



DNA:N TOISTOJAKSOJEN MÄÄRITTÄMINEN JA YKSILÖNTUNNISTUS PCR:N AVULLA

Työohjeen testaus

Tarja Tuovinen

Kehittämistehtävä
Toukokuu 2010
Solu- ja molekyylibiologian
erikoistumisopinnot
Tampereen ammattikorkeakoulu

TAMPEREEN AMMATTIKORKEAKOULU

Tampere University of Applied Sciences

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Solu- ja molekyylibiologian erikoistumisopinnot

TARJA TUOVINEN

DNA:n toistojaksojen määrittäminen ja yksilöntunnistus PCR:n avulla (Työohjeen testaus)

Kehittämistehtävä 31 s., liitteet 6 s.
Toukokuu 2010

Kehittämistehtävän tarkoituksena oli testata olemassa olevan työohjeen (Use PCR and Single Hair to Produce a “DNA Fingerprint”) toimivuutta. Tavoitteena oli muokata ohjeesta toimivampi työohje, jota Tampereen ammattikorkeakoulun opiskelijat voisivat käyttää laboratorioharjoituksissaan.

Eukaryoottien DNA:sta vain pieni osa sisältää proteiineja ja RNA:ta koodaavia geenejä. Muu osa on ei-koodaavaa aluetta, josta suurin osa sisältää erilaisia DNA:n toistojaksoja. Näissä toistojaksoissa esiintyy runsaasti periytyvää muuntelua yksilöiden välillä, mitä käytetään hyväksi DNA:han perustuvassa yksilöntunnistuksessa esimerkiksi rikostutkinnassa. Niin sanotut VNTR (variable number of tandem repeats) -toistojaksot sisältävät runsaasti tällaisia toistojaksoja. Työssä määritettiin kahden VNTR-lokuksen, APOC2:n ja D1S80:n, toistojaksoja. Materiaalina käytettiin hiusten juuria, joista eristettiin DNA:ta ja monistettiin siitä DNA:n toistojaksoja PCR:n avulla. Monistustuotteet ajettiin agarosigeelille, jonka avulla määritettiin niiden koko.

D1S80-lokuksen osalta työ onnistui hyvin alkuperäisellä työohjeella tehtynä. Tuloksena saatiin agarosigeelille kaksi erikokoista DNA:n monistunutta jaksoa, jotka olivat peräisin kahdesta erilaisesta alleelistä. Jaksojen koot ja kopiomäärät vastasivat yleisiä VNTR-jaksojen kokoja ja kopiomääriä. APOC2:n osalta tulokset olivat epäselviä, ja APOC2:n PCR-reaktiolle tehtiinkin optimointia magnesiumin pitoisuudelle. Magnesium-pitoisuudella 2,0 mM, joka oli suurempi kuin alkuperäinen pitoisuus, saatiin parhaat tulokset. Tällöin geelillä oli nähtävissä kahden eri alleelin monistustuotteet, mutta näiden lisäksi näkyi geelillä muutamia epäselviä vyöhykkeitä.

D1S80-lokuksen osalta työohje oli käyttökelpoinen ilman suurempia muutoksia. Sen sijaan APOC2-lokuksen osalta PCR vaatisi magnesium-pitoisuuden lisäksi muidenkin reaktioon osallistuvien tekijöiden optimointia, jotta tuloksista saataisiin paremmin tulkittavia.

Asiasanat: Toistuva DNA, yksilöntunnistus, VNTR, PCR, APOC2, D1S80.

SISÄLLYS

1 JOHDANTO	4
2 TOISTUVA DNA	5
2.1 Highly repetitive DNA	6
2.2 Middle repetitive DNA	7
2.3 Variable number of tandem repeats (VNTR) ja short tandem repeats (STR)	8
2.3.1 Lokus D1S80	9
2.3.2 Lokus APOC2	9
3 TOISTUVA DNA RIKOSTUTKINNASSA	11
4 TYÖSSÄ KÄYTETTYJEN MENETELMIEN PERIAATTEET	14
4.1 Polymeraasiketjureaktio (PCR) ja sen optimointi	14
4.2 Agaroosigeelielektroforeesi.....	18
5 TYÖN SUORITUS	20
5.1 DNA:n eristämislouoksen (DNA Extraction Buffer) valmistaminen ja hiuksen DNA:n eristäminen.....	20
5.2 PCR APOC2-lokuksesta	21
5.3 PCR D1S80-lokuksesta.	22
5.4 Agaroosigeelielektroforeesi PCR-tuotteista.....	23
5.5 APOC2-lokukseen PCR:n magnesium-pitoisuuden optimointi.....	23
6 TULOKSET.....	26
7 TULOSTEN POHDINTA JA JOHTOPÄÄTÖKSET.....	28
LÄHTEET.....	30
LIITTEET	32

1 JOHDANTO

Ihmisen genomi koostuu proteiineja koodaavista geeneistä ja ei-koodaavista DNA-jaksoista. Suurin osa ei-koodaavasta DNA:sta sisältää erilaisia toistojaksoja, joissa tietyt kooltaan vaihtelevat emäsjaksot toistuvat useita kertoja. Suurimmalle osalle näistä toistojaksoista ei tunneta vielä tehtävää. DNA:n toistuvilla jaksoilla esiintyy periytyvää muuntelua, joka on yleensä syntynyt virheellisistä duplikaatioista DNA:n kahdentuessa. Jokaisella henkilöllä on yksilöllinen määrä toistojaksoja, ja näiden toistojaksojen yhdistelmä muodostaa perustan yksilön tunnistamiselle. Yksilön henkilökohtaiset toistojaksot muodostavat niin sanotun ”DNA-sormenjäljen” (DNA fingerprint). On erittäin pieni todennäköisyys, että eri henkilöillä olisi sama toistojaksojen yhdistelmä, joten tätä DNA-identifikaatiotutkimusta käytetään hyväksi yksilön tunnistamisessa esimerkiksi rikostutkinnassa ja sukulaisuussuhteiden määrittämisessä.

DNA:n toistojaksot määritetään yleensä PCR (polymerase chain reaction) -tekniikan avulla. PCR:llä voidaan näytteestä eristettyä DNA:ta monistaa moninkertainen määrä, joka sitten voidaan erotella geelielektroforeesilla. Näin näytteitä voidaan verrata keskenään ja suorittaa esimerkiksi yksilöntunnistusta.

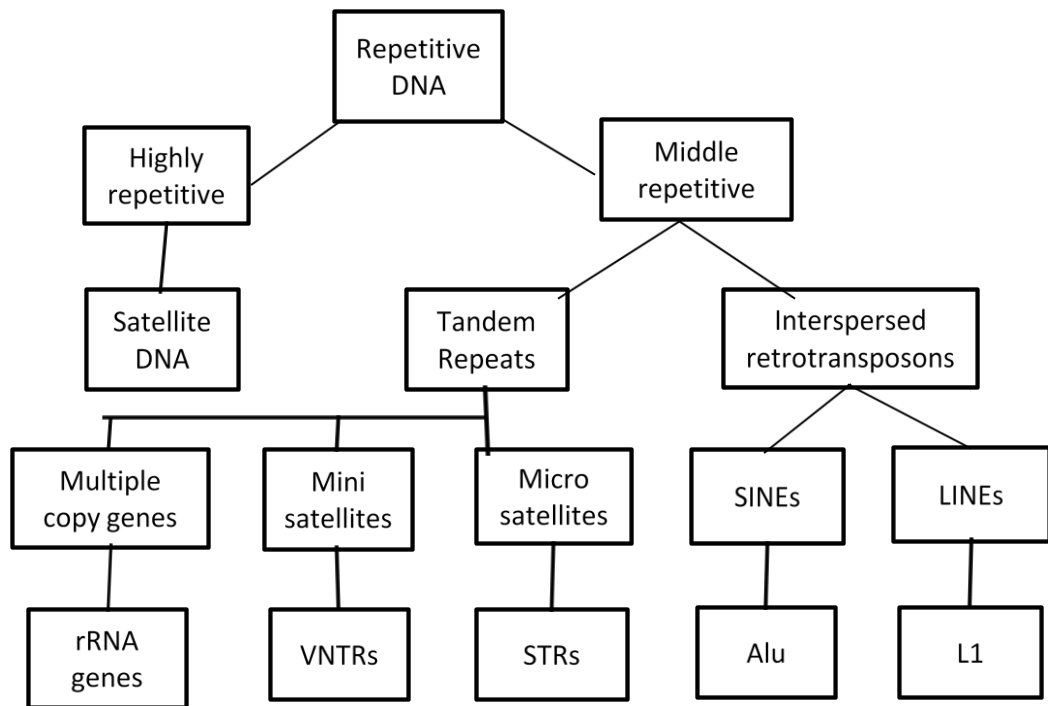
Työn tarkoituksena oli testata DNA-sormenjälkitutkimuksen toimivuutta ja soveltuvuutta mahdolliseen opiskelijakäyttöön Tampereen ammattikorkeakoulussa. Työ tehtiin soveltaen työohjetta ”Use PCR and Single Hair to Produce a “DNA Fingerprint””, jonka ovat laatineet A. M. Campbell, J.H. Williamson ja D. Padula Davidson Collegesta USA:sta. Tavoitteena oli saada aikaan kyseisestä ohjeesta toimiva ja yksinkertaisempi työohje, jota opiskelijat voisivat käyttää laboratorioissa, joissa on tarkoitus harjoitella DNA:n eristämistä, PCR-menetelmää ja geelielektroforeesia. Työn materiaalina käytettiin omien hiusten hiusjuuria (follikkeleja).

2 TOISTUVA DNA

Eukaryooteilla vain pieni osa DNA:sta koodaa proteiineja ja RNA:ta. Muu osa on ei-koodaavaa aluetta, jonka toiminta on osittain vielä tuntematonta. Ihmisellä tämän ei-koodaavan alueen osuus on jopa 97 %. Proteiineja koodaamaton alue koostuu erilaisista geenien säätelyjaksoista, introneista, pseudogeeneistä sekä suurimmaksi osaksi toistuvasta DNA:sta. (Vuorinen 2005.) Tosin osa toimivista geeneistäkin voi esiintyä useampana kuin yhtenä kopiona (multiple copy genes) (Klug, Cummings, Spencer & Palladino 2009, 313).

Eukaryoottien nukleotidijärjestysten koostumuksia voidaan tutkia analysoimalla DNA:n renaturaation kinetiikkaa eli aikaa, jona erilliset denaturoidut DNA-juosteet pariutuvat uudelleen. Kun DNA-molekyyli katkaistaan fragmenteiksi, niin ne fragmentit, joissa on enemmän toistuvia jaksoja, renaturoituvat nopeammin kuin jaksot, jotka sisältävät vain yhtä kopiota emäsjaksosta. Näin on huomattu, että eri eukaryoottien genomeissa toistuvan DNA:n määrä ja laatu vaihtelevat suuresti. Suurimmalla osalla eukaryooteista genomi koostuu kolmesta pääkomponentista: yhden kopion sisältävät sekvenssit (unique sequences, yleensä 30-75 % kromosomaalisesta DNA:sta), highly repetitive sequences ja middle repetitive sequences. (Hartl & Jones 2005, 274–278.)

DNA:n toistojaksot luokitellaan esiintymistiheyden sekä ilmenemistavan ja –paikan perusteella (kuvio 1, sivu 6).



KUVIO 1. DNA:n toistojaksojen luokittelua (Mukaillen Klug ym. 2009, 313).

2.1 Highly repetitive DNA

Highly repetitive DNA:ssa lyhyet nukleotidijaksot toistuvat useita kertoja. Ihmisen genomista tätä DNA:ta on noin 5–10 % (Räsänen 2004). Highly repetitive DNA:ta esiintyy peräkkäisinä kasautumina kromosomien heterokromatiinialueilla, lähellä sentromeereja (Lewin 2000, 107).

Highly repetitive DNA:han kuuluu myös varsinainen satelliitti-DNA, jossa lyhyet DNA-jaksot esiintyvät samansuuntaisina 5-300 emäsparin toistoina. Näitä toistoja voi olla genomissa jopa 10^5 kopiota. (Hartl & Jones 2005, 278–279.) Satelliitti-DNA pystytään tunnistamaan ja fraktioimaan CsCl-gradientissa ultrasentrifugoimalla, missä satelliitti-DNA muodostaa tiheydensä perusteella erillisen, pienemmän piikin muuhun genomiin verrattuna (Lewin 2000, 106). AT-rikas DNA on ominaispainoltaan keskimäärin kevyempää kuin GC-rikas DNA. Satelliitti-DNA voidaan emäskoostumuksensa ja ominaispainonsa perusteella jakaa vielä neljään ryhmään: Satelliitti 2 ja 3 (koko 5 emäsparia), satelliitti 1 (AT-rikas, 25–48 emäsparia), alfa-satelliitti-DNA (171 emäsparia) ja beetta-satelliitti-DNA (68 emäsparia) (Halkka 2001).

2.2 Middle repetitive DNA

Middle repetitive DNA:ta on ihmisen genomista noin 25 %. Nämä jaksot voidaan jakaa peräkkäin toistuviin (tandem repeats) ja eri puolille genomia levinneisiin (interspersed retrotransposons) toistojaksoihin. (Räsänen 2004.) Middle repetitive DNA koostuu jaksoista, joita esiintyy genomissa 10–1000 kopiona (Hartl & Jones 2005, 278).

Tandem repeats -toistojaksot koostuvat useista erilaisista, peräkkäin toistuvista jaksoista, joiden pituus vaihtelee 1-2000 emäsparin välillä, mutta yleensä jakson pituus on kuitenkin alle 10 emäsparia. Peräkkäisissä jaksoissa voi esiintyä myös pientä vaihtelua. Tandem repeats -toistojaksot käsittävät 10–15 % nisäkkäiden koko genomista. Ne jaetaan eri puolilla genomia sijaitseviin minisatelliitteihin ja mikrosatelliitteihin. Tandem repeats -jaksoihin luetaan myös tiettyihin kromosomeihin ryhmittyneet toistuvat geenit (multiple copy genes). (PCR 2006.)

Mikrosatelliitteiksi kutsutaan DNA-jaksoja, joissa toisto sisältää 1–13 emäsparia. Yleisimmin toistojaksojen pituus on näissä 1–4 emäsparia, ja ne toistuvat enintään 150 emäsparin pituisina peräkkäisinä jaksoina. Mikrosatelliitit ovat luultavasti syntyneet DNA:n replikaation yhteydessä, kun sama lyhyt jakso on kopioitunut virheellisesti kahdesti. (Lodish, Berk, Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, Zipursky & Darnell 2003, 412.) Yleisin mikrosatelliitti ihmisellä on dinukleotidi (5'-AC-3')_n, joka esiintyy yli 80 000 paikassa eri puolilla ihmisen genomia (Tropp 2008, 249).

Minisatelliitit sisältävät 15–100 emäsparin jaksoja, jotka muodostavat kohtalaisen lyhyitä 20–50 toistojakson alueita. Nämä ovat vain 1–5 kb:n kokoisia, kun taas varsinainen satelliitti-DNA on kooltaan noin 20–100 kb:a. (Lodish ym. 2003, 413.) Minisatelliitit ovat hyvin yleisiä nisäkkäiden genomeissa. Minisatelliitteja on löydetty useista alleeleista ja näissä alleeleissa esiintyy runsaasti polymorfiaa. Minisatelliittien suuri vaihtelu yksilöiden välillä antaa mahdollisuuden tarkkaan yksilön DNA-tunnistukseen. (Lewin 2000, 113.)

2.3 Variable number of tandem repeats (VNTR) ja short tandem repeats (STR)

Minisatelliitteihin luettavat VNTR (variable number of tandem repeats) -toistojaksot ovat 14–100 emäsparin pituisia. Niiden kopiomäärät vaihtelevat yleensä 2:sta 100:aan, mutta kopioita voi olla jopa 1000–5000 kappaletta. VNTR-toistojaksoja löytyy sekä geenien sisältä että väleistä. (Räsänen 2004.) Toistojaksojen variaatio on peräisin pienten nukleotidijaksojen virheellisistä duplikaatioista, jolloin yhdestä kopiosta on DNA:n replikaation jälkeen tullut kaksi kopiota. Jos virhe toistuu taas seuraavassa replikaatiossa, tuloksena on kolme kopiota peräkkäin jne. (Campbell, Williamsson & Padula 1997.) Esimerkkinä on tripletti CGG, josta on muodostunut kolme identtistä peräkkäistä kopiota:

...TCGGA.... ...TCGGCGGCGGA....

VNTR-alleleita, jotka sisältävät erilaisen määrän toistojaksoja, on ihmispopulaatioissa hyvin monia. Jokaisella yksilöllä on aina kuitenkin vain kaksi alleelia, yksi kummaltakin vanhemmalta, ja yleensä ihmiset ovat alleelien suhteen heterosygotteja (Hartl ja Jones 2005, 733). Koska VNTR-toistot ovat osa kromosomeja, ne myös periytyvät seuraaville sukupolville, ja vuosisatojen kuluessa toistot voivat yhä vain lisääntyä. Näin jokainen yksilö on perinyt vanhemmiltaan vaihtelevan määrän peräkkäisiä toistojaksoja (variable number of tandem repeats), jotka sijaitsevat genomissa useissa eri lokuksissa. (Campbell ym. 1997.) Suuri vaihtelevuus yksilöiden toistojaksojen määrässä selittyy vastinkromosomien crossing-overilla (tekijäinvaihdunnalla), jossa meiosisissa vastinkromosomien kromatidit vaihtavat osia keskenään ja samalla toistojaksot voivat siirtyä kromatidista toiseen (Lewin 2000, 113.) Suuri toistojaksojen vaihtelevuus on perustana DNA:han perustuvassa yksilön tunnistuksessa, jota kutsutaan myös DNA-sormenjälkitunnistukseksi (DNA fingerprinting).

Mikrosatelliitteihin kuuluvat short tandem repeats (STR) -toistojaksot ovat hieman lyhempiä kuin VNTR-jaksot. STR:t koostuvat 2–9 emäsparia pitkistä toistoista, joita esiintyy sadoissa eri lokuksissa 7–40 kopiona (Klug ym. 2009, 657.) STR-jaksoja on löydetty kromosomien sentromeerien läheisyydestä (Short Tandem Repeats 2008). STR-toistojaksojen määrässä esiintyy runsaasti polymorfia yksilöiden välillä, joten niitä käytetään VNTR-jaksojen ohella hyväksi yksilön tunnistuksessa. Tämän lisäksi STR-jaksoja voidaan nykyisin hyödyntää muun

muassa analysoitaessa eläin- ja kasvipopulaatioiden diversiteettiä eli monimuotoisuutta (Klug ym. 2009, 765).

2.3.1 Lokus D1S80

D1S80 VNTR-alue sijaitsee ihmisen kromosomi yhden lyhyen käsivarren uloimmassa päässä (1p35–36). Se koostuu peräkkäin toistuvista 16 emäsparin DNA-jaksoista, jotka voivat toistua 15–41 kertaa (Räsänen 2004). Lokuksesta on löydetty kaikkiaan 29 erilaista alleelia. D1S80-lokuksen PCR-tuote, joka ei sisällä ylimääräisiä toistojaksoja, on pituudeltaan 142 emäsparia, ja jokainen toistojakso tuo sille lisää 16 emäsparia. (Campbell ym. 1997.) D1S80-lokusta käytetään hyväksi mm. DNA-näytteiden oikeustieteellisissä analyyseissä, fylogeneettisessä tutkimuksessa ja sukulaisuussuhteiden määrittämisessä (Roslan, Azizan & Saat 2009).

D1S80-lokus vaatii PCR:ssä Hot Start -menetelmän käytön, koska lokuksen alukkeilla on taipumus lämpötilaa nostettaessa pariutua templaatin asemasta toistensa kanssa ja monistuksen tuloksena on primerdimereitä. DNA-polymeraasi lisätään reaktioon vasta, kun lämpötila on 95°C. (Campbell ym. 1997). D1S80-lokuksen PCR:ssä käytettävät alukkeet ovat

5'-GAAACTGGCCTCCAAACACTGCCCCGCCG ja

5'-GTCTTGTTGGAGATGCACGTGCCCTTGC.

2.3.2 Lokus APOC2

APOC2-lokus sijaitsee ihmisen kromosomin 19 q-käsivarressa (19q13.2). Lokuksen geeni koodaa apolipoproteiini C2:ta. Tämä proteiini erittyy plasmaan, jossa se on osa very low density lipoproteiinia (VLDL). Proteiini aktivoi lipoproteiinilipaasi-entsyymejä, jotka hydrolysoivat triglyseridejä. Näistä muodostuu vapaita rasvahappoja, joita solut voivat käyttää hyväkseen. Mutaatio APOC2-geenissä aiheuttaa tyypin 1B hyperlipoproteinemiaa, joka voi ilmetä mm. korkeana triglyseridi-pitoisuutena, haimatulehduksena ja varhaisena ateroskleroosina. (Apolipoprotein C-II 2010.) APOC2-lokuksesta on löydetty 11 erilaista

alleelia, joissa toistuvan jakson pituus on kaksi nukleotidia. Suurimmassa alleelissa näitä toistoja on 30 kappaletta. (Campbell ym. 1997.) APOC2:n PCR:ssä käytettävät alukkeet ovat 5'-CATAGCGAGACTCCATCTCC ja 5'-GGGAGAGGGCAAAGATCGAT.

3 TOISTUVA DNA RIKOSTUTKINNASSA

DNA-tunnistus on kohtalaisen uusi tekninen rikostutkimusmenetelmä, joka on kehitetty 1980-luvun puolivälissä Englannissa. Suomessa menetelmä on otettu käyttöön vuonna 1991. (DNA-tunnistufaktaa 2001.) Rikostutkinnan yhteydessä tehtävästä DNA-tutkimuksesta käytetään nimitystä DNA-identifikaatiotutkimus tai Amp-FLP -analyysi (Amplified Fragment Length Polymorphism). Tutkimuksessa verrataan rikosnäytteistä löytynyttä DNA:ta asianosaisten vertailunäytteisiin. (Karjalainen ja Johnsson 2001.) Tunnistus perustuu DNA:ssa oleviin toistoalueisiin, joissa esiintyy runsaasti periytyvää muuntelua (VNTR- ja STR-alueet), ja nämä alueet ovat aina samoja riippumatta mistä kudoksesta näyte on otettu. DNA-tunnistukseen riittää hyvin pieni määrä näytettä, esimerkiksi sylkeä, siemennestettä, ihosoluja tai hiuksen juuri. Erilaisten toistoalueiden yhdistelmä on niin sanottu DNA-tunniste eli DNA-sormenjälki. DNA-sormenjälkitutkimusta käytetään rikostutkimuksen lisäksi muun muassa sukulaisuussuhteiden tutkimuksessa ja eläinten (lähinnä koirien) puhdasrotuisuuden tarkastamisessa. (Räsänen 2004.)

Rikostutkinnassa käytettävän DNA-alueen täytyy täyttää tietyt perusvaatimuksia: alue ei saa olla geeni tai osa sitä, alue on muunteleva, alueen emäsjärjestys tunnetaan, eri tyyppien esiintymistodennäköisyydet tunnetaan, alue ei ole mutaatioherkkä ja eri alueiden välillä ei ole kytkentää (Karjalainen & Johnsson 2001). Toistojaksoja määritettäessä on tutkittava useiden lokusten DNA:t, jotta saataisiin luotettava DNA-tunniste. Jos tutkitaan vain yhden lokuksen DNA, on olemassa pieni todennäköisyys, että kahdella ihmisellä on näissä samat toistojaksot. Suomessa tunnistukseen käytetään 11 erilaista toistojaksoaluetta, jotka monistetaan PCR:llä. Monistustuotteet erotellaan elektroforeesilla ja lopputuotteet analysoidaan tietokoneella. (Hius numerosarjaksi 2001.)

Rikostapauksessa tehtävä DNA-tutkimus alkaa tutkimusnäytteiden taltioinnilla. Tutkimukseen soveltuvaa materiaalia etsitään silmämääräisesti ja mahdollisesti mikroskoopilla. Taltioinnissa voidaan esimerkiksi leikata talteen veritahra vaatteesta tai uuttaa vedellä materiaalia veitsen terästä. (Rikosteknisen laboratorion DNA-tutkimukset 2006.)

DNA-tutkimukseen tulevat näytteet sisältävät pääasiassa veri- tai siemennestetahtoja. Näytteistä eristetään tutkimuskelpoista DNA:ta yleensä Chelex-pikaeristysmenetelmällä. (Karjalainen ja Johnsson 2001.) Chelex on kelatoiva resiini, jota käytetään DNA:n eristämiseen näytteistä PCR:ää varten. Chelex-menetelmä on yksinkertainen ja nopea, eikä sen käyttö vaadi orgaanisia liuottimia. (Walsh, Metzger & Higuchi 1991.) Näytteestä eristetyn DNA:n pitoisuus määritetään (kvantitoidaan), minkä perusteella määritetään PCR-reaktioon tarvittava näytemäärä (Rikosteknisen laboratorion DNA-tutkimukset 2006).

DNA-tutkimuksen vertailunäyte otetaan esimerkiksi epäillyltä ja asianomistajalta. Poliisi ottaa vertailunäytteen suun limakalvolta imeyttämällä sylkeä ja soluja pehmeäpäiseen tikkuun. Näyte siirretään erikoisvalmisteiselle FTA-kortille, joka lähetetään tutkittavaksi rikostekniseen laboratorioon. (Rikosteknisen laboratorion DNA-tutkimukset 2006.) FTA-kortin avulla voidaan kerätä, säilyttää ja puhdistaa nukleiinihappoja. Kortit sisältävät kemikaaleja, jotka hajottavat solukalvoja, denaturoivat proteiineja ja suojaavat nukleiinihappoja nukleaaseilta, hapettumiselta ja UV-valolta. Vapautuneet nukleiinihapot kiinnittyvät tiukasti FTA-materiaaliin, ja näytteessä olevat muut ainekset voidaan pestä pois. Pesu tehdään kortille tarkoitetulla FTA Purification Reagentilla. Näytteet säilyvät kortilla huoneenlämmössä jopa yli 17 vuotta. (Whatman 2010.) Analysointia varten FTA-kortilta leikataan kuoppalevylle pieni, 1,2 mm kokoinen kiekko, jota käytetään templaattina PCR-monistuksessa (Rikosteknisen laboratorion DNA-tutkimukset 2006).

Sekä rikosnäytteistä että vertailunäytteistä monistetaan tiettyjä alueita multiplex-PCR -menetelmällä, jossa yhdessä monistusreaktiossa voidaan monistaa samanaikaisesti useampia alueita (Karjalainen ja Johnsson, 2001.) Multiplex-PCR sisältää useampia alukepareja samassa reaktiossa. Alukkeisiin on kiinnitetty erivärisiä fluoresoivia leimoja (sininen, vihreä ja keltainen). PCR-reaktion jälkeen monistuneet DNA-alueet erotetaan kapillaarielektroforeesin avulla kokonsa ja leimansa perusteella. (Rikosteknisen laboratorion DNA-tutkimukset 2006.) Kapillaarigeelielektroforeesissa näytteet asetetaan ohueen kapillaariputkeen, joka sisältää geelimäistä ainetta. Sähkövirta kytketään kulkemaan kapillaarin läpi, jolloin DNA-näytteet lähtevät kulkemaan putken toista päätä kohti. Pienet

DNA-fragmentit liikkuvat geelissä nopeammin kuin suuret. Putken päässä lasersäde detektoi ohi kulkevat fluoresoivat DNA-fragmentit. (Klug ym. 2009, 657.) Lisäksi näytteisiin lisätään sisäinen kokostandardi (leimattu punaisella), jonka perusteella tietokone laskee näytteiden fragmenttien pituudet. DNA-toistojaksojen määrä voidaan laskea ajossa mukana olevien alleelistandardien avulla. (Rikosteknisen laboratorion DNA-tutkimukset 2006.)

Oikeustieteellisessä tutkinnassa STR-toistojen analysointi on osittain korvannut VNTR-jaksojen käytön. STR:n etuna on sen pienempi koko, joten sen avulla on helpompi tehdä PCR-monistus hyvin pienestä määrästä näytettä, kuten vanhasta ja jo hajonneesta DNA:sta (Short Tandem Repeats 2008). Lisäksi STR-analysointi on halvempaa ja nopeampaa kuin VNTR:n (Klug ym. 2009, 657). Tutkimuksissa käytetään yleensä 13 tiettyä STR-lokusta, joita pidetään kansainvälisesti identifikaatiotutkimuksen standardina. Esimerkiksi FBI on kerännyt CODIS (Combined DNA Index System) -tietokantaansa näitä lokuksia koskevat DNA-profiilit. (Short Tandem Repeats 2008.)

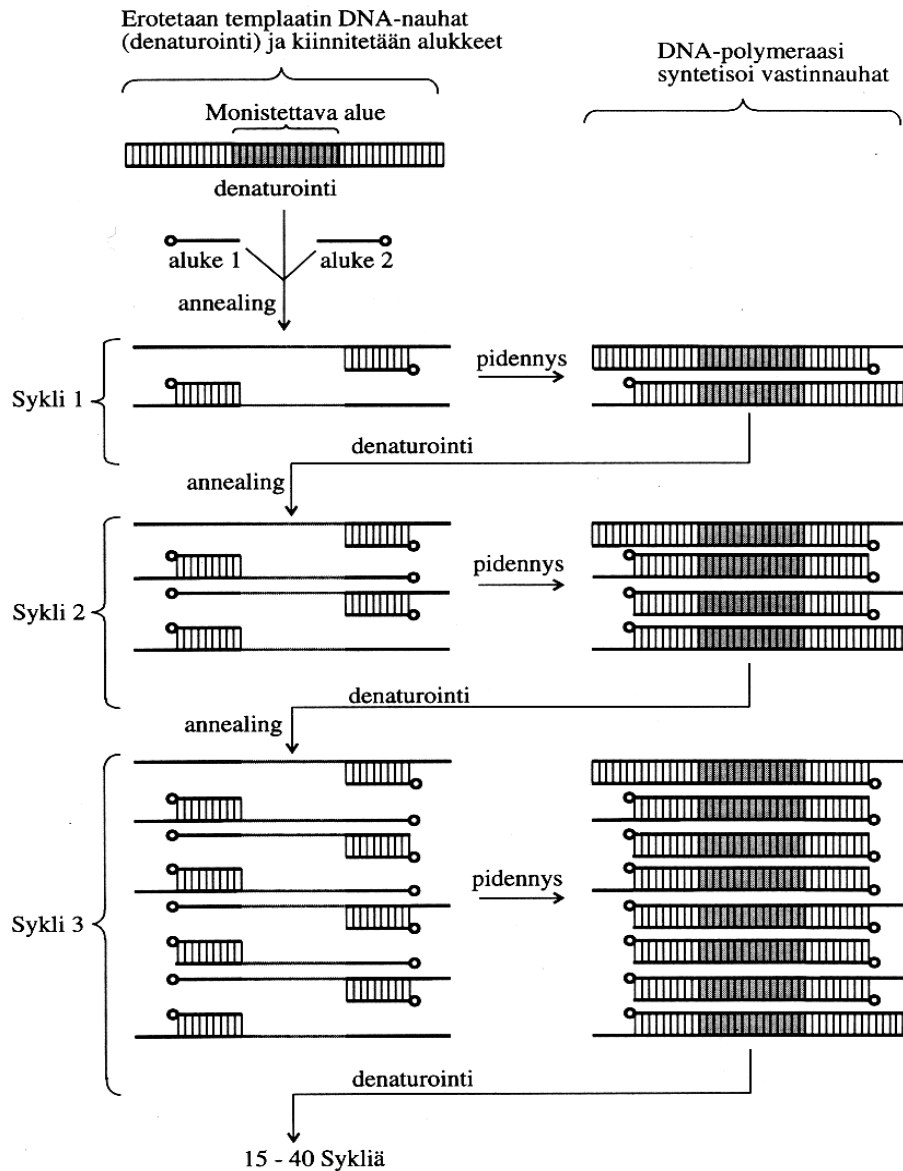
DNA-yhdistelmien esiintymistodennäköisyydet voidaan laskea, kun tunnetaan kunkin yksittäisen DNA-tyyppin esiintymistodennäköisyys (Karjalainen ja Johnson 2001). DNA-tunnistuksella saatua näyttöä voidaan pitää hyvin varmana; saman DNA-tunnisteen todennäköisyys kahdella ihmisellä on vain yhden suhde kymmeneen miljardiin tai sataan miljardiin (DNA-tunnistusfaktaa 2001). Rikosteknisissä DNA-lausunnoissa ilmoitetaan laskennallinen todennäköisyys sille, että kahdella sattumanvaraisesti valitulla henkilöllä olisi samanlainen DNA-tunniste (Rikosteknisen laboratorion DNA-tutkimukset, 2006). Jos DNA-analyysi ei täydellä varmuudella osoitakaan, että samanlaiset DNA-tunnisteet olisivat peräisin samasta henkilöstä, niin erilaiset DNA-tunnisteet osoittavat varmasti, että näytteet ovat peräisin eri henkilöiltä. Näin voidaan kyseiseltä osin sulkea pois tutkinnasta rikoksesta epäiltyjä henkilöitä. (Klug ym. 2009, 658–659.)

4 TYÖSSÄ KÄYTETTYJEN MENETELMIEN PERIAATTEET

4.1 Polymeraasiketjureaktio (PCR)

Polymeraasiketjureaktiolla (polymerase chain reaction, PCR) monistetaan DNA-jaksoja, jotka sijaitsevat kahden tunnetun DNA-jakson välissä (Suominen ja Ollikka 2004, 107). PCR:n kehittäjä Kary Mullis, mistä hän sai Nobelin kemian palkinnon vuonna 1993. PCR-reaktion aluksi DNA-juosteet erotetaan toisistaan eli denaturoidaan kuumakäsittelyllä noin 95:ssä (kuvio 2, sivu 15). Tämän jälkeen lämpötila lasketaan noin 50–60°C:een, jolloin alukkeet (primerit) kiinnittyvät komplementaarisesti templaattina toimivaan DNA-juosteeseen (annealing-vaihe). Annealing lämpötilaan vaikuttaa alukkeiden G- ja C-emästen määrät. Kun lämpötilaa taas nostetaan noin 70°C:een, alkaa DNA-polymeraasi syntetisoida reaktioseoksessa olevista nukleotideista (dNTP) uutta DNA-juostetta alukseen 3'-päästä alkaen (pidennysreaktio). Komplementaarinen uusi DNA-juoste syntyy 5'-3'-suunnassa kummallekin templaatin nauhalle, ja samalla haluttu DNA:n määrä kaksinkertaistuu. (Campbell & Farrell 2006, 352–354 ja Hartl & Jones 2005, 66.) Denaturointi-annealing-pidennys -syklejä toistetaan noin 15–40 kertaa ja siten saadaan pienestä määrästä templaatti-DNA:ta monistettua suuri määrä tarkalleen määritetyn pituisia DNA-jaksoja (Suominen & Ollikka 2004, 108).

Oikein suunnitellut alukkeet ovat olennainen osa PCR:n onnistumisessa. Alukkeet sisältävät noin 18–30 nukleotidia, joiden tulee olla mahdollisimman komplementaarisia templaatin kanssa. (Campbell ja Farrell 2006, 354.) DNA:n denaturointivaihe vaatii kuumakäsittelyn, joten PCR:ssä käytetään termostabiileja DNA-polymeraaseja, jotka eivät inaktivoidu kuumissa olosuhteissa. Eniten käytetty on *Taq*-polymeraasi, joka on alun perin eristetty kuumista lähteissä elävistä *Thermus aquaticus* -bakteereista. (Hartl & Jones 2005, 66.)



KUVIO 2. Polymeraasiketjureaktion periaate (Suominen & Ollikka 2004, 109).

Polymeraasiketjureaktio on hyvin herkkä kontaminaatioille, joita tavallisimmin aiheuttavat vieraasta lähteistä peräisin oleva DNA. Kontaminoituneesta näyttestä voi monistua vierasta DNA:ta halutun sijaan, ja tällöin tuloksena on virheellinen lopputuote ja väärä positiivinen tulos. PCR-työskentely olisikin tehtävä aseptisesti laminaarivirtauskaapissa, ja työssä on käytettävä puhtaita reagensseja ja pipettejä. Kaikki putket on sentrifugoitava lyhyesti ennen avaamista ja pipetointia, jotta vältettäisiin aerosolien leviäminen putkista. (Suominen ja Ollikka 2004, 111–112.)

Usein PCR:ssä tarvitaan kokeellista optimointia, jotta saanto olisi parempi. Periaatteessa kaikkia reaktioon osallistuvia tekijöitä voidaan optimoida. DNA-

polymeraasi tarvitsee toimiakseen Mg^{2+} -ioneja, joiden optimaalinen pitoisuus riippuu monistettavan DNA:n pitoisuudesta ja entsyymistä. Ylimäärä magnesiumia heikentää DNA:n denaturaatiota ja sitoo alukkeita epäspesifisiin kohtiin. (Partanen 2008.) Liian pieni Mg^{2+} -pitoisuus taas vähentää Mg-dNTP -kompleksien määrää, jotka toimivat substraattina polymeraasille, ja samalla saanto vähenee (PCR 2006). Optimaalinen Mg^{2+} -pitoisuus riippuu myös dNTP-pitoisuudesta, ja yleissääntönä voidaan pitää, että sopiva magnesium-pitoisuus on 0,5–1 mM suurempi kuin kokonais-dNTP-pitoisuus (Guidelines for PCR Optimization 2010).

Alukkeiden tulisi olla komplementaarisia templaatin kanssa; ne eivät saisi pariu-
tua itsensä tai toisten alukkeiden kanssa. Sopiva alukepitoisuus on noin 0.1–1,0 μ M. Liian korkeat määrät voivat aiheuttaa epäspesifisten tuotteiden monistumista, ja liian matalat pitoisuudet voivat jättää tuotteiden saannon matalaksi. (PCR 2006.) Tarvittaessa joudutaan optimoimaan myös alukkeiden kiinnittymislämpötilaa. Alukkeiden kiinnittymislämpötila on suunnilleen $T_m - 5^\circ C$ (T_m = sulamislämpötila = puolet alukkeesta on kiinnittynyt templaattiin) (Roux 1995). Jos lämpötila on liian korkea, se estää alukkeiden sitoutumista templaattiin. Liian matalassa lämpötilassa puolestaan alukkeet voivat sitoutua epäspesifisti ja voi syntyä vääränlaisia tuotteita. Alukkeiden T_m -arvot eivät saisi poiketa yli $2^\circ C$ toisistaan. (PCR 2006.)

DNA-polymeraasin valintaan vaikuttavat mm. templaatin lähtömateriaali, pituus, GC-pitoisuus ja se, mitä tuotteelle on tarkoitus tehdä jälkeinpäin (Partanen 2008). Yleensä polymeraasi-entsyymien määrä vaihtelee 0,5:stä 2,5 U:iin, ja liian korkeat pitoisuudet lisäävät epäspesifisten tuotteiden syntymistä. Entsyymien aktiivisuuteen ja reaktion tarkkuuteen voidaan tarvittaessa vaikuttaa pH:n säätämällä. Reaktion tarkkuus on parhaimmillaan pH:ssa 8,3, mutta entsyymiaktiivisuus on parhaimmillaan pH:ssa 9,0. Täten yleensä pH säädetään noin 8,8:aan. (PCR 2006.)

Syklien määrää säätämällä voidaan vaikuttaa monistumistuotteiden määrään. Liian suuri syklien määrä aiheuttaa epäspesifisten tuotteiden syntymistä ja ylimääräisten tuotteiden näkymistä geelillä. Liian pienellä syklimäärällä monistu-

minen voi jäädä vähäiseksi, eikä monistustuotteita saada näkyville geelillä. (PCR 2006.)

Templaatin olisi oltava puhdasta ja sitä olisi oltava riittävästi hyvän PCR-tuoton saamiseksi. Sopiva templaatin pituus on noin 100–400 emäsparia, vaikka suurempiakin pituuksia on mahdollista monistaa. Alhaisella templaatin määrällä monistuminen voi jäädä vähäiseksi, ja tällöin joudutaan optimoimaan muita reaktion osa-alueita. (PCR 2006). Toisaalta liian pitkä templaatti nostaa virheiden todennäköisyyttä ja laskee monistustuotteiden määrää. Hankalia voivat olla myös runsaasti GC-alueita omaavat templaattit, joiden denaturointi on vaikeampaa, ja ne voivat vaatia lisäaineita reaktion onnistumiseksi. (Partanen 2008.)

dNTP-pitoisuudeksi suositellaan 50-500 μM , ja kaikkia nukleotideja tulisi olla samat määrät. Liian suuret dNTP-pitoisuudet voivat kelatoida magnesiumia ja lisätä DNA-polymeraasin tekemiä virheitä. (PCR 2006.)

Joskus PCR-reaktion ongelmana voi olla alukkeiden sitoutuminen toisiinsa tai epäspesifisesti kohde-DNA:han. Tällöin monistumisen tuloksena syntyy ei-toivottuja tuotteita (primer-dimereitä ja mis-priming –tuotteita) ja vastaavasti haluttujen tuotteiden monistuminen heikentyy. (Lebedev, Paul, Yee, Timoschuk, Shum, Miyagi, Kellum, Hogrefe & Zon 2008.) Hot Start -menetelmässä DNA-polymeraasi lisätään reaktioon vasta alkudenaturaation jälkeen, mikä minimoi primerdimereiden ja epäspesifisten tuotteiden syntymistä. Hot Start -menetelmä varmistaa templaatin denaturaation sekä kasvattaa PCR-reaktion spesifisyyttä, herkkyttä ja saantoa. Hot Start -menetelmää voidaan tarvittaessa soveltaa myös muille reaktion tekijöille kuin entsyymille. (PCR 2006.)

Tarvittaessa PCR-reaktiossa voidaan käyttää erilaisia lisäaineita tuloksen parantamiseksi. Käytettyjä aineita ovat mm. DMSO, formamidi, glyseroli ja betaiini. DMSO:ta (dimetyylisulfoksidi) käytetään parantamaan alukkeiden spesifistä pariutumista templaattiin. DMSO helpottaa DNA-juosteiden denaturoitumista etenkin alueilla, joilla on runsaasti G-C -sidoksia. DMSO häiritsee emäspariutumista, joten se estää DNA:n pariutumista itsensä kanssa ja parantaa PCR:n tehokkuutta (Qbiogene 2010). DMSO voi laskea alukkeiden sulamislämpötilaa, ja

siksi DMSO:n käytön yhteydessä voi olla tarpeen alentaa annealing-lämpötilaa (Guidelines for PCR Optimization 2010).

4.2 Agarosigeelielektroforeesi

Elektroforeesi on menetelmä, jolla voidaan erotella molekyylejä sähkökentän avulla. Elektroforeesissa sähköisesti varautuneet partikkelit liikkuvat sähkökentässä kohti vastakkaisesti varautunutta elektrodia. (Campbell ja Farrell 2006, 67,121.) Elektroforeesia käytetään sähköisesti varautuneiden molekyylien, kuten aminohappojen, proteiinien ja nukleiinihappojen erotteluun toisistaan. Elektroforeesin tukiaineena käytetään useita materiaaleja, kuten agarosia, tärkkelys- ja polyakryyliamidigeelejä, asetaattiliuskoja ja suodatinpaperia. Geeli voidaan valaa levymäiseksi, lasi- tai muoviputkeen tai kapillaariin, ja se voi olla tasa-aineinen tai gradienttigeeli, jossa gradientti saadaan aikaan esimerkiksi pH-eroilla tai akryyliamidin pitoisuudella. Elektroforeesi suoritetaan puskuriliuoksessa, jossa sähkövirta kulkee. (Solunetti 2010.)

Nukleiinihappojen elektroforeesi tehdään yleensä polyakryyliamidi- tai agarosigeelissä. Pieniä DNA-jaksoja (muutamasta kymmenestä muutamaaan sataan nukleotidia) analysoitaessa käytetään polyakryyliamidigeelielektroforeesia (PAGE) (Suominen ja Ollikka 2004, 72). Polyakryyliamidigeeliä käytetään myös proteiinien erotteluun. Tällöin proteiinit käsitellään ennen geelijaioa detergentillä (sodium dodecyl sulfate, SDS), ja menetelmää kutsutaan SDS-PAGE:ksi. (Campbell ja Farrell 2006, 121.) Keskikokoisia DNA-jaksoja (muutamasta sadasta muutamaaan kymmeneen tuhanteen nukleotidiparia) analysoidaan agarosigeelielektroforeesilla (AGE) (Suominen ja Ollikka 2004, 72).

Agarosi on merilevästä peräisin oleva polysakkaridi, joka liukenee kuumaan veteen ja geeliiytyy jähmettyessään. Nukleiinihappojen liikkuminen agarosigeelissä perustuu niiden negatiiviseen varaukseen, joka on peräisin happamista fosfaattiryhmistä (Suominen ja Ollikka 2004, 72). Nukleiinihapot liikkuvat kohti positiivista päätä (anodia), ja liikkumisnopeus riippuu molekyylien koosta: lyhyet molekyylit liikkuvat nopeammin ja päätyvät pidemmälle geelissä kuin pitkät molekyylit. Näytteet pipetoidaan geelin kaivoihin näytepuskurissa, joka sisältää

glyserolia ja väriainetta. Glyseroli on ajopuskuria raskaampaa ja saa aikaan näytteiden laskeutumisen kaivojen pohjalle. Väriaineen avulla voidaan seurata ajon etenemistä. Lisäksi geelille pipetoidaan kokostandardi, jonka avulla näytteiden koot voidaan määrittää. (Mathews, van Holde & Ahern 2000, 54.)

Nukleiinihapot eivät sellaisenaan ole havaittavissa geelillä, vaan ne tarvitsevat erillisen menetelmän visualisointia varten. Tavallisimmin käytetään etidiumbromidivärjäystä. Etidiumbromidi (EtBr) tunkeutuu nukleiinihappojen emästen väliin. Kun DNA-etidiumkompleksia säteilytetään UV-valolla, emäkset absorboivat UV-säteitä ja luovuttavat energiansa etidiumbromidille, jolloin tämä fluoresoi oranssinpunaisena. Etidiumbromidi voidaan lisätä geelille jo valamisvaiheessa tai geeli voidaan lopuksi värjätä etidiumbromidiliuoksessa. Etidiumbromidia käsiteltäessä on tärkeää muistaa, että se on karsinogeeni. (Suominen ja Ollikka 2004, 72.)

5 TYÖN SUORITUS

Työssä eristettiin hiuksen DNA:ta ja monistettiin PCR:llä erikseen omilla alukkeillaan sekä APOC2-lokuksen että D1S80-lokuksen toistojaksoja. PCR-tuotteet tunnistettiin agarooosigeelielektroforeesilla.

5.1 DNA:n eristämislouksen (DNA Extraction Buffer) valmistaminen ja hiuksen DNA:n eristäminen

Hiuksen DNA:n eristämistä varten valmistettiin liuos ohjeen mukaisesti (Hair DNA Extraction Buffer, Liite 1). Aineet liuotettiin osaan vettä (Millipore). Liuosta lämmitettiin magneettisekoittajalla, jotta kiinteät aineet saatiin liukenemaan. Liuoksen pH oli tässä vaiheessa 9,5 ja se säädettiin HCl:lla 8,3:een. pH:n mittaukseen käytettiin SCHOTT CG842 pH-mittaria. Liuos siirrettiin mittapulloon, ja tilavuus tasattiin vedellä 500 ml:ksi. Liuos kaadettiin kahteen autoklavointipulloon, ja liuokset steriloidtiin autoklavaimella 121 °C:ssa 20 minuuttia.

Hiuksista leikattiin kaksi hiustuppinäytettä, joissa oli mukana noin 5 mm hiusta (yksikin hius riittää, jos hiustuppi on riittävän suuri). Näytteet siirrettiin eppendorf-putkeen. Putkeen lisättiin DNA:n eristämislousta, joka sisälsi 6 % Proteinase K:ta (Fermentas #E00491). Proteinase K auttaa solujen hajoamista ja DNA:n vapautumista. Tarvittava määrä Proteinase K:ta suoraan lähtöliuoksesta oli liian pieni pipetoitavaksi, joten tehtiin laimennos 1:10, minkä jälkeen pipetointi oli mahdollista. Putki sentrifugoitiin lyhyesti ja inkuboitiin 1 tunti 55°C:ssa ja 10 minuuttia 95°C:ssa. Työssä riitti, että DNA saatiin ulos soluista, eikä sitä tarvinnut enää erotella muusta liuoksesta.

5.2 PCR APOC2-lokuksesta

Polymeraasiketjureaktiota varten laskettiin tarvittavien reagenssien määrät, ja pipetointi suoritettiin taulukon 1 mukaisesti. Magnesiumia ei lisätty reaktioon, koska templaatti sisälsi jo sitä (DNA:n eristysliuoksesta peräisin). Puskuriliuos oli 10xPCR buffer, without Mg (Finnzymes). Reaktion dNTP-konsentraatio oli 200 μM (20xdNTP, Promega). Alukkeita oli 100 ng molempia (Sigma, HA00832065 ja HA00832066) ja DNA-polymeraasia 1 U (Taq DNA-polymerase, DYNAzyme). Alukkeet oli laimennettava ennen pipetointia, koska määrä olisi muuten ollut liian pieni pipetoitavaksi. Pipetointi tehtiin aseptisesti laminaarivirtauskaapissa varoen kontaminaatioita. Putket säilytettiin koko ajan jäähäuteella. Negatiivinen kontrolli valmistettiin käyttäen DNA-templaatin asemasta vettä.

TAULUKKO 1. Pipetointikaavio APOC2-lokuksen PCR:lle.

Reagenssi	Määrä
H ₂ O	12,0 μl
10xPCR puskuri (Ilman Mg)	2,5 μl
20xdNTPs	0,5 μl
Aluke 1	1,0 μl
Aluke 2	1,0 μl
DNA polymeraasi	0,5 μl
Templaatti	7,5 μl
Kokonaismäärä	25,0 μl

Putket siirrettiin PCR-laitteeseen (Biometra® T personal), ja PCR-ohjelma ajettiin taulukon 2 mukaisesti.

TAULUKKO 2. PCR-ohjelma APOC2-lokukselle. Kohdat 2-4 toistettiin 29 kertaa.

1. 95°C	5 min.
2. 95°C	1 min.
3. 55°C	1 min.
4. 72°C	1 min.
5. 72°C	5 min.
6. 4°C	

PCR:n jälkeen putket säilytettiin pakastimessa (-20°C).

5.3 PCR D1S80-lokuksesta

Aluksi laskettiin tarvittavien PCR-reagenssien määrät, ja pipetointi suoritettiin taulukon 3 mukaisesti. Reaktiossa dNTP-konsentraatio oli 200 μM (20xdNTP, Promega). Alukkeita oli 100 ng molempia (Sigma, HA00832067 ja HA00832068), DNA-polymeraasia 1 U (Taq DNA-polymerase DYNAzyme) ja DMSO:a 5 %. Alukkeet laimennettiin kuten APOC2-lokuksen kohdalla. Myös tässä reaktiossa käytettiin magnesiumitonta puskuria (10xPCR buffer, without Mg, Finnzymes), koska magnesium saatiin templaatin mukana. Kaikki putket sentrifugoitiin lyhyesti ennen pipetointia, ja pipetointi suoritettiin aseptisesti laminaarivirtauskaapissa.

TAULUKKO 3. Pipetointikaavio D1S80-lokuksen PCR:lle.

H ₂ O	8,25 μl
10x PCR puskuri (ilman Mg)	2,5 μl
DMSO	1,25 μl
20xdNTPs	0,5 μl
Aluke 1	1,0 μl
Aluke 2	1,0 μl
Templaatti	10,0 μl
DNA-polymeraasi	0,5 μl
Kokonaismäärä	25,0 μl

Putket siirrettiin PCR-laitteeseen (Biometra® T personal), ja PCR-ohjelma ajettiin taulukon 4 mukaisesti. Koska D1S80-locus vaatii hotstart-PCR:n, vaiheen 1. jälkeen ohjelma pysäytettiin ja DNA-polymeraasi lisättiin kuumaan (95°C) liuokseen. Tämän jälkeen ohjelma ajettiin normaalisti loppuun.

TAULUKKO 4. PCR-ohjelma D1S80-lokukselle. Kohdat 2-4 toistettiin 29 kertaa.

1. 95°C	5 min.
2. 95°C	1 min.
3. 65°C	1 min.
4. 72°C	1 min.
5. 72°C	5 min.
6. 4°C	

5.4 Agaroosigeelielektroforeesi PCR-tuotteista

Molempien lokusten näytteille valmistettiin omat agaroosigeelit: APOC2- lokuksen näytteelle 3 %:nen ja D1S80-lokukseen 1,5 %:nen. APOC2:n näytteen geeli oli tiheämpi, koska tämän monistustuotteen oletettiin olevan pienempi kooltaan ja liikkuvan geelillä nopeammin kuin D1S80-lokukseen tuotteen. Geelit valmistettiin 1xTBE-puskuriin (Tris-Borate-EDTA). Agaroosi ja puskuri kuumennettiin mikroaaltouunissa kunnes agaroosi oli liuennut. Jäähdytettiin vedellä noin 60°C:ksi, jonka jälkeen lisättiin vetokaapissa etidiumbromidi (0,5 µg/ml). Geelit kaadettiin kelkkoihin jäähtymään.

PCR-tuotteista pipetoitiin 10 µl:n näytteet eppendorf-putkiin ja niihin lisättiin 1 µl 10x latauspuskuria. Kokostandardi (Gene Ruler™ Express DNA Ladder, Fermentas) ja 6x Loading Dye Solution (Fermentas) laimennettiin valmistajan ohjeen mukaisesti veteen. Näytteet ja standardi pipetoitiin geeleille, ja geelit ajettiin 80 V:n jännitteellä. Geelien ajoon käytettiin Hoefer HE 33 elektroforeesilaitetta, jonka virtalähde oli Amersham pharmacia biotech EPS 301. Lopuksi geelejä tarkasteltiin UV-valossa.

5.5 APOC2- lokuksen PCR:n magnesium-pitoisuuden optimointi

Koska APOC2- lokuksen tulokset olivat epäselviä (ks. kohta 6 Tulokset, sivu 26), tehtiin PCR-reaktioon magnesium-pitoisuuden optimointia. Alkuperäisessä reaktiossa MgCl₂-pitoisuus oli 0,75 mM. Uudet PCR-reaktiot tehtiin suuremmilla magnesium-pitoisuuksilla: 1,5 mM, 2,0 mM ja 2,5 mM MgCl₂ (taulukot 5, 6 ja 7, sivu 24). Magnesium saatiin 50 mM MgCl₂:ta (Finnzymes).

TAULUKKO 5. Pipetointikaavio APOC2-lokuksen PCR:lle, kun MgCl_2 -pitoisuus on 1,5 mM.

H ₂ O	11,6 µl
10x PCR puskuri (ilman Mg)	2,5 µl
50 mM MgCl_2	0,4 µl
20xdNTPs	0,5 µl
Aluke 1	1,0 µl
Aluke 2	1,0 µl
DNA-polymeraasi	0,5 µl
Templaatti	7,5 µl
Kokonaismäärä	25,0 µl

TAULUKKO 6. Pipetointikaavio APOC2-lokuksen PCR:lle, kun MgCl_2 -pitoisuus on 2,0 mM.

H ₂ O	11,4 µl
10x PCR puskuri (ilman Mg)	2,5 µl
50 mM MgCl_2	0,6 µl
20xdNTPs	0,5 µl
Aluke 1	1,0 µl
Aluke 2	1,0 µl
DNA-polymeraasi	0,5 µl
Templaatti	7,5 µl
Kokonaismäärä	25,0 µl

TAULUKKO 7. Pipetointikaavio APOC2-lokuksen PCR:lle, kun MgCl_2 -pitoisuus on 2,5 mM.

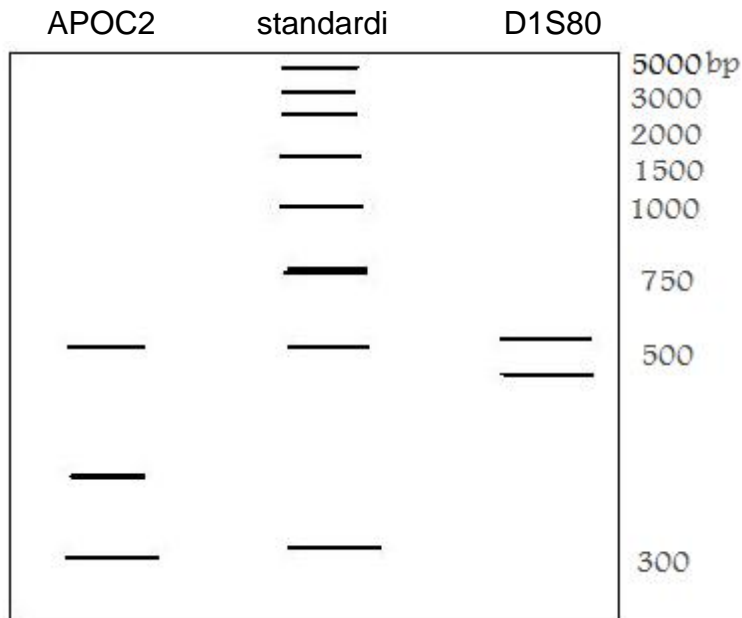
H ₂ O	11,1 µl
10x PCR puskuri (ilman Mg)	2,5 µl
50 mM MgCl_2	0,9 µl
20xdNTPs	0,5 µl
Aluke 1	1,0 µl
Aluke 2	1,0 µl
DNA-polymeraasi	0,5 µl
Templaatti	7,5 µl
Kokonaismäärä	25,0 µl

Putket sentrifugoitiin lyhyesti ennen pipetointia, joka suoritettiin mahdollisimman aseptisesti. Negatiivinen kontrolli tehtiin 1,5 mM MgCl₂-pitoisuudella käyttäen templaatin asemasta vettä. PCR-sykli ajettiin taulukon 2 (sivu 21) mukaisesti MiniCycler™ MJ Research PCR-laitteella.

PCR-tuotteet pipetoitiin 3 %:lle agarosigeelille, ja elektroforeesi suoritettiin kuten edellä käyttäen samaa latauspuskuria ja kokostandardia (ks. kohta 5.4, sivu 23).

6 TULOKSET

Ensimmäisen PCR:n jälkeen, jolloin magnesium-pitoisuus oli 0,75 mM, geeleillä oli nähtävissä kuvion 3 mukaiset bändit (kuviossa molemmat geelit yhdistetty).

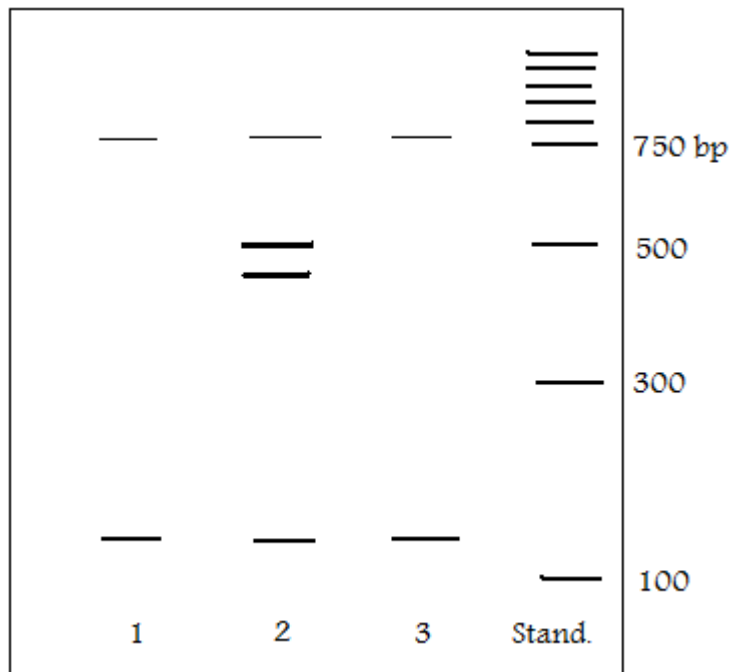


KUVIO 3. Lokusten APOC2 ja D1S80 bändit (Mg-pitoisuus 0,75 mM).

D1S80-lokuksen kohdalla näkyi kaksi selvää bändiä. Tämä osoittaa, että lokuksessa on kaksi erikokoista alleelia eli tutkittava yksilö on tämän lokuksen suhteen heterotsygootti.

APOC2:n kohdalla kaikki kolme erottuvaa bändiä olivat hyvin heikkoja. Suurin bändi kuvaa lokuksen alleelin DNA:ta. Kaksi pienempää bändiä ovat todennäköisesti hajonnutta DNA:ta. APOC2:n osalta henkilö on tällä perusteella homotsygootti.

Kun APOC2:n PCR reaktion magnesium-pitoisuutta lisättiin, saatiin geelillä kuvion 4 (sivu 27) mukaiset bändit.



KUVIO 4. Lokuksen APOC2 bändit. 1: Mg²⁺-pitoisuus 1,5 mM,
2: Mg²⁺-pitoisuus 2,0 mM, 3: Mg²⁺-pitoisuus 2,5 mM

Mg²⁺-pitoisuudella 2,0 mM tulokset onnistuvat parhaiten. Geelillä oli nähtävissä kaksi selkeää bändiä noin 500 ja 450 emäsparin (bp) kohdalla, mikä osoittaa tutkittavan henkilön olevan heterotsygootti alleelien suhteen.

7. TULOSTEN POHDINTA JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Vaikka lokuksen D1S80 PCR on periaatteessa vaikeampi suorittaa sen vaaties-
sa Hot Start -menetelmän, ovat siitä saatavat tulokset selkeämpiä kuin
APOC2:n tulokset. Tältä osin saadut tulokset vastasivat testattavassa työoh-
jeessa mainittuja tuloksia. Näin ollen D1S80:sta tehtävä PCR soveltuu parem-
min opiskelijoiden harjoitustöihin. D1S80:stä on helpommin kontrolloitavissa
PCR:n onnistuminen, eikä epäselviä bändejä ole geelillä nähtävissä kuten
APOC2:n kohdalla.

D1S80-lokuksen PCR-ajosta unohtui negatiivinen kontrolli, mutta muissa näyt-
teissä kontrolli oli mukana. Negatiivisten kontrollien kohdalle ei ilmestynyt bän-
dejä, joten PCR-reaktioon ei ollut tullut kontaminaatioita ulkopuolisesta
DNA:sta. Myös DNA-polymeraasin lisäys Hot Start -menetelmällä onnistui hyvin
eikä D1S80:ssä näkynyt häiritseviä primerdimereitä.

Tutkittu henkilö oli D1S80-lokuksen alleelien suhteen heterotsygootti, mikä on-
kin todennäköisin tulos, koska suurin osa ihmisistä on perinyt vanhemmiltaan
erilaiset alleelit. Alleelit olivat kooltaan noin 450 ja 550 emäsparia. D1S80-
lokuksen PCR-tuote ilman toistoja on 142 emäsparia pitkä, ja jokainen toisto tuo
siihen 16 emäsparia lisää. Näytteen alleellien toistojaksojen kopiomäärät olivat
siten toisessa noin 19 ja toisessa noin 25. Agarosigeelielektroforeesin tarkkuus
ei kuitenkaan riitä tarkan toistolukumäärän laskemiseen. Tulokset vastaavat
kuitenkin yleisiä VNTR-toistojen kopiomääriä (2–100 kopiota tavallisimmin).

APOC2-lokuksen tulosten tulkinta oli ongelmallisempaa. Vaikka PCR:n suoritus
olikin helpompaa ilman Hot Startin vaatimaa reaktion pysäyttämistä välillä, jäivät
tulokset ensimmäisen ajon jälkeen hyvin epäselviksi. Bändit olivat heikkoja ja
vaikeasti tulkittavissa. Noin 500 emäsparin kohdalla oli näkyvissä bändi, jonka
on luultavasti näytteen lokuksen alleelin DNA:ta. Bändejä oli vain yksi, mikä
osoittaa alleelin olevan homotsygootti. Tämä on kuitenkin hyvin epätodennä-
köistä, ja viittaa osaltaan siihen, että PCR ei ollut kunnolla onnistunut.

Ensimmäisellä APOC2-geelillä erottui lisäksi kaksi muuta pienempää bändiä, jotka olivat noin 300 ja 350 emäsparia kooltaan. Nämä olivat todennäköisesti hajonnutta DNA:ta, joka pienikokoisena liikkuu kauemmas geelillä. Tai ehkä juuri nämä kaksi pienempää bändiä olivat toivotut, oikein monistuneet lokuksen alleelien DNA:t. Tätä tulosta vastaan kuitenkin olivat magnesium-pitoisuuden optimoinnin jälkeen saadut tulokset. Kun magnesiumia lisättiin PCR-reaktioon, saatiin Mg^{2+} -pitoisuudella 2,0 mM kaksi edellistä paremmin näkyvää, kohtalaisen lähellä toisiaan olevaa bändiä. Näiden bändien koot olivat noin 450 ja 500 emäsparia ja ne ovat todennäköisesti peräisin näytteen monistuneista APOC2- lokuksen alleeleista. Tällöin tutkittava henkilö on alleelien suhteen heterotsygootti, mikä on todennäköisin tulos. Kyseisen Mg^{2+} -pitoisuuden kohdalla näkyi lisäksi pari heikkoa bändiä, jotka olivat luultavimmin peräisin hajonneesta DNA:sta. Samat kaksi heikkoa bändiä näkyivät myös magnesiumin pitoisuuksilla 1,5 mM ja 2,5 mM, mutta näillä pitoisuuksilla ei saatu tulokseksi muita bändejä. Tehdyn PCR:n optimoinnin perusteella voidaan sanoa, että Mg-pitoisuus, joka on noin 2 mM, on paras DNA-polymeraasin ja reaktion toiminnan kannalta. Pienemmällä pitoisuudella (1,5 mM) uutta vastinjuostetta syntyy heikosti ja lopputuotetta saadaan vähän. Liian korkea pitoisuus (2,5 mM) taas voi stabiloida kaksijuosteista DNA:ta ja estää alukkeiden kiinnittymisen.

Tulosten luotettavuuden parantamiseksi työssä olisi ollut tarpeen tehdä myös rinnakkaisnäytteitä. Vain yhden määrittelyn perusteella saadut tulokset voivat olla osin sattumaa, eikä tuloksia täten voida pitää kovin luotettavina.

D1S80- lokuksen osalta työ soveltuu näillä ohjeilla suoritettavaksi opiskelijoiden harjoitustöissä. Tosin voitaisiin vielä kokeilla, onnistuuko PCR-reaktio ilman Hot Start -menetelmää. Jos DNA-polymeraasin voisi pipetoida reaktioon jo ennen alkudenaturaatiota, työn suoritus helpottuisi.

APOC2- lokuksen tuloksia kannattaisi pyrkiä vielä parantamaan, jotta niistä saataisiin helpommin tulkittavia. Magnesiumin kokeellisen optimoinnin lisäksi olisi hyvä optimoida vielä APOC2:n PCR-reaktion muita osa-alueita. Esimerkiksi templaatin määrä saattoi olla liian pieni – kaksi pientä hiusjuurta ei ehkä antanut riittävästi templaattia APOC2- lokuksen monistumiseen. Ehkä myös DNA-polymeraasin ja dNTP:iden pitoisuuksia voitaisiin reaktiossa muunnella.

LÄHTEET

- Apolipoprotein C-II. 2010. Tulostettu 28.4.2010.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&term=344>.
- Campbell, A. M., Williamson & Padula, D. 1997. Use PCR and Single Hair to Produce a "DNA Fingerprint". Tulostettu 4.2010.
<http://www.zoo.utoronto.ca/able>.
- Campbell, M. & Farrell, S. 2006. Biochemistry. Belmont USA: Thomson Brooks/Cole.
- DNA-tunnistusfaktaa. 2001. Poliisilehti 5/2001.
- Guidelines for PCR Optimization with Phusion High-Fidelity DNA Polymerase. Tulostettu 20.4.2010.
<http://www.neb.com/nebecomm/products/protocol235.asp>.
- Halkka, L. 2001. Kromatiinin koostumus. Tulostettu 11.4.2010
<http://idisk.mac.com/liisa.halkka/Public/liisan.tyot/KrMaa99/KrMaaRAK/koostumus.html>.
- Hartl, D. L. & Jones, E. W. 2005. Genetics – Analysis of Genes and Genomes. Sudbury, Massachusetts: Jones and Bartlett Publishers.
- Hius numerosarjaksi. 2001. Poliisilehti 5/2001.
- Karjalainen, M. & Johnsson, V. 2001. DNA rikostutkinnassa. Tulostettu 28.3.2001. <http://edu.fi/oph/abc//dna/forensic.html>.
- Klug, W.S., Cummings, M. R., Spencer, C. H. & Palladino, M. A. 2009. Concepts of Genetics. San Fransisco: Pearson Education.
- Lebedev, A., Paul, N., Yee, J., Timoschuk, V., Shum, J., Miyagi, K., Kellum, J., Hogrefe, R. & Zon, G. 2008. Hot Start PCR with heat-activatable primers: a novel approach for improved PCR performance. Nucleic Acids Research, Vol. 36, No. 20.
- Lewin, B. 2000. Genes VII. New York: Oxford University Press Inc.
- Lodish, H., Berk. A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipursky, S. L. & Darnell, J. 2003. Molecular Cell Biology. New York: W.H. Freeman and Company.
- Mathews, C. K., van Holde, K. E. & Ahern, K. G. 2000. Biochemistry. San Fransisco: Benjamin/Cummings.
- Partanen, S. 2008. PCR:n optimointi ja PCR-entsyymien valinta. Tulostettu 18.4.2010. www.laborantti.net/PCR%20optimointi.ppt.

PCR (polymerase chain reaction). 2006. Tulostettu 18.4.2010.
<http://www.uku.fi/sbi/MOGEI2006/PCR2006.pdf>.

Qbiogene Inc. 2010. Dimethyl Sulfoxide (DMSO) solution. Tulostettu 28.3.2010.
<http://www.qbiogene.com/products/pcr/dms0.shtml>

Rikosteknisen laboratorion DNA-tutkimukset. 2006. Tulostettu 8.5.2010.
<http://www.laborantti.net/dna.htm>

Roslan, H. A., Azizan, N. H. & Saat, R. 2009. DNA Polymorphism of D1S80 Locus in Modern Malay Sample Population of Sarawak. *Sains Malaysiana*, 38 (2),143-147.

Roux, K. H. 1995. Optimization and Troubleshooting in PCR. *Genome Research* 4: 185-194.

Räsänen, N. 2004. Toistojaksoista ja DNA-sormenjäljistä. Tulostettu 29.3.2010.
http://www.uku.fi/~nrasanen/MOGEI2004/Toistojaksot_ja_DNA-identifiointi.pdf.

Short Tandem Repeats. 2008. DNA Diagnostic Center. Tulostettu 28.4.2010.
<http://www.forensicdnacenter.com/dna-str.html>.

Solunetti 2010. Elektroforeesi. Tulostettu 2.5.2010.
<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/elektroforeesi/>.

Suominen, I. & Ollikka, P. 2004. Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet. Helsinki: Opetushallitus.

Tropp, B. E. 2008. *Molecular Biology Genes to Protein*. Sudbury, Massachusetts: Jones and Bartlett Publishers, Inc.

Vuorinen, J. 2005. Kalatalouden genetiikka. Tulostettu 29.3.2010.
<http://www.joensuu.fi/biologia/vuorinen/wets103/wets103%20alku.pdf>.

Walsh, P. S., Metzger D. A. & Higuchi, R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10(4): 506-13.

Whatman 2010. FTA-cards. Tulostettu 11.5.2010.
<http://www.whatman.com/FTANucleicAcidCollectionStorageandPurification.aspx>.

LIITTEET

LIITE 1 TYÖOHJE

LIITE 1: 1 (6)

”DNA-sormenjäljen” (DNA fingerprint) määrittäminen hiuksesta PCR:n avulla

Eukaryoottien genomista vain pieni osa on proteiineja ja RNA:ta koodaavaa DNA:ta. Suurin osa genomista koostuu ei-koodaavasta DNA:sta, jonka osuus ihmisellä on jopa 97 %. Proteiineja koodaamaton alue sisältää geenien säätely-jaksoja, introneja, pseudogeenejä sekä suurimmaksi osaksi toistuvaa DNA:ta.

Toistuvassa DNA:ssa tietyt kooltaan vaihtelevat nukleotidijaksot toistuvat jopa useina tuhansina kopioina. Nämä kopiot ovat tavallisesti syntyneet virheellisestä duplikaatiosta DNA:n kahdentuessa. Koska DNA:n toistojaksot ovat osa kromosomeja, ne myös periytyvät seuraaville sukupolville, ja täten jokainen meistä on perinyt vanhemmiltaan yksilöllisen määrän näitä toistojaksoja. Tätä DNA:n toistojaksojen suurta vaihtelevuutta käytetään hyväksi yksilöntunnistuksessa ja määrittäessä niin sanottua DNA-sormenjälkeä.

Eryisesti minisatelliitteihin kuuluvissa VNTR (variable number of tandem repeats) -DNA:n toistojaksoissa ja mikrosatelliitteihin kuuluvissa STR (short tandem repeats) -jaksoissa on runsaasti yksilöiden välistä muuntelua, mitä käytetään hyväksi esimerkiksi rikostutkimuksessa. Työssä tutkitaan kahden tällaisen runsaasti muuntelua sisältävän lokuksen toistojaksoja.

Työssä eristetään hiuksesta DNA:ta, monistetaan sitä PCR:n avulla ja lopuksi analysoidaan monistustuotteiden kokoja agarosigeelielektroforeesilla. Tutkittavat VNTR-lokukset ovat APOC2 ja D1S80.

APOC2 geeni koodaa apolipoproteiini C2:ta. Lokuksen toistuva jakso on kaksi nukleotidia pitkä. Tämän lokuksen PCR on helpompi suorittaa, mutta siitä saadut tulokset eivät ole niin selkeitä kuin D180:llä saadut. VNTR-lokus D1S80 vaatii PCR:ssä Hot Start -menetelmän käytön, missä DNA-polymeraasi lisätään vasta kun lämpötila on 95°C (näin vältetään primerdimereiden synty). D1S80:n PCR-tuote ilman toistoja on 142 emäsparia pitkä, ja jokainen toistojakso lisää sen kokoa 16 emäsparilla.

(jatkuu)

Tarvikkeet:

Liuokset ja reagenssit:

- Hair DNA Extaction Buffer (valmistusohje työohjeen lopussa)
- 1 x TBE (Tris-borate-EDTA)
- Proteinase K
- 20 x dNTPs
- Alukkeet (APOC2 ja D1S80)
- Taq DNA-polymeraasi
- 10 x PCR Buffer (without Mg)
- MgCl₂
- DMSO
- DNA-kokostandardi
- 10 x loading dye
- etidiumbromidi
- tislattu vesi
- agarooosi

Välineet:

- Mikrosentrifuugi- ja PCR-putkia
- Mikropipettejä
- Pipetinkärkiä (myös steriilejä)
- Lämpöhaude
- PCR-laite
- Erlenmayer-pulloja
- Vaaka
- Elektroforeesilaite
- Virtalähde

LIITE 1: 3 (6)

1. DNA:n eristäminen hiuksesta

1. Irrota hius ja leikkaa siitä karvatuppi, jossa on noin 5 mm hiusta mukana. Karvatuppi on riittävän suuri, kun se on selvästi silmillä nähtävissä. Jos et saa yhtä riittävän suurta karvatuppea, voit ottaa useamman pienen.
2. Laita hius sentrifuugiputkeen, ja lisää putkeen 100 µl DNA Extraction Bufferia, johon on lisätty 6 µg Proteinase K:ta.
3. Inkuboi lämpöhauteella 1 tunti 55°C:ssa ja 10 minuuttia 95°C:ssa.
4. Jäähdytä liuos ja säilytä tarvittaessa -20°C:ssa.

2. PCR APOC2-lokuksesta

PCR-reaktio sisältää:

DNA-näyte (templaatti)	7,5 µl	(eristetty kohdassa 1.)
Reaction mixture	17,5 µl	(ks. pipetointikaavio)

5. Laimenna tarvittaessa alukkeet (primerit), jotta voit pipetoida niitä pipetointikaavion mukaiset määrät.
6. Sentrifugoi lyhyesti kaikki putket ja pipetoi reagenssit aseptisesti kaavion mukaisesti PCR-putkiin.
7. Valmista kontrollinäyte käyttämällä templaatin asemasta vettä.

Säilytä putkia koko ajan jäällä!

Pipetointikaavio APOC2-lokukselle.

Reagenssi	Tilavuus	Loppukonsentraatio
H ₂ O	11,4 µl	
10xPCR puskuri (ilman Mg)	2,5 µl	
50 mM MgCl ₂	0,6 µl	2,0 mM *
20xdNTPs	0,5 µl	200 µM jokainen
Primer 1	1,0 µl	100 ng
Primer 2	1,0 µl	100 ng
Taq DNA-polymeraasi	0,5 µl	1 U
Templaatti	7,5 µl	noin 50 ng DNA:ta
Kokonaismäärä	25,0 µl	

* Huomioi DNA:n eristämislouoksen MgCl₂-pitoisuus 2,5mM .

(jatkuu)

LIITE 1: 4 (6)

8. Aja PCR-reaktiot taulukon mukaisesti. Toista kohdat 2-4 29 kertaa.

PCR ohjelman vaiheet APOC2-lokukselle.

1. 95°C	5 min.
2. 95°C	1 min.
3. 55°C	1 min.
4. 72°C	1 min.
5. 72°C	5 min.
6. 4°C	

3. PCR D1S80-lokuksesta

PCR-reaktio sisältää:

DNA-näyte (templaatti) 10,0 µl (eristetty kohdassa 1.)
 Reaction mixture 15,0 µl (ks. pipetointikaavio)

9. Laimenna tarvittaessa alukkeet, jotta voit pipetoida niitä pipetointikaavion mukaiset määrät.
10. Sentrifugoi lyhyesti kaikki putket ja pipetoi reagenssit aseptisesti kaavion mukaisesti PCR-putkiin.
11. Valmista kontrollinäyte käyttämällä templaatin asemasta vettä.

Säilytä putkia koko ajan jäällä!

Pipetointikaavio D1S80-lokukselle.

Reagenssi	Tilavuus	Loppukonsentraatio
H ₂ O	8,25 µl	
10xPCR puskuri (ilman Mg)	2,5 µl	1,5 mM MgCl ₂ **
DMSO	1,25 µl	5 %
20xdNTPs	0,5 µl	200 µM jokainen
Primer 1	1,0 µl	100 ng
Primer 2	1,0 µl	100 ng
Templaatti	10,0 µl	noin 70 ng DNA:ta
Taq DNA-polymeraasi	0,50 µl	1 U
Kokonaismäärä	25,0 µl	

**DNA:n eristysliuoksesta peräisin.

(jatkuu)

LIITE 1: 5 (6)

12. Aja taulukon mukainen PCR-reaktion kohta 1.
13. Pysäytä ohjelma hetkeksi ja pipetoi DNA-polymeraasi putkiin.
14. Jatka ohjelma kohdasta 2. taulukon mukaisesti. Toista kohdat 2-4 29 kertaa.

PCR ohjelman vaiheet D1S80-lokukselle.

1. 95°C	5 min.
2. 95°C	1 min.
3. 55°C	1 min.
4. 72°C	1 min.
5. 72°C	5 min.
6. 4°C	

15. Säilytä PCR-tuotteita pakastimessa (-20°C), jos teet agaroosigeelielektroforeesin myöhemmin.

4. Agaroosigeelielektroforeesi

Valmista APOC2-lokuksen PCR-tuotteille 3 %:nen agaroosigeeli ja D1S80-lokuksen PCR-tuotteille 1,5 %:nen geeli.

16. Punnitse tarvittava määrä agaroosia erlenmayeriin ja lisää 1xTBE-puskuriliuos. Laimenna puskuriliuos tarvittaessa 10xTBE:stä.
17. Kuumenna kiehattaen mikroaaltouunissa kunnes agaroosi on liuennut.
18. Jäähdytä noin 60°C:ksi ja lisää etidiumbromidi (0,5 µg/ml) vetokaapissa.
Huom. Etidiumbromidi on karsinogeeni!
19. Kaada liuos kelkkaan ja aseta näyttekampa paikalleen.
20. Anna geelin jähmettyä ja poista näyttekampa.
21. Pipetoi mikrosentrifuugiputkeen 10 µl näytettä ja 1 µl latauspuskuria (10x loading dye) ja sentrifugoi putket lyhyesti.
22. Valmista kokostandardi valmistajan ohjeen mukaisesti.
23. Pipetoi näytteet ja standardi geelin kaivoihin. Aja kohti plus-päätä 80 V:lla.
24. Tarkastele geelejä UV-valossa. Määritä alleelien koko ja kopiolukumäärä.

(jatkuu)

LIITE 1: 6 (6)

Hair DNA Extraction Buffer:

<u>Reagenssi</u>	<u>Määrä</u>	<u>Loppukonsentraatio</u>
KCl	1,86 g	50 mM KCl
Tris	0,61 g	10 mM Tris
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,25 g	2,5 mM MgCl ₂
Gelatiini	0,05 g	0,1 mg/ml gelatiinia
NP40	2,25 ml	0,45 % NP40
Tween 20	2,25 ml	0,45 % Tween 20
H ₂ O	ad 500 ml	

pH 8,3 huoneenlämmössä.