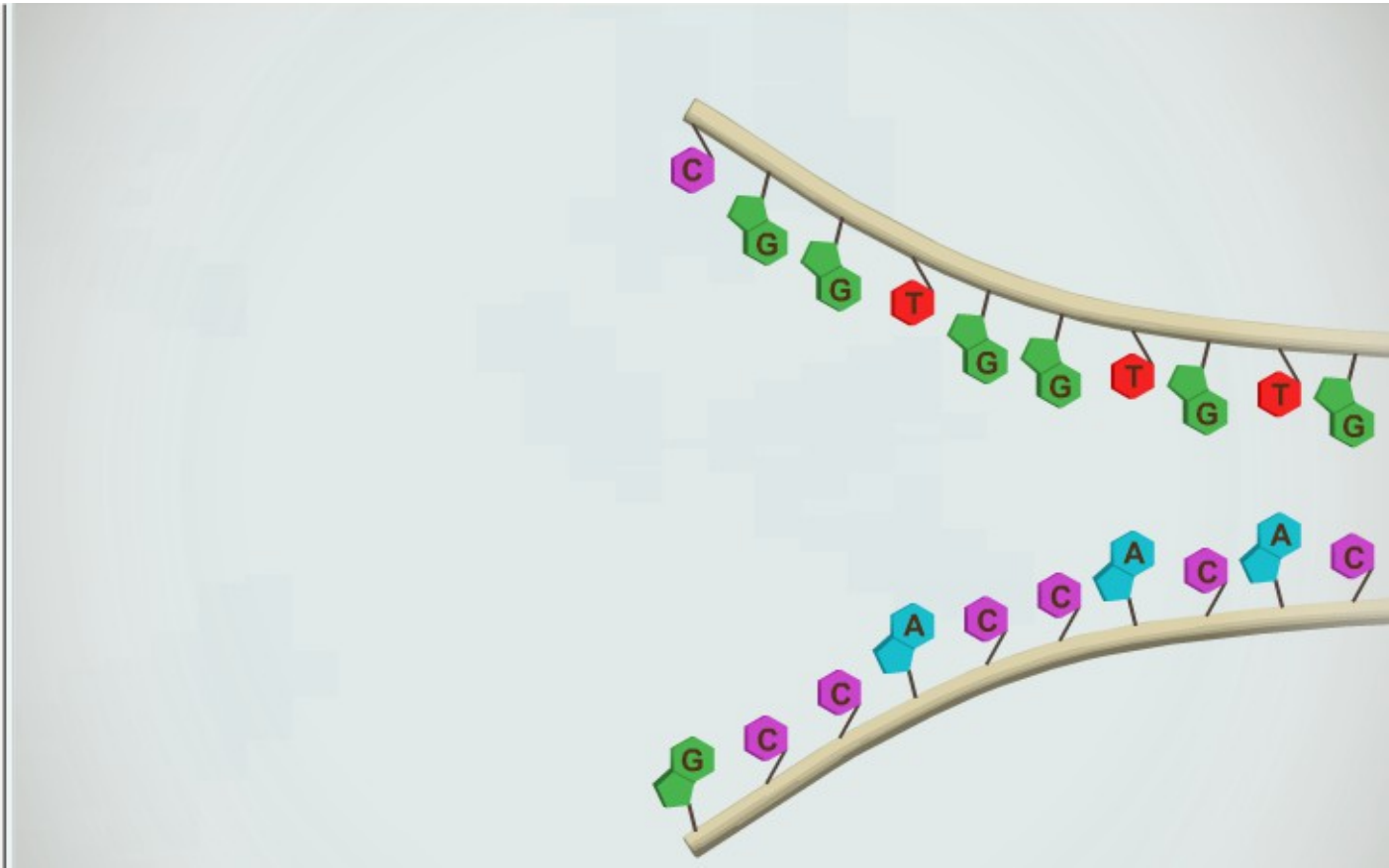
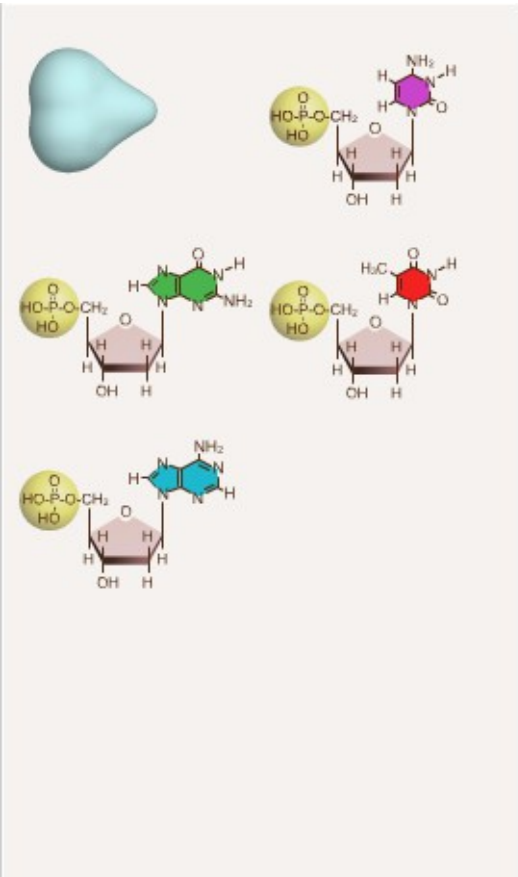


DNA replikatsioon – DNA kahekordistumine



Harjuta DNA kahekordistamist

http://bio.edu.ee/models/models/model_noframes.php?code=replik&name=R



PCR – polümeraasne ahelreaktsioon

- PCR – *polymerase chain reaction* – on laialdaselt kasutatav meetod mingi kindla DNA lõigu paljundamiseks
- Mitmeetapiline DNA süntees, kus eelnevates etappides sünteesitud ahelad on aluseks uute ahelate tootmisele järgnevates etappides (ahelreaktsioon)
- Paljundamine toimub eksponentsiaalselt: 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128..., pärast kolmekümnendat tsüklit (umbes kahe-kolme tunni pärast) oleme ühest molekulist saanud juba $2^{30} = 1\,073\,741\,824$ DNA lõiku

PCR-I vajalikud komponendid

- uuritav DNA, mille piirkonda soovitakse paljundada
- nukleotiidid (kõiki nelja erinevat) – uute DNA ahelate moodustamiseks
- DNA-polümeraas – ensüüm, mis sünteesib DNA-d
- praimerid - lühikesed DNA lõigud, mis piiritlevad paljundatava piirkonna kogu DNA-st, märgistavad sünteesi alguskoha
- puhverlahus (ja Mg^{2+} ioonid) – sobivaks reaktsioonikeskkonnaks

Erinevaid praimereid (*primer*) saab sünteesida vastavalt soovitavale DNA lõigule.



PCR-masinas toimub DNA uuritavate lõikude paljundamine tänu pidevale temperatuuride vaheldumisele:

95°C - DNA denatureerub

55-65°C - praimerid paarduvad

72°C - DNA-polümeraas
käivitab DNA

kahekordistamise.

See tsükkel kordub
masinas 25-35 korda.



Vaata PCR videot

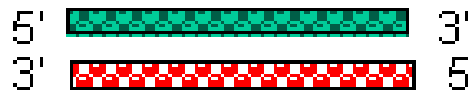
PCR käik:

<http://www.youtube.com/watch?v=iQsu3Kz9N>

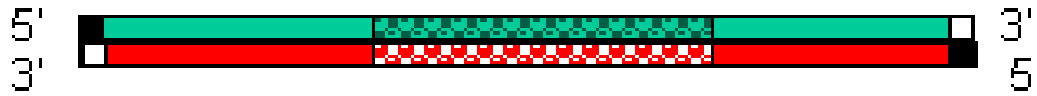
Humoorikas laul teadlastelt - nii oluline
protsess! 😊

<http://www.youtube.com/watch?v=x5yPkxCLads>

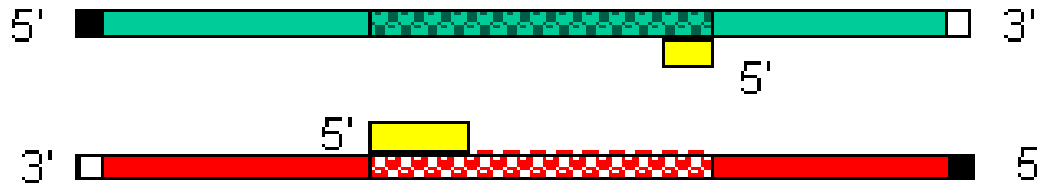
Fragment, mida
tahetakse paljundada



PCR



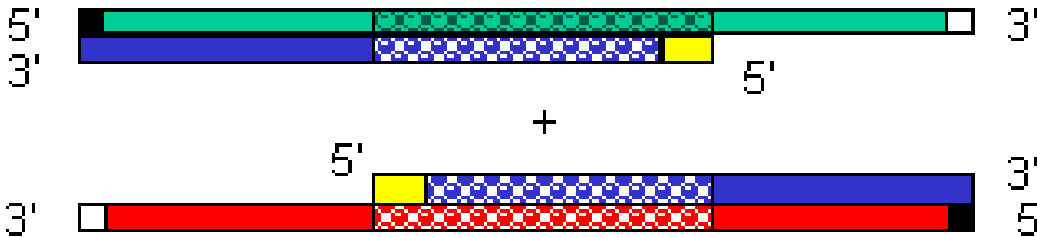
Kuumutamisel 95-ni
DNA denatureerub



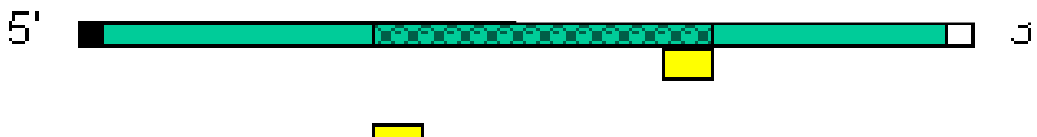
Praimerid ühinevad
madalamal temp-l

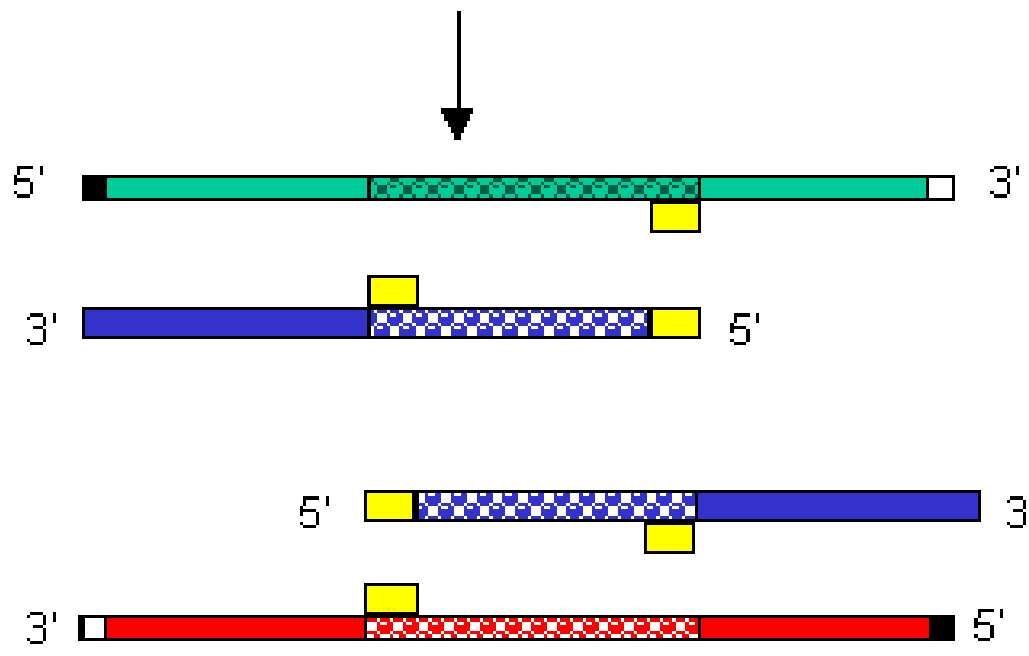


DNA-polümeraas saab replikatsiooni
alustada ainult 3` otsast

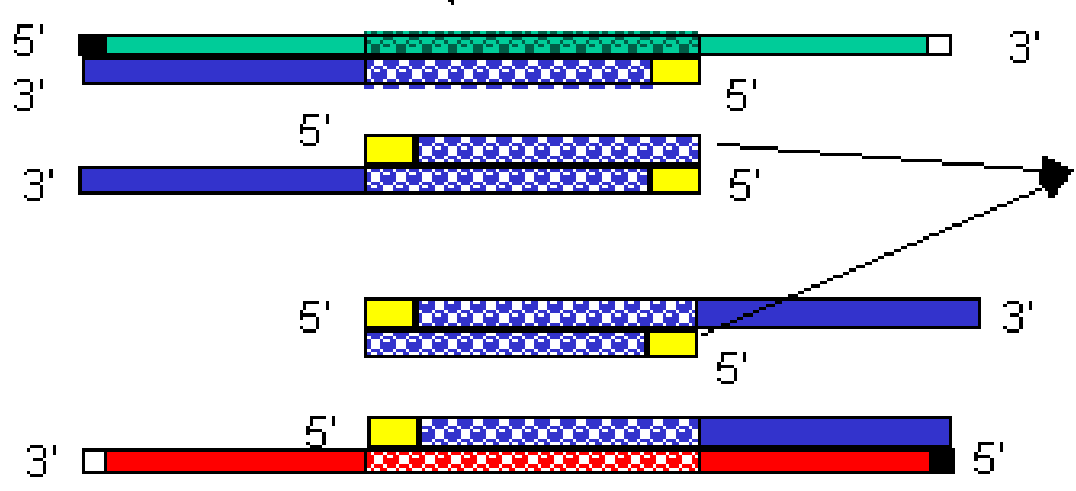


Kuumutatakse 95 –ni, DNA denatureerub





DNA-polümeraas replikeerib,
alustades 3`otsast



Need 2 fragmenti
on esimesed
tulemused.
Tsükli korratakse
34X, saadakse
~30 miljonit koopiat

Uurige lisaks

- Aaspõllu, A 2007. Pärilikkusaine DNA eristab meid teistest ja üksteisest, <http://www.horisont.ee/node/205>, “Horisont” 5/2007
- Genetics 101 (Part 2 of 5): What are SNPs? <http://www.youtube.com/watch?v=tJjXpiWKMyA>
- Tehnoloogiad kohtuekspertiisis: <http://veebiakadeemia.ee/puramiidi-tipus/tehnoloogia>
- DNA Fingerprinting Methods: <http://www.fingerprinting.com/dna-fingerprinting->

Tänu

Täna Kersti Veskimetsa, kelle koostatud
slide on esitluses osaliselt kasutatud (
<http://www.ebu.ee/esitlus/Rakendusbiol.ppt>),

ning

Kaarel Krjutškovi abistavate nõuannete eest!

Viited

- atgc2022, DNA, the Molecule of Life, Rakutuum, kromosoom, DNA -
<https://www.flickr.com/photos/10300240@N06/1008803778/in/gallery-58416026@N06-72157625840662>
- tpc2f, DNA structure:
<https://www.flickr.com/photos/58391088@N02/galleries/72157625715060087/>
- M. Manske, PCR-machine:
http://commons.wikimedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction#mediaviewer/File:Pcr_machine.jpg
- LadyofHats, Mariana Ruiz derivative work , DNA replication blank,
http://commons.wikimedia.org/wiki/Category:DNA_replication#mediaviewer/File:DNA_replication_de.svg
- Madprime, DNA replication_split,
http://commons.wikimedia.org/wiki/Category:DNA_replication#mediaviewer/File:DNA_replication_split.svg
- Natonal Institutes of Health, US. Gene therapy (viirusvektor),
http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gene_therapy.jpg?uselang=et
- Madeleine Price Ball, Ligation (kleepuvad otsad),
<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ligation.svg?uselang=et>
- Saperaud, PCR-gel, http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pcr_gel.png?uselang=et
- Lisa.katayama , Allele 1 and Allele 2,
http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Allele_1_and_Allele_2.png?uselang=et
- Magnus Manske, PCR-fingerprint,
http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pcr_fingerprint.png?uselang=et
- DNA struktuur, avaslaidil:
http://commons.wikimedia.org/wiki/Category:DNA_stucturre#mediaviewer/File:1bna_naba_ribbon_v.png
- (Molekulaargeneetika) Cenral Dogma:
http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Central_dogma.JPG?uselang=et
- (Geneetilise) Koodi tabel:
http://commons.wikimedia.org/wiki/Category:Genetic_code#mediaviewer/File:Kooditabel.png