

PÄRNU SÜTEVAKA HUMANITAARGÜMNAASIUM

Ingrid Lekk

DNA ANALÜÜS POLÜMERAASI AHELREAKTSIOONI MEETODIL

Uurimustöö

Prima aste

Juhendaja Katrin Lekk

Pärnu 2007

SISUKORD

SISUKORD	2
SISSEJUHATUS	3
1. DNA STRUKTUUR JA LOKALISATSIOON RAKUS	5
1.1. DNA ehituskomponendid	5
1.2. DNA struktuuritasemed	7
1.3. Tandeemselt korduvad järjestuselemendid DNA-s	7
1.4. DNA mitokondrites	9
2. KLASSIKALINE DNA ANALÜÜS	11
2.1. DNA puhastamine	11
2.2. Restriktaasid	12
2.3. Elektroforees ja southern blotting	13
2.4. Klassikalise DNA analüüsi eelised ja puudused	14
3. DNA ANALÜÜS POLÜMERAASI AHELREAKTSIOONI MEETODIL	15
3.1. PCR meetodi põhimõte	15
3.1.1. DNA denaturatsioon	16
3.1.2. Praimerite seondumine DNA-ga ehk annealing	17
3.1.3. DNA süntees ehk ekstensioon	17
3.3. PCR saaduste analüüs	18
3.4. PCR meetodi eelised ja puudused	19
3.5. PCR-i muud rakendused	20
4. DNA ANALÜÜS EESTIS	21
4.1. DNA analüüsi areng ja tase Eestis	21
4.2. DNA analüüsid Eesti Kohtuarstlikus Ekspertiisibüroos	22
4.2.1. Kasutatavad terminid	22
4.2.2. DNA analüüs kriminaaljuhtumite korral	23
4.3. DNA analüüsi edasine areng Eestis	26
KOKKUVÕTE	28
SUMMARY	30
KASUTATUD KIRJANDUS	31
LISAD	33
Lisa 1: Polünukleotiidahel	33
Lisa 2: Kaks lineaarset polünukleotiidahelat	34
Lisa 3: Paremale pöörduv biheeliks	35
Lisa 4: Nukleosoom, niitjas DNA ja polünukleosoom	35
Lisa 5: Southern blotting	36
Lisa 6: Näidis RFLP analüüsi tulemustest:	37
Lisa 7: PCR-i ühe tsükli skeem	37
Lisa 8: Näidis PCR analüüsi tulemustest:	38
Lisa 9: Näidis ekspertiisiaktis toodud tabeli osast	38
Lisa 10: Intervjuu dotsent Ants Kurega	39

SISSEJUHATUS

Käesolev uurimustöö käsitleb DNA analüüsi kohtuekspertiisis ja bioloogilise isaduse tuvastamisel. Antud juhtudel kasutatakse PCR ehk polümeraasi ahelreaktsiooni meetodit- sellest tulenevalt ka töö pealkiri. DNA analüüsi kasutatakse järjest rohkem: politsei vajab seda kriminaaljuurdlustel, eraisikud on aga üha teadlikumad võimalusest vajaduse korral kasutada isadustesti. Kuid sellegi poolest ei ole antud teemast just palju räägitud- meetoditest, võimalustest, arengust või olukorrast Eestis.

Mõistet DNA analüüs kasutatakse küllaltki palju, kas või filmides ja seriaalides, millega iga päev kokku puututakse. Kuid üldjuhul ei teata, mis selle mõiste taga peitub, kuidas DNA analüüsi ikkagi tehakse. Käesoleva töö esimese poole eesmärk ongi just sellele vastus leida. Alustades DNA analüüsi esmase meetodi põhimõttest on selgitatud, kuidas tänapäeval isikute tuvastamine ja bioloogilise isaduse määramine DNA abil käib. Esimeses peatükis on antud ülevaade DNA ehitusest, et selgitada mõisteid, mis on vajalikud DNA analüüsiga tutvumisel. Teises peatükis on käsitletud DNA analüüsi algsel RFLP meetodil, mis on paljuski sarnane kolmandas peatükis kirjeldatud PCR meetodiga. Viimane on aga märksa efektiivsem ja kiirem ning on viinud DNA analüüsi täiuseni.

Uurimustöö teine pool keskendub DNA analüüsile Eestis. Kohtuekspertiisis ja isaduse tuvastamiseks kasutatavaid analüüse tehakse Tartus Eesti Kohtuarstlikus Ekspertiisibüroos. Neljanda peatüki vältel on uuritud, missugune on Eesti olukord DNA analüüsi valdkonnas: kas sinne tase on võrreldav välisriikidega, millised on probleemid ja tulevikuväljavaated. Lisaks on antud kirjeldus sellest, milline protsess tuleb läbida isadustesti tegemiseks, kuidas tõlgendada tulemusi ning kui usaldusväärne analüüs on. Kui tihtipeale jääb DNA analüüsist mulje kui võõrast ja keerulisest meetodist, mida kasutatakse vaid mõningatel juhtudel, eriti Eestis, siis siinkohal võib tegemist olla hoopis teadmatusena.

Suhteliselt vähesed teadmised antud valdkonnas on kindlasti tingitud ka materjali puudusest: põhjalikumalt on teemat käsitletud vaid ülikoolide loengute materjalides, kus aga enamasti on eelduseks mingid olemasolevad süvendatud teadmised molekulaarbioloogia vallas- sissejuhatavat ning ülevaatlikku materjali on raske leida. Seetõttu on käesolev uurimustöö heaks lugemiseks neile, kes huvituvad molekulaarbioloogia meetoditest, täpsemalt DNA analüüsist ning selle võimalustest, arengust ja väljavaadetest Eestis.

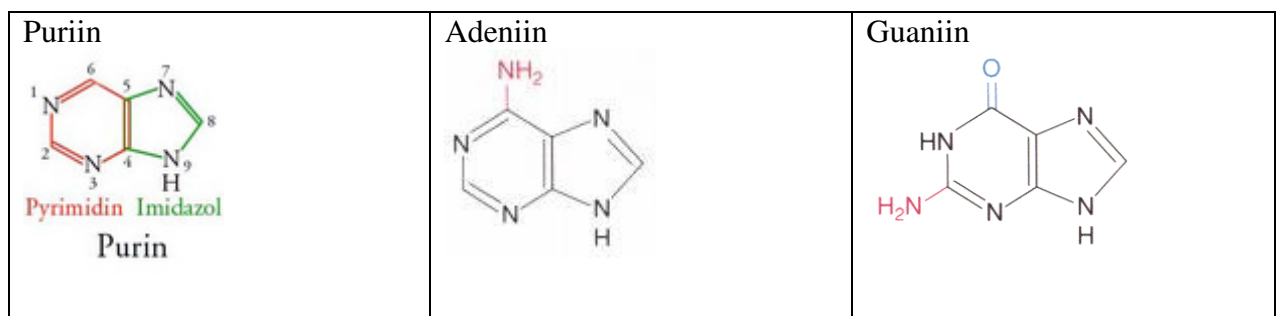
1. DNA STRUKTUUR JA LOKALISATSIOON RAKUS

DNA analüüsi selgitamiseks on kindlasti lühidalt vaja käsitleda ka DNA ehitust. Üldjuhul kirjeldatakse nukleiinhapetest rääkides paralleelselt nii DNA-d kui RNA-d, kuid viimase käsitlemiseks ei ole antud töös vajadust. DNA lokalisatsiooni ja erinevate järjestuselementide kirjeldamise valikul on samuti lähtunud sellest, mis on oluline DNA analüüsi seisukohalt.

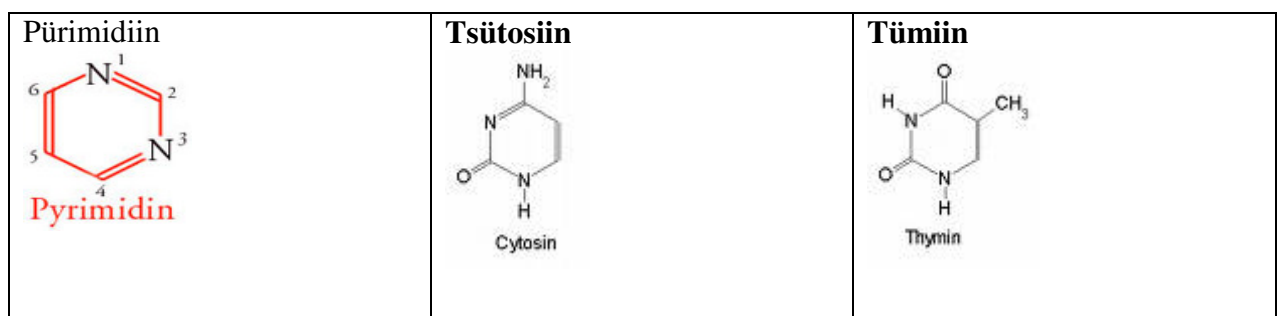
1.1. DNA ehituskomponendid

DNA ehk desoksüribonukleiinhape on biopolümeer, mille monomeerideks on desoksüribonukleotiidi jäägid. Desoksüribonukleotiidid koosnevad omakorda fosfaatrühmast, desoksüriboosijäägist ja tsüklilisest lämmastikalusest. Desoksüribonukleotiidid võivad sisaldada nelja erinevat lämmastikalust:

Joonis 1: Puriini derivaadid adeniin(A) ja guaniin(G)



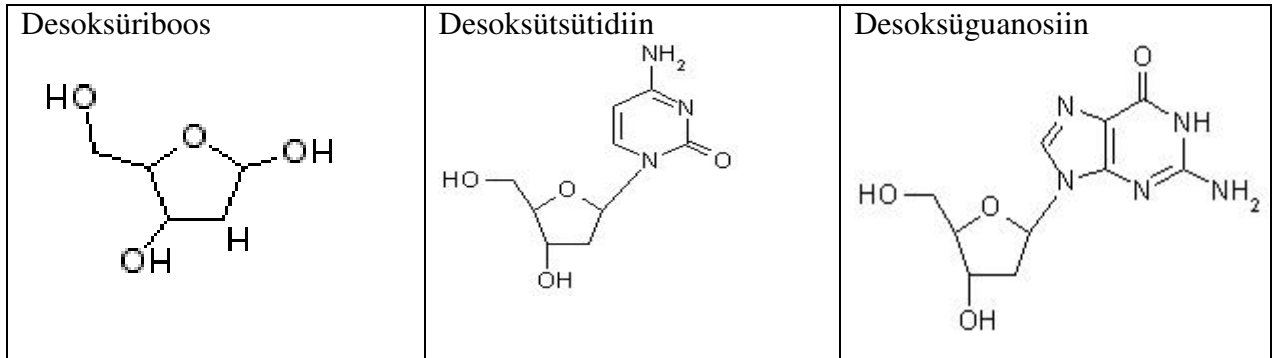
Joonis 2: Pürimidiini derivaadid tsütosiin(C) ja tümiin(T).



Nende lämmastikaluse seondumisel desoksüriboosiga tekib desoksüribonukleosiid. N-glükosiidside asetseb kas pürimidiinaluse N₁ ja desoksüriboosijäägi C₁ vahel (näiteks joonisel

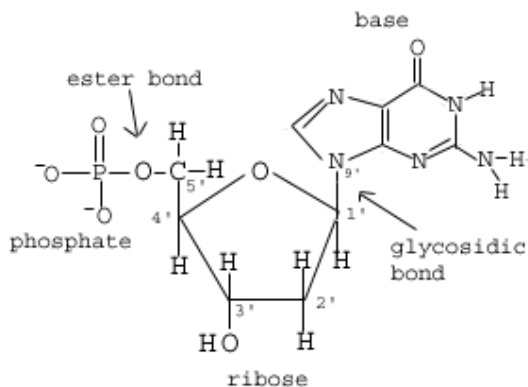
toodud desoksütsütidiin) või puriinaluse N₉ ja desoksüriboosijäägi C₁ vahel (näiteks desoksüguanosiin).

Joonis 3:



Desoksüribonukleotiid tekib desoksüribonukleosiidis oleva desoksüriboosi esterfitseerumisel fosforhappejäägiga, mis on enamasti asendis C₅ (joonisel on toodud guanosiinfosfaat).

Joonis 4:



(*Phosphate*- fosfaatrühm, *ester bond*- esterside, *ribose*- riboos, *glycosidic bond*- N-glükosiidside ja *base*- lämmastikalus)

Desoksüribonukleotiidid saavad nime lämmastikaluse järgi (ainult nende poolest nad üksteisest erinevad): adensiinfosfaat, guanosiinfosfaat, tsütidiinfosfaat ja tümidiinfosfaat. Desoksüribonukleotiidide ühinemisel polinukleotiidahelaks tekib desoksüribonukleinhape ehk DNA. Nukleotiidijääke seovad 5', 3'-fosfodietersidemed- ühe nukleotiidi 3'-OH seostub fosfaadi vahendusel teise nukleotiidi 5'-OH-ga (lisa 1). Tänu fosfaatgruppidele on DNA ahel negatiivse laenguga (seda omadust kasutatakse DNA analüüsil). (Zilmer *et al* 1996: 132)

1.2. DNA struktuuritasemed

DNA primaarstruktuuriks on desoksüribonukleotiidjääkide järjestus polünukleotiidahelas. Fosfaat- ja süsivesikugrupid moodustavad hüdrofiilse hargnemata „tüve“, millest väljuvad hüdrofoobsed lämmastikalused. Peale A, G, C, ja T on DNA-s lisaks nende metüülderivaate (kõige sagedamini 5-metüülderivaate). (Zilmer *et al* 1996: 135)

DNA sekundaarstruktuuriks on biheeliks, mis koosneb kahest lineaarsest polünukleotiidsest ahelast. Kaks polünukleotiidahelat on omavahel seotud vesiniksidemete kaudu, mis tekivad lämmastikaluste vahel (lisa 2). Lämmastikaluste paardumine toimub komplementaarsusprintsibi alusel. Komplementaarsus on vastavus, kus omavahel seonduvad A ja T ning G ja C (seega koosnevad kõik alused ühest puriinist ja ühest pürimidiinist). Sellise spetsiifilise paardumise tagab asjaolu, et vesiniksidemed saavad moodustuda vaid kindlate paaride vahel: A ja T vahel kaks vesiniksidet ning C ja G vahel kolm. Ahelad on antiparalleelsed, see tähendab, et ühes ahelas on sidemete suund 5'→3', teises 3'→5'. See tagab mõlema ahela paremale pöörduvuse (lisa 3). (Kivisaar 2004)

DNA tertsiaarstruktuuris esineb DNA valkudega kompleksis (peamiselt histoonidega). See saab toimuda tänu histoonide positiivsele ja DNA negatiivsele laengule. Histoonid pakivad DNA biheeliksi osaliselt nukleosoomideks (enamasti 8 histoonvalku seotuna DNA-ga), mis omakorda võivad moodustada polünukleosoomi. Seega on DNA molekul tertsiaarstruktuuris korrastatud kolmel viisil: niitjad piirkonnad, nukleosoomid ja polünukleosoomid (lisa 4). (Zilmer *et al* 1996: 135-139)

1.3. Tandeemselt korduvad järjestuselemendid DNA-s

Väga suur osa selgroogsete genomist (üle 90 protsendi) ei kodeeri mRNA ja teiste RNA-de eellasi, vaid koosneb mittekodeerivast DNA-st nii geenialades kui ka geenidevahelistes alades. Enamusele sellele nii-öelda „ülearusele“ DNA-le pole funktsiooni leitud. (Kivi 1999)

Dotsent Ants Kure sõnul on kodeeriv isegi ainult 3-5% inimese genoomsest DNA-st. On teada, et kogu „ülearune“ DNA ei ole sugugi kasutu- arvatakse, et see vastutab mingite kontrollfunktsioonide eest. Kindlat ülesannet siiski määrata ei osata. (Kurg 2007, lisa 10)

Ka DNA analüüsi seisukohalt ei ole mittekodeeriv DNA sugugi kasutu, kuna see sisaldab palju korduvaid piirkondi, mille osas esineb nii suur varieeruvus (nende pikkuses, korduste arvus), et

iga indiviid on teistest selle põhjal eristatav. Inimese genoomist ligikaudu 50% koosneb korduv-DNA-st (*repetitive DNA* või *repDNA*), kus teatud järjestuse elemendid on korratud mitmeid kordi. Seda kas tandeemselt ehk üksteise järel paiknevatena või hajuskordustena unikaalsete järjestuste vahel. (Kivi 1999)

DNA analüüsil on tähtis roll just tandeemselt korduvatel järjestuselementidel ning seetõttu ongi antud peatükis keskendutud just neile.

Korduste arvu ja järjestuste pikkuse alusel jaotatakse tandeemselt korduvad järjestuselemendid satelliitseteks, minisatelliitseteks ja mikrosatelliitseteks. Erinev on ka nende paiknemine kromosoomides (see ei ole juhuslik, vaid kindlalt organiseeritud). Satelliit-DNA ehk satDNA hulka kuuluvad tandeemselt korduvad DNA järjestused, mille korduste arv on 10^3 - 10^7 ning kordusühikute pikkus varieerub ühest kuni mitme tuhande aluspaarini. Satelliit-DNA lõikude arv on tavaliselt väike- üks kuni kaks kromosoomi kohta. Inimesel on teada vähemalt kümme erinevat satDNA klassi, mida iseloomustavad erinevad kordusüksused. Oletatakse, et kuna satDNA asub enamjaolt tsentromeeri ja telomeeri piirkonnas, siis võib selle funktsiooniks olla kromosoomide struktuurse terviklikkuse tagamine. Samuti arvatakse, et see omab tähtsust kromosoomide lahknemisprotsessis. (*Ibid*)

Satellit-DNA-d DNA analüüsil ei kasutata. See oleks ilmselgelt väga ebapraktiline, kuna järjestuste korduste arv on niivõrd suur. Palju kergem on töötada vähem kordusi sisaldavate mini- ja mikrosatelliitidega.

Minisatellidid on kordusjärjestused, mis koosnevad 15-100 bp pikkustest DNA järjestustest, mida on lookuses tandeemselt korratud 10-1000 korda. Minisatellitseid järjestusi on genoomis mõni tuhat ning korduste arv erinevates järjestustes on varieeruv. Võrreldes satelliit-DNA-ga on minisatellidid rohkem üle genoomi hajutatud ning koondunud peamiselt telomeersetesse piirkondadesse. Minisatelliite nimetatakse ka VNTR järjestusteks (*variable number of tandem repeat sequence*)- seda mõistet on kasutatud ka edaspidi, kuna erinevat kirjandust lugedes leidub rohkem just seda lühendit. (*Ibid*)

VNTR piirkondades olevate korduselementide arv ja pikkus on päritav ning indiviididel väga varieeruv ning just see on DNA analüüsi aluseks. Geneetilistes terminites on VNTR järjestus

lookus, mis võib esineda paljude erineva pikkusega alleelidena ehk see on polümorfne. Üle 95 protsendi inimestest on kindla VNTR lookuse suhtes heterosügootid ja seega vaid viis protsenti on saanud nii emalt kui isalt täpselt ühepikkuse alleeli. Põhjuseks on loomulikult asjaolu, et eksisteerib niivõrd palju erinevaid allelele. Tõenäosus, et kahel mittesuguluses oleval inimesel on uuritavas VNTR lookuses identne alleelide kombinatsioon, on alla ühe protsendi. (DNA...1998)

Tänapäevase DNA analüüsi seisukohalt võib öelda, et VNTR piirkonnad on pigem tagaplaanile jäänud. Levinum on mikrosatelliitide kasutamine (neil põhineb ka PCR- polümeraasi ahelreaktsioon). Samas ei tähenda see, et VNTR järjestused oleksid oma tähtsuse DNA analüüsil täielikult kaotanud - mõnes mõttes on neil mikrosatelliitide ees isegi eeliseid (neid on käsitletud edaspidi).

Mikrosatelliitideid järjestusi nimetatakse ka lihtsateks tandeemseteks kordusteks ehk STR (*simple tandem repeat*) järjestusteks. STR järjestused koosnevad tandeemselt korratud (5-15 kordust) lühikestest (1-6 bp) lihtsatest motiividest. STR järjestused paiknevad genoomis väga paljudes alades ning vastavate järjestuste pikkus inimestel on väga erinev (polümorfism). Leitud on nii mono-, di-, tri-, tetra- kui pentanukleotiidsed tandeemseid kordusi. Inimese genoomis esineb kõige sagedamini (CA)_n-(GT)_n kordusi, mida üldjuhul märgitakse lihtsalt (CA)_n. Dinukleotiidsed STR järjestused esinevad genoomis umbes iga 6 kb, di- ja tetranukleotiidsed järjestused aga 300-500 kb järel. STR järjestusi on leitud nii geenidevahelistes alades kui ka kodeerivates ja mittekodeerivates geenialades. Tänu STR järjestuste polümorfsusele ja lihtsusele on need tänapäeva kohtumeditsiinis ja isaduse tuvastamisel väga väärtuslikud. (Kivi 1999)

1.4. DNA mitokondrites

Mitokondrid on võimelised kodeerima valke enda tarbeks- nendes asub mitokondriaalne DNA ehk mtDNA. Mitokondriaalne DNA on väike, umbes 16 600 aluspaarist koosnev molekul ning igas mitokondris on 5-10 mtDNA molekuli. Kuna aga rakus on sadu või isegi tuhandeid mitokondreid, sisaldab üks rakk tuhandeid identse aluspaaride järjestusega mtDNA molekule. Kuna mtDNA asub väljaspool rakutuuma, on see päritav otse emalt. Seega saab mtDNA analüüsiga määrata sugulussidemeid ka üle põlvkondade. Mitokondriaalses DNA-s esineb mutatsioone rohkem kui tuuma DNA-s, sest see on vähem kaitstud ning mitokondrites ei ole mehhanisme, mis tekkinud vigu DNA-s parandaks. Kuid tänu mutatsioonidele on mtDNA-s

tekinud variatsioone, mille põhjal on inimesed üksteisest eristatavad. Umbes pooled tekkinud variatsioonidest asuvad kahes väikeses mittekodeerivas piirkonnas- nende piirkondade analüüsi on võimalik kasutada nii kohtuekspertiisis kui antropoloogilistel uurimistel (mtDNA analüüsil saadi näiteks esimesed olulised andmed neandertallaste genoomi kohta). Mitokondriaalse DNA eeliseks on asjaolu, et identseid mtDNA molekule on rakus väga palju ning seega on suurem tõenäosus, et uurimusteks vajalikud piirkonnad on säilinud, isegi kui algmaterjali on väga vähe. (DNA...1998)

Ka tänapäeval (arvestades, et eelmine viide aastast 1998 on geneetika valdkonna kohta küllaltki vana) kasutatakse mitokondriaalset DNA-d aktiivselt samadel eesmärkidel: emasliinide uuringutel nii isikute tuvastamisel kui arheogeneetikas. Huvitava näitena toob dotsent Ants Kurg mtDNA kasutamisest Vene viimase tsaari Nikolai Romanovi ja tema perekonna säilmete tuvastamisel. Sellistel uuringutel on oluline just mtDNA suur hulk rakus, tänu millele saab seda tihti kasutada ka siis, kui genoomset DNA-d enam eraldada ei suudeta. (Kurg 2007, lisa 10)

2. KLASSIKALINE DNA ANALÜÜS

Nimetus klassikaline on võetud EIBE materjalidest (DNA...1998) ning selle all on mõeldud DNA analüüsi algset meetodit. Kuigi tänapäeva üheks põhiliseks molekulaarbioloogiliseks meetodiks (sealhulgas kohtupraktikas ja isaduse tuvastamisel) on saanud polümeraasi ahelreaktsiooni meetod, siis klassikalise analüüsi selgitamine on heaks sissejuhatuseks, kuna paljuski on põhimõtte jäänud samaks. Lisaks annab see võimaluse jälgida, kuidas DNA analüüs on arenenud ja täiustunud.

2.1. DNA puhastamine

DNA analüüsi läbiviimiseks on esmalt vaja DNA rakust eraldada. Selleks lõhutakse rakk näiteks osmootset šokki või rakumembraane lõhustavaid detergente kasutades. Seejärel seotakse reaktsioonikeskkonnast ära valgud- jällegi on mitmeid meetodeid, neist levinuim fenooliga ekstraheerimine. (Kurg 2007 lisa 10)

Fenooli toimel valgud denatureeruvad. Kuna fenool on hüdrofoobne, tekib lahusesse kaks kergesti eristatavat faasi- valgud jäävad vesikihi ja fenooli vahealasse ehk interfaasi, DNA vesikihti. Ekstraheerimiseks kasutatakse vee või puhvriga küllastatud fenooli (pH 7,5-8). RNA puhul kasutatakse ka happelist fenooltöötlust, kuid DNA läheb sellisel juhul vesilahusest üle fenoolfaasi. Kui fenooltöötluste käigus tekib faaside eraldamist raskendav lai interfaas, näitab see valkude kõrget sisaldust lahuses. Sellisel juhul eraldatakse vesifaas koos interfaasiga, lisatakse uus kogus fenooli ja korratakse ekstraheerimist. (Molekulaarse...2000)

Järgnevalt on vaja sadestada DNA, milleks on jällegi erinevaid võimalusi. Näiteks kasutatakse DNA väljasoolamist. Tekitatakse DNA ja soola kompleks, lisades lahusele kas või keedusoola. Keskkonnast seotakse etanooli (96 või 100-protsendiline) abil ära vesi ning DNA ja soola

kompleks langeb lahusest välja. Nüüd on seda võimalik pesta ja vees või puhvris lahustada. (Kurg, A. 2007, lisa 10)

Kui DNA on rakust eraldatud ja puhastatud, võib alustada mis tahes DNA analüüsiga. Klassikaline DNA analüüs põhineb eelmises peatükis käsitletud VNTR piirkondade võrdlemisel ning viiakse läbi RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) ehk restriksioonifragmentide erineva pikkuse analüüsina. Lihtsalt öelduna seisneb analüüsi põhimete selles, et kindlad ensüümid (restriktaasid) „lõikavad“ eraldatud DNA molekulist välja uuritavad VNTR järjestused ning nende järjestuste pikkuste analüüsil ja võrdlemisel (elektroforeesi abil) näiteks ema ja võimaliku isa vastavate VNTR järjestustega saadakse otsitavad vastused. (DNA...1998)

2.2. Restriktaasid

DNA struktuuri uurimisel ja ahelate lõhkumisel kasutatakse mitmeid ensüüme, mis hüdrolüüsivad fosfodietersidemeid ning mille üldnimetus on nukleaasid. Ahelasiseseid sidemeid lõhkuvad ensüümid on endonukleaasid, DNA primaarstruktuuri lõhkumiseks kasutatakse endonukleaasseid restriктаase. Restriktaasid on spetsiifilised ehk nad lõhuvad DNA mõlema ahela kindlaid fosfodietersidemeid. (Zilmer *et al* 1996: 139)

Restriktaasid pärinevad bakteritest ning nende bioloogiline roll on kaitsta baktereid bakteriofaagide eest. Restriktaasid lõhuvad bakterisse tunginud viiruse DNA lõikudeks ja muudavad nii viiruse kahjutuks. Bakteri enda DNA on restriктаaside eest kaitstud tänu metülaasidele- ensüümid, mis metüülivad bakteri DNA vastavaid aluseid. Tänu sellele ei tunne restriктаasid vastavaid järjestusi ära. Tänapäevaks on teada mitusada restriктаasi, mis kõik tunnevad ära erinevaid järjestusi DNA ahelas. Oma nime saavad restriктаasid bakterite järgi, kust nad pärinevad. Näiteks EcoRI pärineb bakterist *Escherichia coli* ning tänapäeval palju kasutatav HinfI bakterist *Haemophilus influenzae*. (DNA...1998)

Restriktaasid tunnevad ära DNA mõlema ahela lühikese (4-6 aluspaari) spetsiifilise järjestuse, mida nimetatakse palindroomiks. Palindroomi piires on DNA ahelad topeltsümmeetrilised- pööramisel ümber sümmeetriatelje 180° jääb ehitus samaks, kuna järjestused on suunas 5'→3' mõlemas ahelas identsed. Näiteks EcoRI tunneb ära järgmise järjestuse:

5`..GAATTC..3`

3`..CTTAAG..5`

(Zilmer *et al* 1996: 139)

RFLP analüüsi esimeseks etapiks ongi DNA töötlemine restriктаasidega, et kätte saada vajalikud VNTR järjestused.

2.3. Elektroforees ja southern blotting

Pärast DNA fragmenteerimist restriктаasidega viiakse saadud fragmentidega läbi elektroforeetiline analüüs (lisa 5). Elektroforees põhineb asjaolul, et õigetes tingimustes (pH=8,3) on DNA ahela fosfaatgrupid ioniseeritud ja liiguvad seega elektriväljas anoodi (+) poole. DNA fragmente sisaldav proov pipeteeritakse geelile, mis on ühendatud vooluallikaga. Fragmentide liikumiskiirus anoodi suunas sõltub nende pikkusest- pikemad fragmendid liiguvad aeglasemalt (olenemata suuremast summaarsest negatiivsest laengust). Selline DNA fragmentide üksteisest lahutamine pikkuse alusel on molekulaarbioloogias väga levinud meetod. (DNA...1998)

Elektroforeesil kasutatakse agaros- või polüakrüülamiidgeeli. Polüakrüülamiidgeelid erinevad agarosgeelidest oma suurema lahutusvõime poolest, lahutades kuni tuhandenukleotiidseid fragmente, mis erinevad üksteisest vaid ühe nukleotiidi võrra. Agarosgeelides on võimalik lahutada DNA fragmente pikkusega 100-50 000 nukleotiidi ja täpsusega mõnikümmend nukleotiidi. (Molekulaarse...2000)

Kui restriksioonifragmendid on elektroforeesil üksteisest pikkuse järgi eraldatud, viiakse läbi protseduur, mille nimi on *southern blotting* (leiutatud 1975. aastal Edwin Southerni poolt). Elektroforeesigeeli lisatakse tugevat aluselist lahust (NaOH), mille tulemusel geelis olevad DNA fragmendid denatureeruvad (vesiniksidemed kahe DNA üksikahela vahel katkevad). Fragmendid kantakse nitrotselluloosmembraanile (*blotting*)- membraan asetatakse geelile ning kaetakse omakorda hästiimavate paberkihtidega. Seejärel voolutatakse membraani (millel on nüüd DNA fragmendid) lahusega, mis sisaldab huvipakkuvate fragmentidega komplementaarseid molekulaarsonde (sünteesitud oligonukleotiidid). Komplementaarsusprintsibi alusel ühinevad molekulaarsondid membraanil olevate üheaahelaliste DNA fragmentidega. Sondid on ühendatud

radioaktiivse märgisega ning muudavad vastavate fragmentidega ühinedes need eristatavaks. Membraan tõstetakse lahusest välja, kuivatatakse ning ilmutatuna tundlikul fotopaberil on huvipakkuvad fragmendid nähtavad. Võrreldes DNA fragmentide läbitud teepikkuseid, on võimalik võrrelda ka fragmentide pikkusi. (DNA...1998)

Lisas 6 on toodud näidis isaduse tuvastamise analüüsist- järgnevalt on vaadeldud antud analüüsi eelpool kirjeldatu põhjal. Ühes geelis on analüüsitud ema(1), lapse(2) isa A(3) ja isa B(4) DNA-d. Kõikidel isikutel on analüüsitud ühte ja sama VNTR lookust- kõigil on selles lookuses kaks erineva pikkusega alleeli (heterosügootsus). Kuna järglane pärib ühe alleeli emalt ja teise isalt, siis peavad lapse DNA fragmendid olema liikunud vanemate omadega sama kaugemale. Nagu jooniselt näha, on lapsel antud lookuses pikem alleel (läbinud lühema vahemaa) päritud emalt ning lühem alleel isalt A. Seega antud lookuse analüüsiga on täielikult välistatud, et isa võiks olla kandidaat B. Kindlustamaks, et kandidaat A sobivus ei ole lihtsalt kokkusattumus, uuritakse kindlasti veel ka teisi lookuseid.

2.4. Klassikalise DNA analüüsi eelised ja puudused

RFLP analüüsi põhiline eelis on VNTR piirkondade pikkuse suur varieeruvus- igal VNTR lookusel on väga palju erinevaid võimalikke allelele. Seega on üsna ebatõenäoline, et kahel mitteduguluses oleval isikul antud piirkonnad kattuvad. Polümeraasi ahelreaktsioonis kasutatavate STR järjestuste puhul on nende lühiduse tõttu kokkulangevus tõenäolisem. RFLP analüüsi puuduseks on aga see, vaja läheb vähemalt 20ng puhastatud DNA-d: see võib olla suureks takistuseks kohtuekspertiisis, kus sageli on uurimiseks oleva DNA hulk väga väike. (DNA...1998)

Lisaks peab RFLP analüüsiks kasutatav DNA olema väga puhas- sellest sõltub oluliselt restriktasid e efektiivsus. Lisandid, nagu valgud, fenool, etanool, soolade jäägid, võivad ensüümide aktiivsust pärssida. (Molekulaarse...2000)

Elektroforees võib samuti oluliselt sõltuda DNA puhtusest- näiteks teatud riidesordist pärinev sinine värv võib DNA külge kleepuda ja fragmentide liikuvust elektroforeesil mõjutada. (DNA...1998)

3. DNA ANALÜÜS POLÜMERAASI AHELREAKTSIOONI MEETODIL

Arvestades polümeraasi ahelreaktsiooni meetodi (PCR) kiirust, laialdasi kasutusvõimalusi ja lihtsust (protseduur on automatiseeritud), võib öelda, et see on tänapäeva molekulaarbioloogia üks põhimeetoditest. PCR-i avastamine on omamoodi läbimurre, seda eriti kohtuekspertiisi seisukohalt. Järgnevalt on antud ülevaade PCR analüüsist, tuginedes antud uurimustöö esimesele ja eriti teisele peatükile- paljuski kattub PCR klassikalise DNA analüüsiga.

Meetod on leiutatud 1984. aastal (mõnede andmete järgi 1983) Kary Mullise poolt firmas Cetus (Molekulaarse...2000). Mullis teenis avastuse eest 10 000 USA dollarit, hiljem müüs firma patendi kolme miljoni dollari eest- see näitab selgelt uue meetodi sensatsioonilisust. PCR leidis laiemat kasutust alates 1988. aastast, kui suudeti eraldada puhas termostabiilne DNA polümeraas (PCR-i tähtis komponent) ning protseduur automatiseeriti. Nüüdseks on PCR seadmed ja termostabiilne DNA polümeraas müügil ja kergesti kättesaadavad, kuna meetod on niivõrd levinud. Kary Mullis sai avastuse eest 1993. aastal Nobeli preemia keemias. (DNA...1998)

3.1. PCR meetodi põhimõte

PCR meetodi aluseks on DNA-s olevad STR järjestused (peatükk 1.3.1.). Erinevalt klassikalisest VNTR järjestustel põhinevast analüüsist ei kasutata nüüd aga vastavate fragmentide eraldamiseks restriktase, vaid paljundatakse vajalikku järjestust otse DNA-lt. Paljundamine toimub ahelreaktsioonina nii kaua, kuni vajalikku fragmenti on piisavas koguses analüüsi läbiviimiseks (näiteks geelelektroforeesi jaoks). (DNA...1998)

Seega erineb PCR klassikalisest DNA analüüsist kahe põhiliselt aspekti poolest: VNTR piirkondade asemel kasutatakse STR järjestusi ning DNA-d ei lõigata restriktasididega, vaid paljundatakse otse DNA-lt (täpselt nagu loodusliku replikatsiooni puhul). Just need kaks erinevust muudavadki PCR-i klassikalisest analüüsist tunduvalt efektiivsemaks ja täpsemaks.

PCR-tsükli võib jaotada kolmeks: DNA denaturatsioon (kaksikheeliks laguneb kaheks üksikahelaks), komplementaarsete praimerite seondumine üksteisest lahutatud ahelatele ja DNA fragmendi süntees termostabiilse DNA polümeraasiga. (Zilmer *et al* 2006: 124).

Järgnevalt kõikidest etappidest põhjalikumalt. Kokkuvõttev skeem on antud lisas 7.

3.1.1. DNA denaturatsioon

Kui DNA on eelpool (peatükk 2.1.) kirjeldatud meetodil rakust eraldatud ja puhastatud, võib alustada PCR analüüsiga. PCR-i puhul on kindlatel juhtudel võimalik kasutada ka puhastamata DNA-d (näiteks terve veretilg), kuid see on kindlasti ebaefektiivsem variant. DNA denatureerimiseks kuumutatakse seda 90-95°C juures, kus DNA biheeliks laguneb kaheks üksikahelaks. See on vajalik huvipakkuvate fragmentide paljundamiseks (amplifitseerimiseks)-süntees saab toimuda ainult üksikahelalt. (DNA...1998)

DNA denatureerumine toimub järskude etappidena väga kindlatel temperatuuridel. DNA denatureerumistemperatuuri nimetatakse DNA sulamistemperatuuriks (T_m). Erinevatest allikatest pärit DNA preparaatidel on erinev T_m väärtus, mis oleneb ahela nukleotiidsest koostisest. Mida kõrgem on G-C paaride sisaldus A-T paaridega võrreldes, seda kõrgem on sulamistemperatuur. Põhjuseks on see, et G-C paarid on kolme vesiniksidemega kõvemini seotud kui kahe vesiniksidemega A-T paarid. (Tohver 1977: 190)

Nagu juba analüüsi esimesest etapist järeldada võib, on PCR analüüsi üheks tähtsamaks ja keerulisemaks osaks õigete temperatuuride saavutamine. Tänu protseduuri automatiseeritusele ei ole see aga enam probleemiks.

3.1.2. Praimerite seondumine DNA-ga ehk annealing

PCR-i puhul ei ole vaja teada konkreetse STR piirkonna nukleotiidset järjestust, vaid lühikesi järjestusi kahel pool STR piirkonda (*flanking sequences*- külgnevad järjestused). Külgnevate järjestuste järgi on sünteesitud komplementaarsed praimerid- tavaliselt 15-25 nukleotiidi pikkused oligonukleotiidid. Nende seondumine DNA-ga on vajalik seetõttu, et alad, kuhu praimerid kinnituvad, on fragmentide sünteesi initsiaatoriteks. Praimerid seonduvad komplementaarsusprintsibi alusel mõlemale poole STR piirkonda (üks ühe ja teine teise üksikahela külge). (DNA...1998)

Praimerite seondumine ehk annealing toimub 50-70°C juures. Et kinnitumistemperatuur nii-öelda mõistlik oleks, tulebki praimerid teha ~20 nukleotiidi pikkused- siis on nende sulamistemperatuur 50-70°C. Oluline on ka praimerite G-C sisaldus, mis peaks jääma 50-55% ulatusse- väiksema sisalduse korral tuleks praimerit pikendada, et sulamistemperatuur üle 50°C oleks. Lisaks on kasulik see, kui praimeril 3.' otsa stabiliseerimiseks asuks seal G või C nukleotiid. (Kurg 2004)

3.1.3. DNA süntees ehk ekstensioon

Kui praimerid on amplifitseeritava (paljundatava) DNA järjestuse kahelt poolt määratlenud, sünteesib termostabiilne DNA polümeraas praimerite 3.' otsast alates mõlemale DNA üksikahela fragmendile komplementaarse fragmendi, kasutades selleks segusse lisatud nukleotide. Protseduur toimub 72°C juures ning selleks kasutatakse termostabiilset Taq polümeraasi, mis pärineb termofiilsest bakterist *Thermus aquaticus*. (Zilmer 2006: 124)

Kõik kolm kirjeldatud etappi on automatiseeritud. Üks tsükkel võtab 3-4 minutit ning kahekordistab amplifitseeritava DNA hulga. Tavaliselt piisab 25-35 tsüklist, et saada analüüsiks vajalik kogus DNA fragmente. Kokkuvõtvalt käib üks tsükkel järgnevalt (väga täpsete temperatuuride ja ajastusega):

DNA proov asetatakse PCR inkubaatorisse ja käivitatakse DNA amplifitseerimise programm.

1. DNA-d denatureeritakse 90-95°C juures ühe minuti vältel.
2. Programm seisatakse ja lisatakse Taq polümeraasi lahust.

3. DNA denatureerimine jätkub 20 sekundi jooksul.
 4. Praimerite seondumine ehk annealing 50-70°C juures 25 sekundit.
 5. DNA amplifitseerimine Taq polümeraasiga (ekstensioon) 72°C juures 40 sekundit.
- Etappe 1-5 korratakse ahelreaktsioonina 25-30 korda (iga korraga DNA hulk kahekordistub).
6. Lõpp-ekstensioon 72°C juures viie minuti vältel.
 7. Saadud fragmentide säilitamine 4°C juures kuni analüüsimiseni. (Molekulaarse...2000)

Lõpp-ekstensioon on vajalik seetõttu, et PCR-i käigus võib tekkida palju poolikult sünteesitud ahelaid, mis nüüd lõpuni sünteesitakse. (Kurg 2007, lisa 10)

3.3. PCR saaduste analüüs

Amplifitseeritud STR piirkondade pikkust määratakse nagu klassikalise DNA analüüsi puhulgi geelelektroforeesil (peatükk 2.3.). PCR produktid kantakse geeli kaevudesse ning eraldi foreesirajale pikkusmarker (juba teadaoleva pikkusega DNA lõik). Forees viiakse läbi 150V juures 30 minuti vältel. Tänapäeval ei avaldata tulemusi mitte *southern blottinguga*, mida kasutati klassikalise DNA analüüsi puhul, vaid PCR produktid visualiseeritakse arvuti poolt juhitud laseritega ning tulemused esitatakse graafikuna. (Molekulaarse...2000)

Lisas 8 on toodud näidis PCR analüüsi graafikust. Tegemist on isadustestiga nagu peatükis 2.4. käsitletud klassikalise näidis DNA analüüsi puhulgi. Testitud on (alates ülevalt) ema, last ja kahte võimalikku isa ning antud graafik annab informatsiooni kahe erineva lookuse kohta.

Nendeks kaheks lookuseks on HUMvWA alleelidega 16, 17, 18, 19 20 (numbrid tähistavad korduste arvu alleelis) ja HUMF13 alleelidega 3,2, 5, 6. Alleel 3,2 on väga levinud ning sisaldab lisaks kolmele kordusele veel kahte nukleotiidipaari. Mõlemas lookuses on korratud järjestust pikkusega neli nukleotiidipaari. Loogiliselt peaks alleelid 16, 17, 18, 19 ja 20 olema pikemad teise lookuse alleelidest, kuna nendes on korduseid rohkem, kuid graafikult on järeldatav vastupidine. Sellele on kindel seletus: praimerite valikul arvestatakse, et saadud fragmendid mitmest lookusest oleks erineva pikkusega- tänu sellele saab neid analüüsida samas geelsüsteemis. (DNA...1998)

Analüüsist järelduste tegemine on nüüd juba lihtne: laps on emalt saanud HUMvWA lookuses alleeli 17 ja HUMF13 lookuses alleeli 6, seega peavad vastavates lookustes isalt saadud alleelid olema 20 ja 5. Kummalgi isal isal ei ole alleeli 20- sellega on nende võimalik isadus antud lookuste põhjal välistatud.

Antud graafikul on huvitav nähtus ka ema HUMF13 lookus. Nagu näha, omab see isik antud lookuses vaid alleeli 6 (kaks ühesugust kuuendat alleeli jäävad elektrofooresis nähtavale ühena, sest läbivad täpselt ühe vahemaa). Üldjuhul eksisteerib STR piirkondades heterosügootsus, just seetõttu antud juhtum silma torkabki. Kuid samas on homosügootsus lühikestes STR piirkondades palju levinum kui pikkades VNTR piirkondades.

3.4. PCR meetodi eelised ja puudused

Üheks PCR meetodi eeliseks on selle kiirus ja kasutamise lihtsus. Ühe fragmendi amplifitseerimiseks piisavas koguses kulub vaid 2-3 tundi ning lihtsuse tagab protseduuri automatiseeritus. Kiirust lisab ka see, et ühe PCR protseduuri käigus on erinevates tuubides võimalik korraga töödelda 4-6 erinevat STR piirkonda. Tähtsaks eeliseks on PCR analüüsi suur tundlikkus- kui klassikalise DNA analüüsi jaoks läheb vaja vähemalt 20 ng puhastatud DNA-d, piisab PCR-i puhul ühest nanogrammist ning protseduur võib õnnestuda isegi vaid ühe raku olemasolul. (DNA...1998)

Samuti ei ole PCR-i puhul DNA puhtus nii oluline kui klassikalise analüüsi korral- restriktase, mille tööd DNA saastatus mõjutada võib, ei kasutata ning elektrofooresifragmendid on PCR-i käigus sünteesitud ja seega lisaaineteta. (Kurg 2004)

Puuduseks on esiteks vajadus teada DNA järjestusi, mille alusel sünteesida praimerid. Lisaks ka asjaolu, et STR piirkonnad on lühikesed, mistõttu näiteks isikute tuvastamisel või isadustestis on juhuslik kokkulangevus tõenäolisem kui VNTR piirkondade puhul (erinevaid allelele on vähem). DNA sünteesimise käigus võib tekkida ka vigu, sest ei ole vajalikke kontrollmehhanisme, mis eksisteerivad loodusliku replikatsiooni puhul. (*Ibid*)

3.5. PCR-i muud rakendused

Lisaks kohtuekspertiisile ja isaduse tuvastamisele on PCR meetod laialdasel kasutusel diagnostikas. Järgnevalt on toodud mõned näited, mis illustreerivad PCR-i tähtsust meditsiini seisukohalt.

Ka diagnostikas mängib olulist rolli PCR-i võime analüüsida väga väikest kogust DNA-d. Üheks tähtsaks PCR-i kasutuselaks on tänu sellele võimaliku AIDS-i nakatumise diagnoosimine väga varajases staadiumis juba enne antikehade teket. See on eriti oluline viiruste pika peiteaja tõttu. Tänu PCR-ile saab leukotsüütidest isoleeritud HIV nakkust tõestavat DNA fragmenti paljundada, kuni on saadud analüüsiks piisav kogus materjali. (Zilmer *et al* 2006: 124)

PCR-i saab kasutada ka preimplantatsioon-diagnostiliselt näiteks tsüstilise fibroosi tuvastamiseks. Testimiseks isoleeritakse *in vitro* tekkinud kaheksarakulisest embrüost üks rakk. Sellest ekstraheeritakse DNA ning amplifitseeritakse praimeritega piiritletud fragmenti (tsüstilist fibroosi põhjustav järjestus DNA-s on teada). Saadud fragmente analüüsitakse elektroforeesil. Implantatsiooniks kasutatakse vaid haigusevaba embrüot. (*Ibid*: 125)

PCR-i kasutatakse ka mitmete teiste geneetiliste haiguste diagnoosimisel, näiteks sirprakulise aneemia või *Duchenne* lihasdüstroofia puhul. Samuti muudab PCR efektiivsemaks onkogeensete ja somaatiliste mutatsioonide identifitseerimise pahaloomuliste kasvujate diagnoosimisel. (*Ibid*: 125)

Ajakirjanduses on kajastatud vaidlusi preimplantatsioon-diagnostiliste uuringute üle- arvatakse, et embrüost raku eemaldamine võib mõjuda kahjulikult edasisele embrüogeensile (kuna oletatakse, et tüvirakud ei pruugi kõik identsed olla). Käesoleva töö seisukohalt on tähtis fakt aga see, et tänu PCR-ile on võimalik diagnoosida väga raskeid haigusi võimalikult vara. Toodud näited on vaid mõned paljudest PCR-i rakendustest meditsiinis, mis tõestavad veelkord selle meetodi olulisust.

4. DNA ANALÜÜS EESTIS

Käesolevas peatükis on uuritud kohtuekspertiislikku DNA analüüsi ja isadustestide läbiviimist Eestis: siinset taset, arengut, võimalusi ja piiranguid ning olukorda võrreldes ülejäänud maailmaga. Nagu kogu geenitehnoloogia on arenenud ja areneb edasi tohutu kiirusega, jätkub pidevalt ka DNA analüüsi täiustumine ja populaarsemaks muutumine.

4.1. DNA analüüsi areng ja tase Eestis

Esimene Eesti politsei tellitud DNA ekspertiis kannab kuupäeva 3. mai 1995- sellega mõisteti süüdi mõrvas süüdistatud inimene (Pöld 2007). DNA analüüs isikute tuvastamiseks ja bioloogilise isaduse määramiseks saigi Eestis alguse 1995. aastal. Eesti Kohtuarstlikus Ekspertiisibüroos alustas DNA labor tööd 10. aprillil 2000 rajanedes eelnevalt teaduslaborist saadud kogemustele. Eesti Kohtuarstliku Ekspertiisibüroo DNA labor asub Tartus Biomeedikumis ning kõik kohtu poolt määratud DNA analüüsid viiakse läbi just seal. Lisaks tehakse seal ka isadusteste eraisikute tellimusel. Tänapäevaks on Eesti saavutanud maailmataseme: kui alustades oli Eestile suureks eeskujuks ja õpetajaks Soome, siis praegu võib öelda, et Eesti DNA eksperdid on võrdsed partnerid vähemalt 30 riigi kolleegidele. Kasutatakse samu testsüsteeme, mida enamikus maailma laborites, uuritakse rahvusvaheliselt soovitatud lookuseid ning Eesti Kohtuarstliku Ekspertiisibüroo DNA labor osaleb regulaarselt rahvusvahelistes pädevustestides. (Küsimused...2007)

DNA analüüsi laialdast levikut tänapäeval näitab ka see, et 2006. aastal tehti Eesti Kohtuarstliku Ekspertiisibüroo DNA laboris üle 2800 analüüsi. 2004. aastal loodi DNA andmebaas, kuhu kogutakse DNA proove kuritööpaikadest ja kuritöös kahtlustatavatelt. 2006. aastaks oli andmebaasi salvestatud 7000 inimese DNA profiil, sama aasta lõpuks aga juba 15000 inimese oma. Erinevalt Skandinaavia maadest, kus DNA proovid võetakse vaid tapmises ja vägistamises

kahtlustatavalt, kogutakse Eestis süljeproovid kõigilt kriminaalkuriteos kahtlustatavalt ja süüdimõistetult, alates 2006. aasta 8. jaanuarist ka arestimajja sattunult. (Pöld 2007)

Võib öelda, et nagu kogu maailmas, on ka Eestis DNA analüüs arenenud väga kiiresti nii efektiivsuse kui testide arvu seisukohalt. Tänapäevaks on DNA analüüsi tähtsus kriminalistikas äärmiselt suur ning üha populaarsemaks on saanud ka isadustestid kas kohtu poolt määratuna või isiklikul soovil. Kindel on see, et DNA analüüs ei ole Eestis enam mingi haruldus või vaid erijuhtumitel kasutatav meetod, kuid sellegi poolest tuleb arvestada, et on teatud piirangud ja kindlad reeglid, mida peab järgima.

4.2. DNA analüüsid Eesti Kohtuarstlikus Ekspertiisbüroos

Eesti Kohtuarstliku Ekspertiisbüroo DNA laboris tehakse analüüse järgides kindlaksmääratud kokkuleppeid: uuritakse kindlaid lookusi, iga samm fikseeritakse range täpsusega ning tulemused vormistatakse ekspertiisiaktina. Kõik see on vajalik vältimaks erinevaid arusaamatusi ning muutmaks kogu protseduuri võimalikult usaldusväärseks. Samas nõuavad analüüsid seetõttu loomulikult rohkem aega ja kulutusi.

4.2.1. Kasutatavad terminid

Uuritavaid lookusi tähistatakse kombinatsioonidega numbritest ja tähtedest, näiteks lookus D35138, lookus vWA ja nii edasi. Lookuse alleele tähistatakse numbritega, mis näitavad korduste arvu antud alleelis: näiteks lookuses D351358 võivad esineda alleelid 9, 11, 12, 13, 14, 15, 15.2, 16, 17, 18 ja 19. Mingi lookuse alleelset koostist teatud isikul nimetatakse tema genotüübiks (näiteks genotüüp 15-17). Tavaliselt uuritakse 10-17 kordusjärjestuste arvu polümorfismiga lookust ning ühte soospetsiifilist markerit. (Terminid...2007)

Ekspertiisiakti ülesehitus on järgmine:

1. Tiitelleht
2. Testitud isikute andmed
3. Uuritud materjal- kus ja kelle poolt materjal võeti, kellelt materjal võeti ja millal materjal võeti.
4. Uurimiskäik, mis sisaldab endas uurimismetoodika lühikirjeldust.

5. Uurimistulemused- tabeli kujul on ära toodud kõik uurimistulemused lookuste kaupa kõigil uuritud isikutel.
6. Arvamus DNA eksperdi poolt. (Akti...2007)

Ekspertiisiakt väljastatakse allkirjastatuna molekulaargeneetika eksperdi poolt kriminaalkorrasvaleyandmete väljastamine on karistatav kuritegu (EV Karistusseadustik § 321). Tänu sellele, et ekspertiisiaktis on ära toodud uurimismetoodika ja kõik uuritud lookused, on kogu ekspertiisvajadusel korratav mõnes teises DNA teste tegevas asutuses, näiteks mujal Euroopas (analüüside tegemise alused, näiteks uuritavad lookused, on seal samad). (Küsimused...2007)

Kohtuekspertiisis kasutatavaid DNA analüüse tehakse Eestis ainult Eesti Kohtuarstlikus Ekspertiisibüroos. Kui aga tekib soov kordusanalüüsiks isaduse tuvastamisel, ei pea minema välismaale. Isadusteste tehakse Eestis ka meditsiinilaborites, näiteks TÜ Kliinikumi Ühendlaboris Molekulaardiagnostika keskuses. (Isaduse...2004)

4.2.2. DNA analüüs kriminaaljuhtumite korral

Eesti Kohtuarstliku Ekspertiisibüroo DNA analüüsi labori tööst moodustavad politsei tellitud analüüsid ligikaudu kaks kolmandikku. Töömaht kasvab pidevalt, sest politsei on avastanud DNA analüüsi efektiivsuse tõendusmaterjalina. Sageli on kriminaaljuhtumite korral analüüs aeganõudvam kui isaduse tuvastamisel, sest lisanduvad mitmesugused protseduurid: näiteks tõendite läbivaatamine, kus uuritakse, kas mingite objektide peal leidub verd, sülge või spermat. Alles pärast neid esmaseid protseduure saab alustada DNA analüüsiga. Võrreldes isadustestidega lisandub ka DNA puhtuse probleem: on alati oht, et sündmuspaigalt leitud DNA on reostunud. (Tasa 2003)

Kriminaaljuhtumite korral tuleb kindlasti arvestada seda, et DNA analüüs ei saa olla ainsaks asitõendiks- kohus võtab arvesse ka teisi ajaolusid. Põhjuseks on see, et DNA analüüs ei ole siiski 100 protsenti kindel- analüüsi metoodika on lihtsalt selline, et teatus eksimine on võimalik, tegu ei ole labori veaga. (*Ibid*)

Tulemuste väljendamisel võetakse aluseks elanikkonna uuring alleelide sagedusest. Parim tulemus kriminaaljuhtumi korral on olnud analüüs, kus väljaselgitatud unikaalsus oli üks kümnest miljonist. On üsna ebatõenäoline, et leidub teine kõikides uuritud lookustes

samasuguste alleelidega inimene. Seega vaatamata faktile, et DNA analüüs ei saa olla ainus tõestusmaterjal otsuse tegemisel, on see kindlasti üks mõjuvaimaid ja kindlaimaid. (Tasa 1998)

Analüüside tegemisel peab arvestama seda, et ühemunakaksikutel on identne DNA, aga ka lihtsalt suguluses olevatel isikutel on kokkulangevusi rohkem. Õdedel-vendadel on 25-protsendilise tõenäosusega VNTR lookuses identsed alleelid, kui aga analüüsitakse nelja lookust, langeb kokkulangevuse tõenäosus juba 0,4 protsendini (protsendid on antud juhtumite kohta, kus mõlemad vanemad on uuritud lookustes heterosügootid ning ei oma ühesuguseid allelele). Seega suguluses olevate inimeste puhul on DNA analüüsi usaldusväärsus mõnevõrra madalam, näiteks juhul, kui kuritöös on kahtlustatavad kaks venda. (DNA...1998)

STR piirkondade puhul on allelele vähem ja kokkulangevus sugulaste vahel veelgi tõenäolisem. Samas tuleb ikkagi arvestada, et DNA analüüsil ei uurita vaid ühte-kahte lookust, vaid 10-17: see viib ka sugulaste seas kokkulangevuse võimaluse miinimumini. Erinevad arutlused võimalikest kokkusattumustest on pigem teoreetilised- laboris kõikide reeglite järgi tehtavate analüüside puhul võib isegi öelda, et juhuslikud kokkulangevused on võimatud.

4.2.3. DNA analüüs isaduse tuvastamiseks

Kui kriminaaljuhtumite näol on tegemist tavainimesele küllaltki kaugel teemaga, siis isaduse tuvastamiseks tehtav DNA analüüs on kättesaadav igapäevale, kellel vajadus on. Seetõttu on põhjust antud teemat ka natuke pikemalt käsitleda kui kriminaaljuhtumite puhul tehtavaid analüüse, et anda ülevaade kogu protseduurist, mis Eesti Kohtuarstlikus Ekspertiisbüroos isaduse tuvastamiseks läbi viiakse.

Isaduse analüüs võib olla määratud kohtu poolt või lähtuda eraisiku enda soovist. Üks kolmandik isaduse testimiseks tulnud avaldusi jõuab Eesti Kohtuarstlikku Ekspertiisbüroosse väljastpoolt kohtuid. Analüüsi hind on 3600 krooni (ema, isa ja laps) ning kui isikuid on rohkem, tõuseb loomulikult ka hind. Algselt olid kohtu poolt määratud isadustestid tasuta- raha analüüsideks eraldati Eesti Kohtuarstlikule Ekspertiisbüroole riigieelarvest. Alates 2003. aastast on aga kõik analüüsid inimestele tasulised- see on kindlasti hoidnud tehtavate isadustestide arvu madalama. (Tasa 2003)

Isadustesti tegemiseks kohtuväliselt tuleb kontakteeruda Eesti Kohtuarstliku Ekspertiisbürooga. Selleks ei pea tingimata minema Tartusse Biomeedikumi (Ravila 19), vaid vastavad asutused proovide võtmiseks on ka Tallinnas (Narva mnt 46), Pärnus (Ristiku 1) ja Kohtla-Järvel (Ravi 10c). Kokkulepitud ajal peavad üheaegselt kohale minema kõik osapooled koos isikut tõendava dokumendiga. Ise kaasa toodud materjale ning salaja võetud proove (näiteks toodud juuksekarv) vastu ei võeta- protsess peab olema täielikult avalik ja kõigi jaoks kontrollitav. Testimiseks võetakse koha peal süljeproov suust vatitampoonile. Kui isadust tahetakse määrata raseduse ajal, analüüsitakse lootevedelikku. Erijuhtumiteks on ka abordimaterjali või lahkamisel võetud koeproovide kasutamine. (Küsimused...2007).

Analüüsiks kuluv aeg sõltub mitmesugustest asjaoludest. Laboris kulub vaid üks ööpäev, kuid palju aeganõudvamad on muud protseduurid. Esiteks on tegemist alaga, kus iga samm tuleb korrektselt fikseerida- kogu tööprotsessi fikseerimine ja tulemuste vormistamine võtab umbes nädala. Teiseks tuleb arvestada, et kui materjal on võetud väljaspool Tartut, lisandub ka transpordi aeg. Sellisel juhul lubatakse analüüsi vastused anda kahe nädala jooksul. Kui aga tegemist on mingil põhjusel eriti kriitilise juhtumiga, on võimalik tulemused välja selgitada minimaalselt ööpäeva jooksul. (Tasa 2003)

Isadustesti lõppjärgeldus võib olla kahesugune: bioloogilise isaduse välistus ja bioloogilise isaduse kinnitus. Tulemused on ekspertiisiaktis toodud tabelina, kus võib näha kõikide analüüsitud isikute genotüüpi uuritud lookustes. Bioloogilise isaduse kinnituse puhul on uuritud mehel ja lapsel kõikides lookustes vähemalt üks ühine alleel, välistuse korral aga puuduvad lapsel mitmes lookuses (vähemalt kahes) mehega ühised alleelid. Tabeli viimases reas on toodud soospetsiifilised markerid, mis määravad uuritud isikute soo. (Akti...2007)

Lisas 9 on toodud näide ühest ekspertiisiaktis toodud tabeli osast- eelnevalt kirjeldatu põhjal on sellest juba lihtne järeldusi teha. Mees peab omama kõikides lookustes viimases lahtris toodud lapse isa alleeli- sellisel juhul on bioloogiline isadus kinnitatud. Antud näites on selgelt tegemist bioloogilise isaduse välistusega (sobivust alleelis D16S539 loetakse lihtsalt kokkulangevuseks).

Bioloogilise isaduse välistus on 100-protsendiline. Kinnituse puhul päris 100-protsendilist tulemust kunagi ei määrata ning viiakse läbi kindlad sagedusarvutused määramaks tulemuste tõestusjõudu. Kõikide arvutuste aluseks on asjaolu, et iga alleel esineb kindla sagedusega-

alleelisagedused on leitud eelnevate uuringute tulemusena. Eestis lähtutakse arvutustes sagedusest, mis on antud valge rassi kohta. Esiteks on ekspertiisiakti arvamuste osas antud isaduse indeks (PI- *paternity index*)- see on tõenäosuste suhe, mis näitab, mitu korda on tõenäolisem, et testitud mees on lapse isaks võrrelduna juhuslikult võetud mehega. Teiseks on antud isaduse tõenäosus protsentides, mis on arvutatud lähtuvalt isaduse indeksist. Loomulikult on isaduse tõenäosus väga kõrge. Tulemus võib ekspertiisiaktis olla toodud kolmel viisil:

1. Bioloogiline isadus on väga tõenäoline (*very probable*)- väärtus vahemikus 99-99,9%.
 2. Bioloogiline isadus on ülimalt tõenäoline (*most probable*)- väärtus vahemikus 99,9-99,99%.
 3. Bioloogiline isadus on praktiliselt tõestatud (*virtually proven*)- väärtus üle 99,99%.
- (Akti...2007)

Vaadates neid protsente, aga ka kogu PCR meetodit, võib siiski öelda, et antud tõenäosusarvutused on pigem formaalsus ning isaduse kinnitus DNA analüüsil on põhimõtteliselt sajabrotsendiline.

4.3. DNA analüüsi edasine areng Eestis

Nagu ikka küllaltki uute ja läbimurdeliste avastuste puhul nii tehnikas, meditsiinis kui ka molekulaarbioloogias tundub, et tipp on saavutatud, leiutatud on maksimaalselt efektiivsed meetodid. Kuid alati on võimalik edasi areneda. DNA analüüsi avastamine RFLP meetodil tundus olevat ja oligi suur sündmus, kahtlemata oli seda ka PCR-i leiutamine. Saavutatud on see, et isikuid võib identifitseerida peaaegu eksimatult minimaalse koguse DNA põhjal. Samuti ei ole DNA analüüs enam mingi haruldus ei maailmas ega ka Eestis. Küsimus on pigem selles, kuidas teha kõike veelgi efektiivsemaks, lihtsamaks ja odavamaks.

Dotsent Ants Kure sõnul on juba praegu isikutuvastamisel katsetusel uus SNP-del ja DNA kiipidel põhinev meetod. SNP (*single nucleotide polymorphism*) järjestuste lihtsus seisneb selles, et need on bialleelsed- seega inimesel on kas üks või teine alleel. Antud meetodi puhul ei võrrelda alleelide pikkust nagu STR järjestuste puhul, vaid lihtsalt seda, kumb alleel antud isikul on. Tänu bialleelsusele saab SNP-sid analüüsida DNA kiipidel, kus fikseeritakse kas ühe, teise või mõlema alleeli signaal. Et saavutada PCR meetodiga sama eristusvõimet, uuritakse 10-14 lookuse asemel näiteks 50 SNP lookust. Kuid nagu öeldud, on tegemist alles katsetusjärgus oleva

meetodiga- analüüsid Eesti Kohtuarstlikus Ekspertiisbüroos tehakse ikkagi PCR meetodil. (Kurg 2007, lisa 10)

Teiseks küsimuseks on loomulikult raha- kas ja kuivõrd peaks riik DNA analüüsid inimestele kompenseerima. Kui soovitakse isadustesti nii-öelda enda südamerahuks, on loomulik, et selle eest ka ise makstakse. Kuid hetkel on tasulised ka kohtu poolt määratud analüüsid. Mõnes mõttes tundus märksa mõistlikum 2003. aasta eelne variant, kus kohtu poolt määratud DNA analüüsideks eraldati Eesti Kohtuarstlikule Ekspertiisbüroole riigieelarvest raha. Näiteks Soomes kehtib süsteem, kus analüüsi eest maksab riik juhul, kui osapooled on pöördunud kohtusse (Tasa 1998). Samas tekib jällegi küsimus, kas maksumaksja peab tasuma analüüside eest, mida tehakse päranduse või alimentide küsimuse lahendamiseks. Kindel on aga see, et 3600 krooni või rohkem maksev analüüs käib nii mõnelegi üle jõu ning vähendab mingil määral tehtavate analüüside hulka.

Kolmandana võib arutada selle üle, kas DNA analüüs peaks olema kättesaadavam erinevates asutustes. Põhimõtteliselt ei oleks vastava tehnika hankimine ju probleem, kuid kas on vaja võimalust teha analüüsi igas meditsiinasutuses? Kriminialistika seisukohalt ei tuleks see kõne allagi, kuna tegu on äärmiselt tundliku alaga ning maksimaalne formaalsus ja kontroll on hädavajalikud. Arvestades aga DNA analüüsi populaarsuse jätkuvat kasvu, võib eeldada, et isadustestid Eesti Kohtuarstlikus Ekspertiisbüroos saavad koormavaks lisäülesandeks, mõnes mõttes need seda juba ongi. Arvatavasti hakkab Eesti Kohtuarstlik Ekspertiisbüroo tulevikus tegema vaid kohtu poolt määratud analüüsi ning vabatahtlikud isadustestid jäävad teiste asutuste kanda. Kindlasti tuleb aga arvestada, et DNA analüüsi puhul ei saa tegemist olla vabalt leviva teenusega, sest antud valdkonnas on oluline kõrge usaldusväärsus ning lisaks ei tohi ühe või teise inimese DNA profiil olla kergesti kättesaadav informatsioon. Kindlad reeglid ja kokkulepped on hädavajalikud ning välisriikidega sama taseme hoidmine ja meetodite kooskõlastamine samuti.

KOKKUVÕTE

Polümeraasi ahelreaktsioon ehk PCR on tänapäeval üks levinumaid molekulaarbioloogilisi meetodeid ning selle tähtsaks kasutusala on ka DNA analüüs kriminaalekspertiisis ja isaduse tuvastamisel. Kasutades ära inimese DNA-s leiduvaid kordusjärjestusi, on välja töötatud põhimõte, mille abil on võimalik isikuid üksteisest eristada vaid väga väikse koguse DNA põhjal - just see muudab PCR meetodi efektiivseks kriminaaljuhtumite korral. PCR-i põhimõte seisneb selles, et uuritavat DNA lõiku ehk lookust paljundatakse, kuni on saadud piisav kogus analüüsiks. Seejärel selgitatakse välja uuritava lookuse pikkus. Korrates protseduuri mitme erinevast piirkonnast pärit lookusega, saadakse uuritava isiku individuaalne DNA profiil.

Tänu PCR meetodi lihtsusele ja kiirusele on DNA analüüsist saanud tänapäeval laialt levinud protseduur, mida kasutatakse aktiivselt nii kriminalistikas kui ka eraisikute poolt isaduse tuvastamiseks. Uurimustööd tehes selgus, et Eestis on antud valdkonnas maailmatasemel: Eesti Kohtuarstlikus Ekspertiisbüroos kasutatakse samu põhimõtteid, mida ülejäänud maailmas, osaletakse regulaarselt pädevuskontrollides ning tagatakse DNA analüüsi kättesaadavus igal vajalikul juhtumil nii politseile kui ka eraisikutele.

Lisaks tänaseks saavutatule toimub Eestis pidev areng täiustamaks DNA analüüsi veelgi - juba on katsetusel uued ja kiiremad meetodid ning kindlasti ei ammendu uurimisvõimalused selles valdkonnas niipea. Selgub, et Eestis on kriminalistikas ja isaduse tuvastamisel kasutatava DNA analüüsi seisukohalt saavutatud olukord, kus probleemiks ei ole enam võimaluste, tehnoloogia või teadmiste puudus, vaid pigem vajadus suurema hulga ekspertide ja laborite järele, et täita nõudlust. Selline tendents on vaid positiivne ning on väga tõenäoline, et läbimurdeid nagu PCR saavutatakse tulevikus veelgi.

Nagu käesolevast uurimusest võib järeldada ei ole nägemus DNA analüüsist kui erandjuhtudel kasutatavast meetodist tänapäeval kindlasti enam korrektne- tegu on lihtsalt inimestele võõra teemaga. Mõistet DNA analüüs kasutatakse küllaltki tihti, kuid teadmata, mida see tegelikkuses tähendab. Töö ongi seetõttu heaks lugemiseks neile, kes DNA analüüsi põhimõttest huvituvad, eriti arvestades asjaolu, et kättesaadavat eestikeelset materjali antud valdkonnas on väga vähe.

SUMMARY

PCR is one of the most common methods in molecular biology included in forensic DNA profiling and in analyses of disputed paternity. It was discovered in 1984 and since then the method has gained popularity. DNA analysis is based on the fact that there are specific regions in DNA, which have made it possible to identify people individually as those regions have many various alleles. During PCR these regions are amplified to make it possible to analyze them. After that the length of these regions is measured to have a DNA profile of a certain person. PCR makes it possible to analyze very small amount of DNA- this is why the method is extremely useful in criminal cases.

In addition to finding out how DNA profiling is done, the aim of this year paper was to research how common DNA analyses nowadays is and what is the situation in Estonia. The research showed that nowadays DNA profiling is not a method that is used only in rare cases- it is a popular procedure in criminal cases to identify people and for private individuals in cases of disputed paternity. Estonia has also a very high standard in this field: DNA analyses is assessable for almost everyone and the methods that are used are comparable with the ones used all over the world. In addition, DNA profiling continues to develop and already new methods are experimented in Estonia. Nowadays the problem is not the lack of technology or opportunities but the lack of experts and laboratories to fulfill the demand for DNA analyses.

DNA profiling tends to be a distant theme for people- the concept is used often but the real meaning of it is usually not known. That is why this year paper is recommended for those interested in DNA profiling and its molecular biological bases, especially because there are not many accessible materials about it.

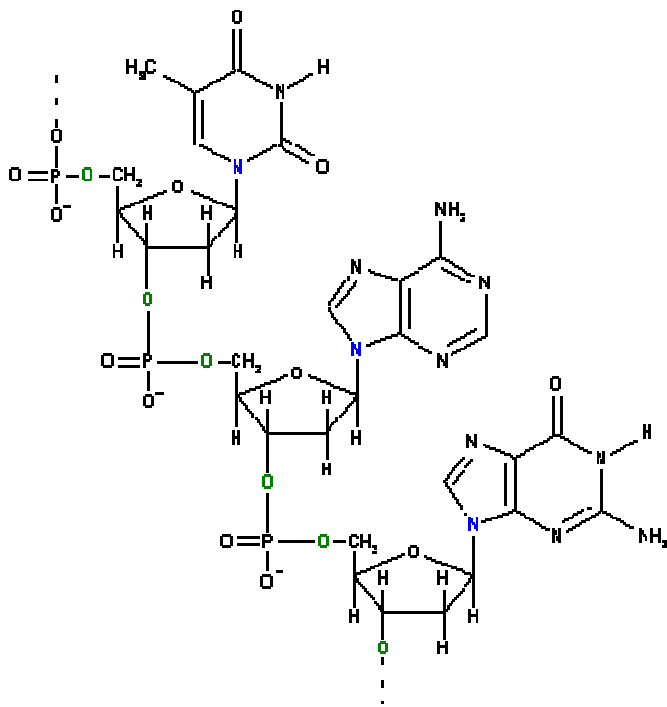
KASUTATUD KIRJANDUS

1. Akti...= *Akti lahtimõtestamine. DNA analüüs.* 2007. <http://biomedicum.ut.ee/dna/akt.htm> (27. september 2006)
2. DNA...= *DNA Profiling.* 1998. European Initiative for Biotechnology Education. <http://www.ut.ee/biodida/eibe/pdf/Unit02EN.pdf> (27. september 2006)
3. Isaduse...= *Isaduse tuvastamine ja isikute identifitseerimine.* 2002. <http://www.dnatest.med.ee/uuringud/isadus.html>
4. Kivi, S. 1999. *Tsütogeneetika loengud.* <http://www.ebc.ee/loengud/sirje/tsytogeneetika.html> (24. oktoober 2006)
5. Kivisaar, M. 2004. <http://www.ebc.ee/tymri00/loengud/maia/gen2/Geneetika2a.htm>
6. Kurg, A. 2004. *Hübriidisatsioonitehnikad ja polümeraasi ahelreaktsioon.* http://www.biotech.ebc.ee/Antsu_loengud/Loeng4vork.pdf (12. jaanuar 2007)
7. Kurg, A.: Autori intervjuu. Üleskirjutis. Pärnu 20. jaanuar 2007.
8. Küsimused...= *Küsimused ja vastused. DNA analüüs.* 2007. <http://biomedicum.ut.ee/dna/kysimused.htm> (27. september 2006)
9. Molekulaarse...= *Molekulaarse biotehnoloogia praktikumi juhend.*2000. Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituut. <http://www.biotech.ebc.ee/praktikum/juhend.html> (4. jaanuar 2007)
10. Pöld, T. 2007. *DNA ekspertiis surub mõrtsuka nurka.* – Tiiu põllu intervjuu Anu Aaspõlluga. Postimees. 27. jaanuar 2007.
11. Zilmer et al 1996 = Zilmer, M.; Karelson, E.; Vihalemm, T. 1996. *Meditsiiniline biokeemia 1.* Tartu: Tartu Ülikool.
12. Zilmer et al 2006 = Zilmer, M.; Karelson, E.; Vihalemm, T.; Rehema, A.; Zilmer, K. 2006. *Inimorganismi biomolekulid ja metabolism.* Tartu: Tartu Ülikool.
13. Tasa, G. 1998. *DNA analüüs aitab tuvastada inimesi.* – Postimees. 25. jaanuar 1998.

14. Tasa, G. 2003. *Kõnelevad geenid.*
<http://www.genomics.ee/index.php?lang=est&show=5&sub=86&nid=217> (20. jaanuar 2007)
15. Terminid...= *Terminid. DNA analüüs.* 2007 <http://biomedicum.ut.ee/dna/termin.htm> (27. september 2006)
16. Tohver, V. 1977. *Üldine biokeemia.* Tallinn: Valgus.

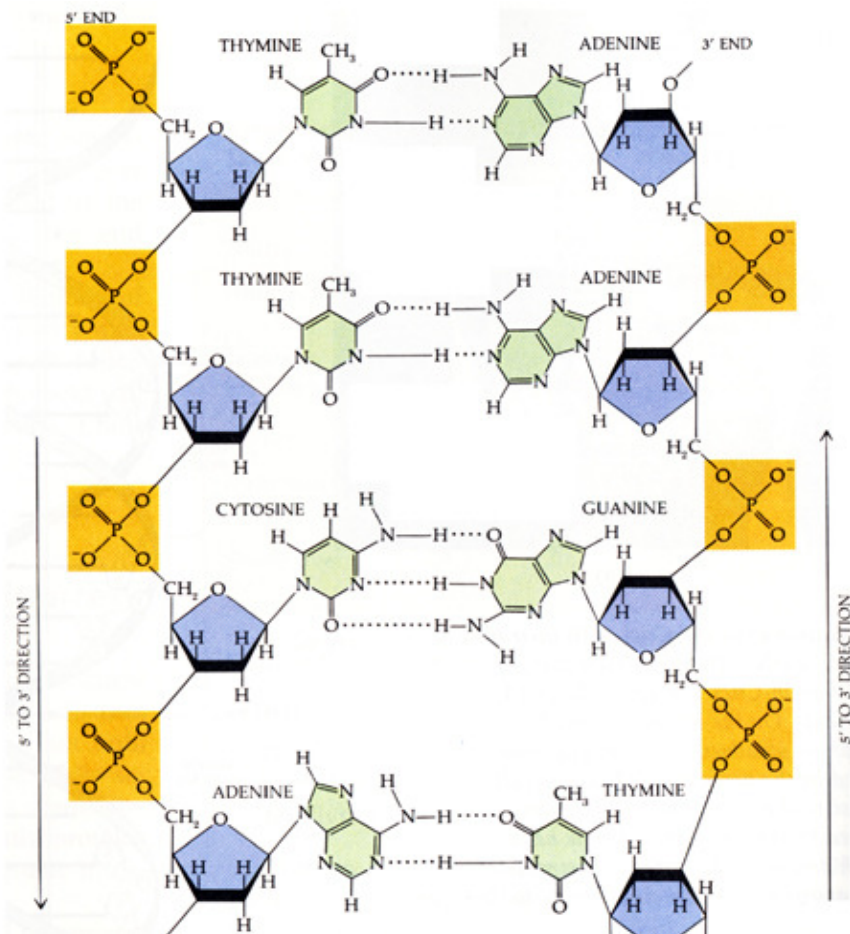
LISAD

Lisa 1: Polinukleotiidaהל



<http://www.otterbein.edu/home/fac/dnhjhs/chem220/tutorial4/polynucleotide.gif> (24. oktoober 2006)

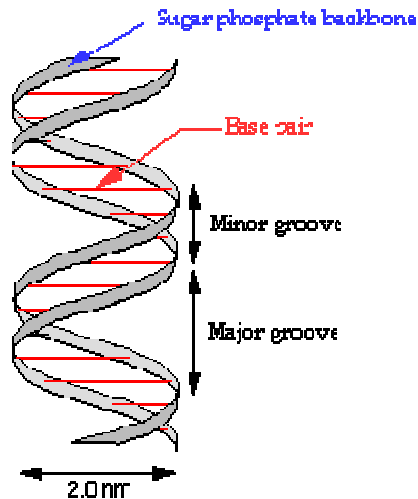
Lisa 2: Kaks lineaarset polünukleotiidahelat



<http://oak.cats.ohiou.edu/~ballardh/pbio475/Heredity/DNA-double-helix.JPG> (24. Oktoober 2006)

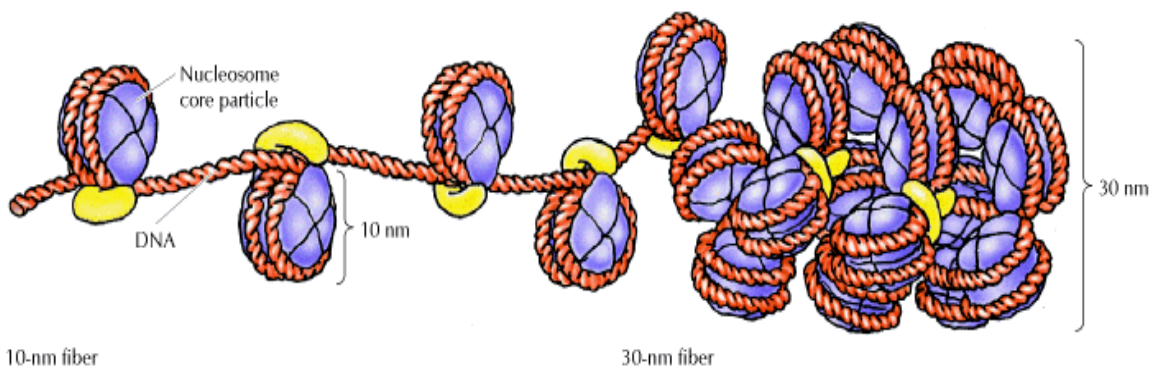
Lisa 3: Paremale pöörduv biheeliks

(*Sugar phosphate backbone*- fosfaat- ja süsivesikugruppidest tüvi, *base pair*- lämmastikaluste paar, *minor groove*- väike õnarus ja *major groove*- suur õnarus)



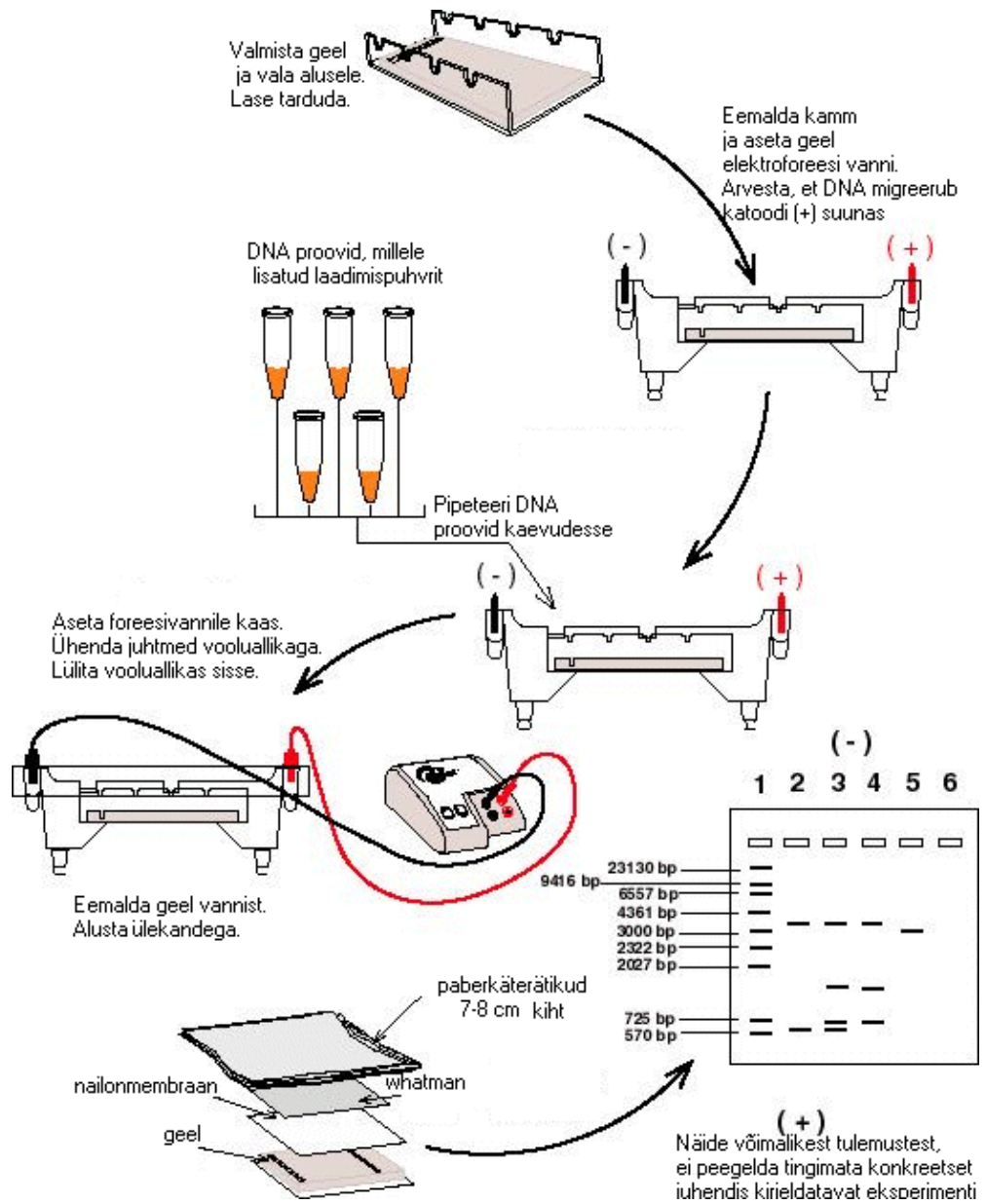
<http://www-scf.usc.edu/~chem203/resources/DNA/helixdraw.gif> (24. oktoober 2006)

Lisa 4: Nukleosoom, niitjas DNA ja polinukleosoom



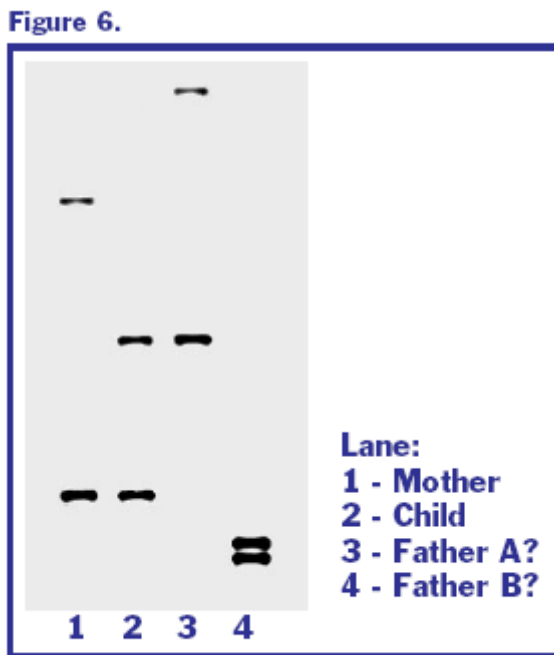
http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/seitz-stefanie-2004-10-20/HTML/seitz_html_21996ee1.png (24. oktoober 2006)

Lisa 5: Southern blotting



(Molekulaarse...2000)

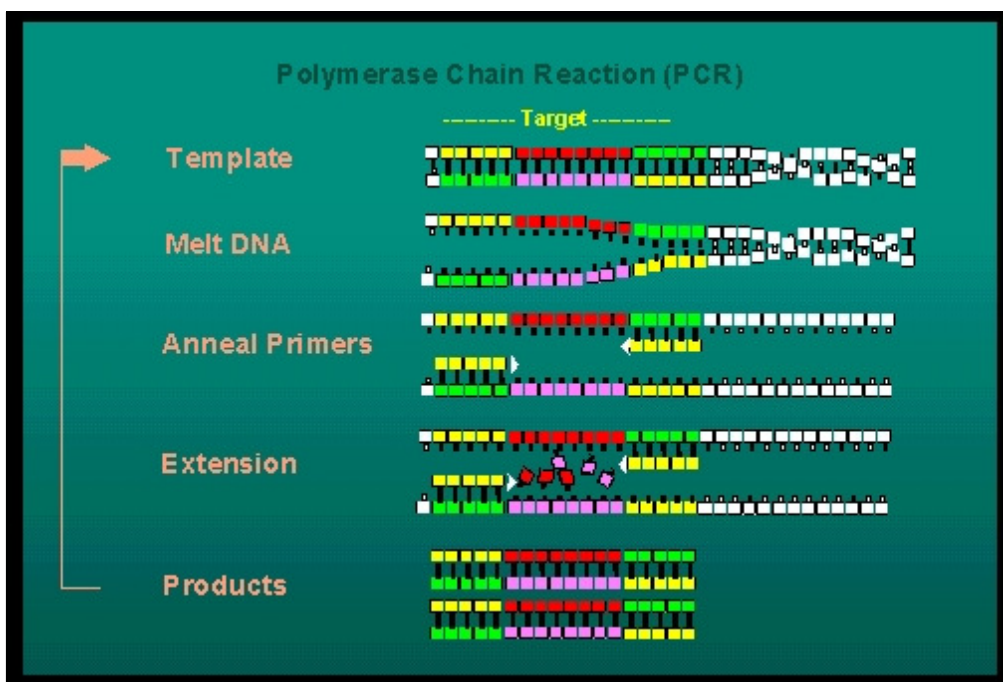
Lisa 6: Näidis RFLP analüüsi tulemustest:



(DNA...1998)

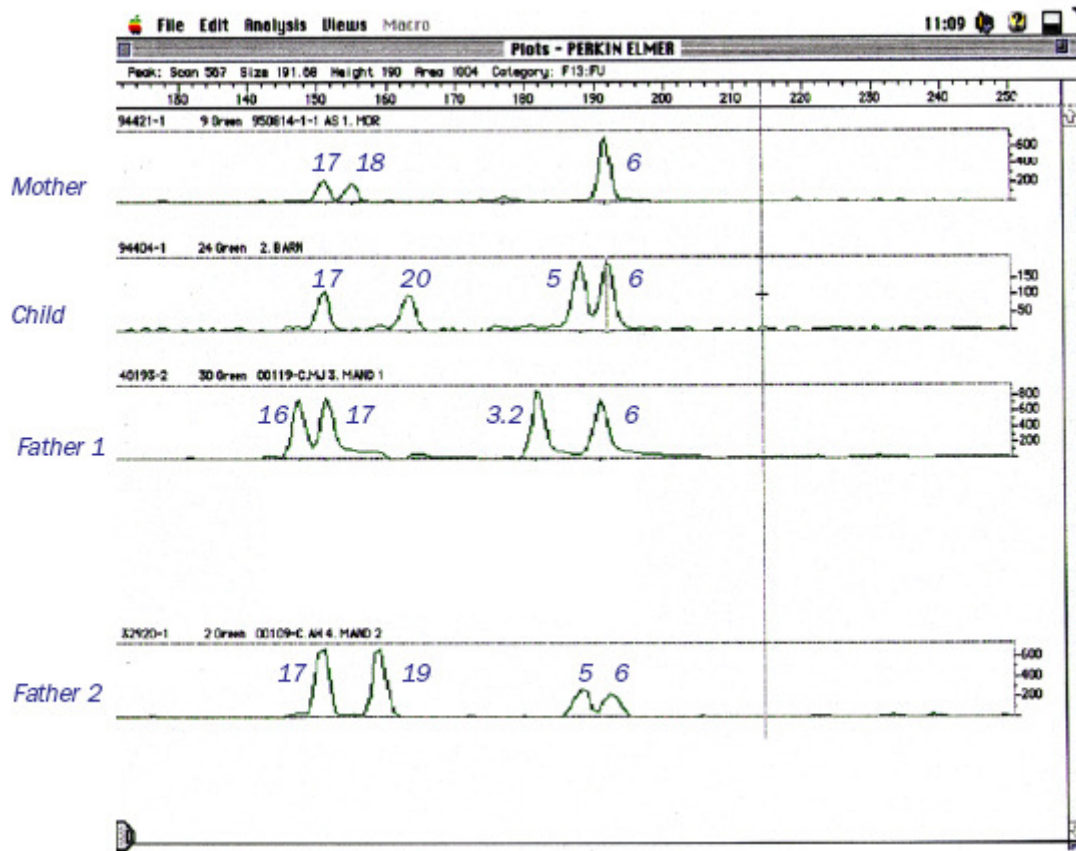
Lisa 7: PCR-i ühe tsükli skeem

(*Template*- DNA proov, *target*- märgistatud piirkond, *melt DNA*- DNA denaturatsioon, *anneal primers*- annealing praimeritega, *exenion*- eksensioon, *products*- saadud DNA lõigud)



<http://www.biotech.ttu.ee/index.jsp?page=materials&subject=YKB3340-> (20. jaanuar 2007)

Lisa 8: Näidis PCR analüüsi tulemustest:



(DNA...1998)

Lisa 9: Näidis ekspertiisiaktis toodud tabeli osast

Lookus	EMA	LAPS	MEES	Alleel isalt
D3S1358	16-17	15-17	16-17	15
vWA	16-17	14-17	17-17	14
D16S539	12-12	12-12	9-12	12
D2S1338	18-24	20-24	19-24	20

(Akti...2007)

Lisa 10: Intervjuu dotsent Ants Kurega

1. Kas on õige, et inimese genoomis on 90% DNA-st mittekodeeriv või on mõeldud kindlat rakku kindlal eluperioodil?

Tegelikult ongi inimese genoomist DNA-st vaid 3-5% kodeeriv. See on niimoodi kõigis tuumaga rakkudes. Diferentsiaalne geeniekspressioon (st. erinevad geenid avalduvad erinevates rakutüüpides erineval ajahetkel) on teine asi, kusjuures kasutatakse ikka seda sama 3-5%. See „ülejäanud“ DNA ei ole aga sugugi kasutu. Pigem on meie enda teadmised selle DNA rolli suhtes puudulikud. Arvatakse, et selline DNA vastutab mingite kontrollfunktsioonide eest. Võib öelda, et kuigi DNA primaarstruktuuri tasandil võib asi meie jaoks selge olla (st. inimese genoom on järjestatud ning me enam-vähem teame, millest see koosneb), siis meie teadmised selles osas kuidas inimese genoom töötab, on üsna puudulikud.

2. Kas mingitel puhkudel kasutatakse Eestis analüüsiks ka mtDNA-d?

Loomulikult. Mitokondriaalset DNA-d kasutatakse eelkõige emasliinide uuringutel nii isikutuvastamisel kui ka näiteks arheogeneetikas. MtDNA suur eelis genoomse DNA ees seisneb selles, et rakus on palju mitokondreid ja seega ka mtDNA-d. Seetõttu eelkõige just vanade säilmete puhul on mtDNA-st rohkem lootust saada mingeid geenifragmente kui genoomsest DNA-st. Üks paremaid ja huvitavamaid näiteid mtDNA kasutamisest isikutuvastamisel on Vene viimase tsaari Nikolai Romanovi ja tema perekonna säilmete tuvastamine..

3. Kas kohtupraktikas ja isaduse tuvastamisel on PCR-i kõrval tänapäeval kasutusel veel ka minisatelliidid või mõni muu analüüsimeetod?

Kasutatakse ikkagi mikrosatelliite. Viimasel ajal on üritatud isikutuvastamisel kasutada ka SNP-sid ning DNA kiipidel põhinevaid meetodeid.

4. Mida SNP järjestustel põhinev analüüs endast kujutab?

SNP järjestustel on kaks alleeli. Kui STR-ide puhul vaadati alleeli pikkust, siis SNP puhul vaadatakse lihtsalt kumb kahest alleelist on. Et saavutada samasugust eristusvõimet nagu SNR-i puhul uuritakse 12 või 14 lookuse asemel näiteks 50 SNP lookust. Tänu sellele, et SNP-l on vaid

kaks alleeli, ei pea nende analüüsimiseks tegema elektroforeesanalüüsi, vaid saab edukalt kasutada DNA kiipe- vaadatakse lihtsalt kas on ühe, teise või mõlema alleeli signaal.

5. DNA puhastamise kohta on TÜ biotehnoloogia praktikumis räägitud fenooliga ekstraheerimisest. Kas see ongi põhiliselt kasutatav võimalus?

Fenooliga ekstraheerimine on vaid üks võimalus Põhimõte on eelkõige selles, et kuidagi on vaja rakud puruks saada (verest eraldamisel kasutatakse selleks osmootset šokki või mindit detergenti, mis rakumembraani lõhuks) ning seejärel seotakse reaktsioonikeskkonnast ära valgud. Just valkude sidumiseks ja denatureerimiseks kasutatakse fenooliga ekstraheerimist, sest piltlikult öeldes ei pääse selle eest ükski valk. Kui valgud on ära seotud, on vaja eraldada nukleiinhapped. Selleks on jällegi mitmeid võimalusi. Näiteks on võimalik kasutada DNA väljasoolamist. See käib nii, et kõigepealt tekitatakse DNA ja soola kompleks näiteks kas või keedusoolaga. Seejärel seotakse keskkonnast ära vesi, näiteks etanooli abil (96 või 100-protsendiline etanool seob hästi vett). Kui vesi reaktsioonikeskkonnast ära siduda, langeb DNA-soolakompleks lahusest välja- nüüd on seda võimalik pesta ning seejärel vees või puhvis lahustada. Seega võimalusi on mitmeid- millist kasutada, sõltub sellest, kui puhast DNA-d on vaja ja loomulikult ka eksperimentaatori rahakotist.

6. PCR-i etappideks on toodud ekstensiioon ja lõppekstensiioon. Milleks on viimane vajalik?

Ekstensiioon tähistab sünteesi etappi PCR reaktsiooni käigus. Kuna aga PCR-i käigus võib tekkida küllalt palju poolikuid või mitte päris lõpuni sünteesitud ahelaid, siis kasutatakse lõppekstensiiooni, mille käigus peaks saama ära lõpetada ja täis sünteesida kõik poolikud ja mittetäielikud produktid.