

Polümeraasi ahelreaktsioon: hulgas peitub jõud

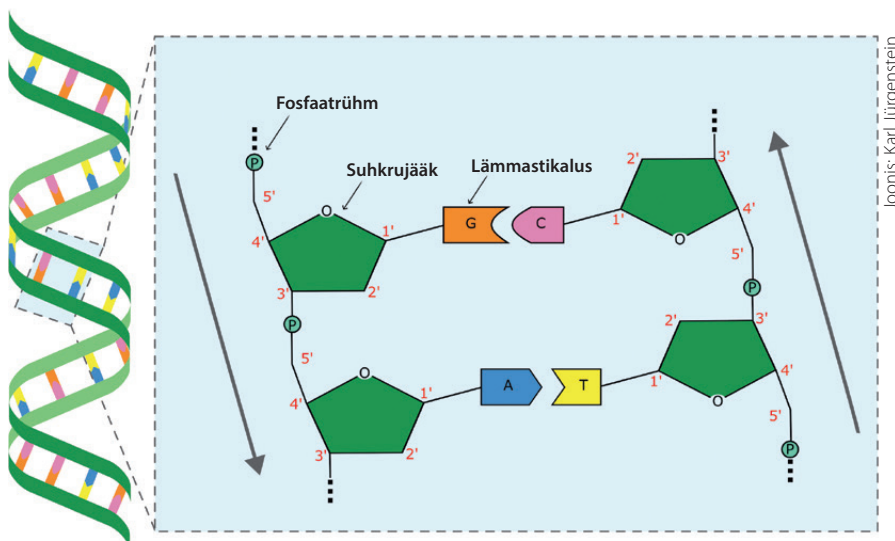
Polümeraasi ahelreaktsioon (ingl *polymerase chain reaction*, PCR) on elegantne ja mitmekülgne tööriist, mis kuulub paljude geneetikute, biotehnoloogide, süstemaatikute ja biokeemikute arsenali. Õigupoolest on tänapäeval keeruline leida molekulaarbioloogia valdkonnas teadustööd, mille raames ei ole seda meetodit rakendatud. Peale selle kasutatakse PCR-i laialdaselt näiteks diagnostikas ja kohtumediitsiinis.

Karl Jürgenstein, Sulev Kuuse

PCR kerkib molekulaarbioloogia meetodite hulgas esile eelkõige oma lihtsuse tõttu: reaktsioon viiakse üldjuhul ellu ühes katseklaasis, vajalikke komponente on neli ja kogu eksperiment võtab enamasti aega ainult tundi või paari. Reaktsiooni käigus paljundatakse soovitud DNA-lõiku eksponentsiaalselt, nõnda saadakse PCR-i tulemusena katseklaasis miljardeid selle DNA-lõigu koopiaid. See muudab lihtsamaks edasised katsed, sest uuritavat DNA-lõiku on võrreldes ülejäänud DNA-ga suures ülehulgas. Nii on seda DNA-d kergem tuvastada ja parem uurida.

Proloog. Polümeraasi ahelreaktsiooni tähtsust rõhutab väide, et see on õigupoolest jaganud bioloogia kaheks ajastuks: enne PCR-i ja pärast seda. Selle meetodi loomise eeldused kujunesid 20. sajandi märgiliste avastuste käigus. Ameeriklane James Watson ja inglase Francis Crick (1962. aasta Nobeli füsioloogiaauhinna laureaadid) avaldasid 1953. aastal artikli nüüdseks üldteadmiseks muutunud DNA kaksikheeliksi struktuurist.

USA teadlane Arthur Kronberg (Nobeli auhind 1959) uuris DNA replikatsiooni (DNA-ahelate taastootmist). Juba 1957. aastal kirjeldas Kronberg esimesena DNA polümeraasi ehk ensüümi, mis juhib replikatsiooni. 1960. aastatel uuris India päritolu USA teadlane Har Gobind



◇ 1. DNA kaksikheeliksi struktuur ja ahelate suunad. Punasega on nummerdatud süsinikuaatomid nukleotiidi suhkrumolekulis. Hallid nooled näitavad 5' kuni 3' suunda



PCR-i eesmärk on paljundada DNA-st huvi-pakkuvat lõiku.

Khorana (Nobeli auhind 1968) geneetilist koodi ehk kuidas nukleotiidide järjestus DNA-s määrab sünteesitavate valkude aminohappelise koostise. Khorana sünteesis esimesena lühikesi üheaahelalisi DNA-fragmente – oligonukleotide ehk praimereid.

Inglise biokeemik Frederick Sanger (Nobeli auhind 1958 ja 1980, viimane neist siin kirjeldatud avastuste eest) kirjeldas 1977. aastal esimesena sekveneerimist: meetodit, millega saab määrata DNA nukleotiidset järjes-

tust. Nobeli auhindadega sillutatud tee võimaldas 1980. aastatel leiutada polümeraasi ahelreaktsiooni meetodi. Ilmselt ei ole üllatav, et ka selle avastuse eest anti Nobeli auhind (1993).

Ometigi, esimese publitseeritud kirjelduse PCR-i sarnase meetodi kohta oli juba 1971. aastal avaldanud Norra teadlane Kjell Kleppe, kes töötas Khorana laboris. Oligonukleotiidide süntees oli tolal väga töömahukas protsess ning Kleppe ei näinud oma teoorial suurt rakenduslikku väärtust. Seetõttu ei tõestanud ta eksperimentidega selle teooria paikapidavust, kasulikkust ega tõsiseltvõetavust. Sestap ei kajastatudki Kleppe meetodit laiemalt.

Polümeraasi ahelreaktsiooni

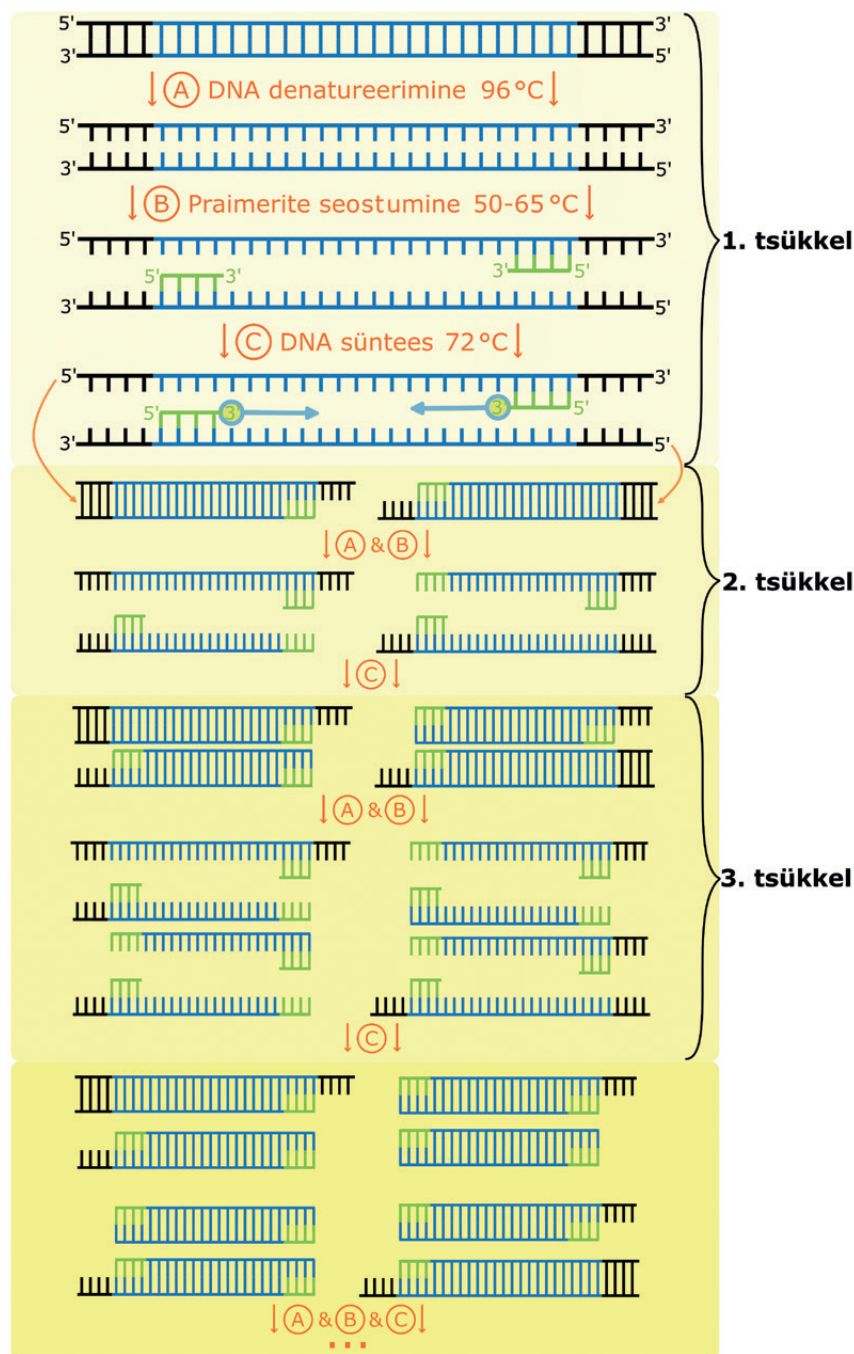
on välja töötanud USA biokeemik Kary Mullis, kelle heurekaetk leidis aset 1983. aastal ühel aprillikuuõhtul autoga mööda Põhja-California mägiteid sõites. Tol ajal töötas Mullis USA biotehnoloogiafirmas Cetus Corporation, kus tema peamine tööülesanne oli sünteesida DNA sekveneerimiseks vajalikke praimereid (primer on üheaheelaline DNA, mis matriitsiga paardudes moodustab DNA sünteesi alguskoha).

Kui esialgu oli seda tehtud käsitsi, siis 1980. aastate alguses liikus protsess üha selles suunas, et üksluiseid ja korduvaid etappe saaksid sooritada masinad. Teadlase ülesanne oli vaid sinna nukleotiide ja kemikaale laadida ja hoida masinaid töös.

Praimerisüntees oli muutunud nii efektiivseks, et laborid, kus rakendati veel lapsekingades sekveneerimismeetodit, ei suutnud planeerida piisavalt katseid. Mullis mõtiskles, kas kasutades kahte vastassuunalist praimerit (sekveneerimisel rakendatakse ainult ühte), saaks töötada välja tõhusama mooduse. Oma mõtteeksperimenti käigus oligi Mullis kogemata komistanud PCR-i põhimõtte otsa.

PCR-i põhimõte. PCR-i eesmärk on paljundada DNA-st huvipakkuvat lõiku. Esimene vajalik komponent on matriits-DNA, milles sisaldubki vajalik lõik. Inimese genoom on olemas igas keharakutuumas, seega piisab pelgalt väikesest rakukogusest, näiteks suu limaskestast rakkudest põsekaapes.

Teine komponent on DNA-polümeraas ehk ensüüm, mis juhib DNA paljundamist. Polümeraas liigub mööda üheaheelalist DNA-d ning DNA komplementaarsusprintsiibi järgi (A = T, G = C) ehitab matriitsahela vastasahela, nii tekib kaheaheelaline DNA. Ehituskivideks on vabad nukleotiidid (A, T, G ja C), mis ongi PCR-i kolmas komponent. Polümeraasiga on siiski üks probleem, nimelt vajab ta tütarahela tarbeks nii-öelda ankrut, kuhu kinnitada ahelasse lisatav nukleotiid (vesinikside vastasahela komplementaarse nukleotiidiga ei ole piisav). Selle



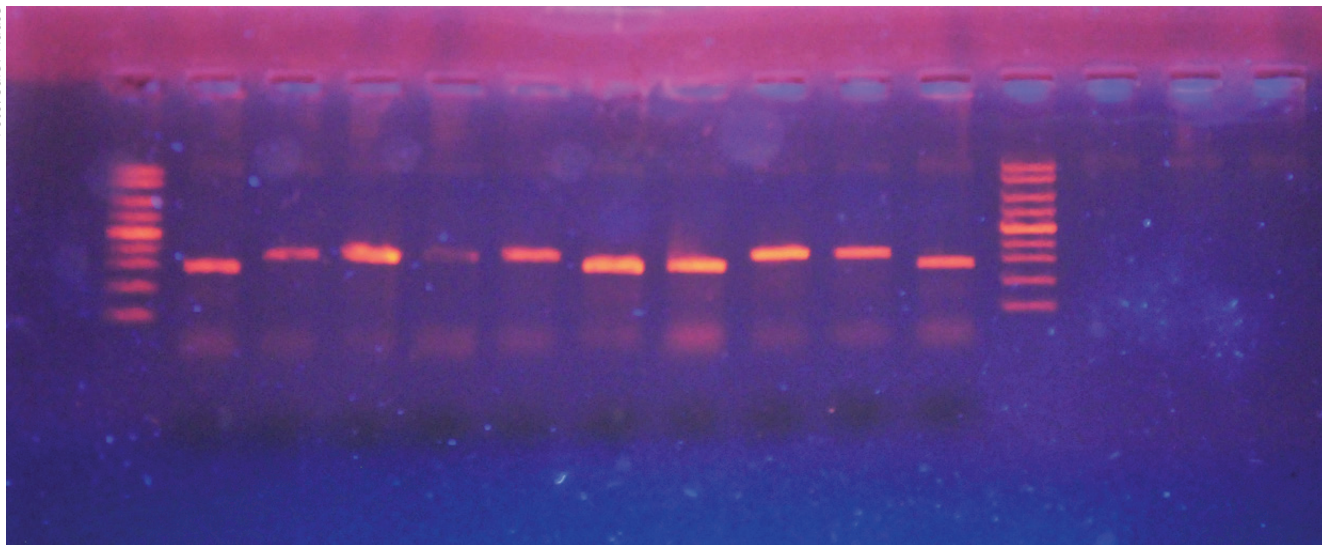
◇ 2. PCR-i põhimõte. Sinisega on märgitud DNA-fragment, mida soovime paljundada, mustaga seda ümbritsevad alad ja rohelisega praimereid

jaoks ongi vajalik praimerite paar, mis on loodud selliselt, et nad sobituksid vastasahelatele, ümbritseksid huvipakkuvat lõiku ja oleksid suunatud üksteise poole.

Mõistmaks, mida tähendab DNA puhul suund, peab natuke põhjalikumalt tundma nukleiinhapete struktuuri (◇ 1). Üks nukleiinhappe (DNA, RNA) ahel on justkui kett, mille lülid on nukleotiidid. Nukleotiidid koosnevad viiesüsinikulisest suhkrust (DNA-s

desoksüriboos, RNA-s riboos) ning igal süsinikuaatomil suhkrujäägis on kokku lepitud järjekorranumber 1'–5' (ülakoma kohta öeldakse siin „prim“).

Suhkrumolekuli 1' (üks prim) süsiniku küljes on lämmastikalus, mis määrab nukleotiidi identiteedi (A, T/U, G, C) ning mille kaudu moodustub vesinikside komplementaarse vastasahela nukleotiidiga. 5'-süsiniku küljes on fosfaatgrupp, mille kaudu luuakse side sama ahela nukleotiidi-



◇ 3. Agarosgeelis suuruse põhjal lahutatud DNA-fragmendid muutuvad nähtavaks UV-valguses. Proovid kantakse pildi ülaosas nähtavatesse piludesse, elektriväljas liiguvad need läbi geeli positiivse laenguga elektroodi suunas. Näete 10 PCR-reaktsiooni tulemusel tekkinud DNA-fragmente. Proovidest mõlemal pool on suurusmarker, mis võimaldab silma abil hinnata PCRi-saaduste suurust. Geeli on teinud Heili Ilves

de vahel. Ahela pikendamise kohta on korrektsem öelda, et 3'-süsiniku küljes olevale hapnikuaatomile liidetakse järgmine nukleotiid selle 5'-fosfaatgrupi kaudu.

Uut ahelat sünteesides kinnitabki polümeraas lahuses olevaid vabu nukleotide (ehituskive) nende 5'-positsioonis paikneva fosfaatgrupi kaudu pikendatava ahela eelmise nukleotidi 3'-positsiooni külge. DNA-ahelat pikendatakse alati 5' kuni 3' suunas, teistpidist reaktsiooni polümeraas ei katalüüsi. PCR-i segusse lisatud praimerid annavadki polümeraasidele ahela sünteesimiseks alguskoha ehk vaba 3'-otsa, kuhu nukleotide lisada.

Polümeraas liigub DNA-ahela sünteesil ainult ühes suunas.

Katseklaasi on nüüd lisatud kõik vajalikud komponendid. Kas polümeraasi ahelreaktsioon hakkabki kohe pihta? Ei. Matriits-DNA, milles sisaldub ka huvipakkuv lõik, on terves pikkuses kaheaheelaline, lühikestel praimeritel ei ole kuskile kinnituda ning seega pole ka polümeraasil võimalik toimida.

Nüüd tuleb tõsta temperatuuri. Eeldatavasti oleme komponendid kokku seganud toatemperatuuril. Tõstes reaktsioonisegu tempera-

tuurini 96 °C, katkevad kahte ahelat koos hoidvad vesiniksidemed ja DNA denatureerub ehk muutub üksikaheelaliseks.

Eespool kirjeldatud 5'-3'-sidemed (fosfodietersidemed) on tunduvalt tugevamad, mistõttu ei ole ohtu, et DNA-ahel ise katkeks. Selleks et DNA denatureeruks, piisab umbes 30-sekundilisest kuumutamisest. Seejärel langetatakse temperatuur vahemikku 50–65 °C, et praimerid seostuksid oma sihtmärkjärjestustele meile huvipakkuva geeni ümber.

Mida lühem on nukleiinhappe molekuli fragment, seda kiiremini see läbi geeli liigub.

Sellel temperatuuril ei pea muretsema, et denatureerunud DNA ahelad omavahel uuesti kokku läheksid, sest need on väga pikad ja korrektne paardumine nende vahel toimub väga aeglaselt. Lühikesed praimerid paarduvad märksa efektiivsemalt, ka nende puhul on vaja välja arvutada täpne kasutustemperatuur. Kui see on liiga madal, võivad praimerid hakata seostuma ka sihtmärkjärjestustega sarnastele, kuid mitte päris õigetele

järjestustele. Liiga kõrgel temperatuuril ei pruugi praimer isegi õigele järjestusele seostuda. Ka siin etapis piisab vaid 30 sekundist, et praimerid kinnituksid üheaheelisel DNA-l õigesse positsiooni.

Seejärel tõstetakse temperatuur 72 °C-ni, sest siis toimib kõige paremini *Taq*-polümeraas. See on pärit kuumaveeallikates elavast bakterist *Thermus aquaticus*, mistõttu ei pea muretsema ensüümi hävimise pärast. Etapi pikkus oleneb nii paljundatava DNA-fragmendi pikkusest kui ka kasutatava polümeraasi jõudlusest. *Taq*-polümeraas suudab nukleotide ahelasse lisada keskmiselt 1000 nukleotidi minutis.

Need kolm etappi – kaheaheelise DNA denatureerimine üheaheeliseks; praimerite seostumine üheaheelisele DNA-le ja DNA süntees – moodustavad polümeraasi ahelreaktsiooni ühe tsükli. Ühe tsükli käigus kahekordistatakse uuritava DNA-fragmendi hulk.

Saamaks soovitud DNA-fragmente märkimisväärses ülehulgas, korraldatakse neid tsikleid tavaliselt 25–35 korda. Iga tsükli tulemusena tekivad uued fragmendid on omakorda matriitsiks järgmises tsükli, milles avaldubki reaktsiooni n-ö aheldatus ja saaduse hulga eksponentsiaalne suurenemine (◇ 2).

Pärast PCR-i lõppu on väga lihtne kontrollida, kas see õnnestus. Enim kasutatakse selleks geel-elektroforeesi, mille käigus voolutatakse reaktsiooniprodukti elektrivälja toimel geelmaatriksis (3).

Mida lühem on nukleiinhappe molekuli fragment, seda kiiremini see läbi geeli liigub. Geel sisaldab fluorestseeruvat etiidiumbromiidi, mille molekulid jäävad kinni läbi geeli liikuva DNA aluspaaride vahele. Selle käigus suureneb etiidiumbromiidi fluorestsents veelgi, mistõttu on UV-valguse käes võimalik geelis voolutatavat DNA-d näha. Helendav vööt viitab, et PCR on õnnestunud. Ühtaegu uuritava prooviga voolutatakse geelis ka nn suurusmarkerit, mis sisaldab kindla suurusega fragmentide segu ja võimaldab hinnata uuritava proovi pikkust.

Arendustöö käigus on meetod muutunud järjest mugavamaks. Näiteks kasutas Mullis oma esimeses eksperimentides soolekepikese DNA-polümeraasi, mis toimib kõige tõhusamalt temperatuuril 37 °C, kuid temperatuuril üle 45 °C laguneb soo-

Näiteid PCR-i kasutusvõimaluste kohta

- Populatsioonigeneetikud saavad meetodi abil uurida elusolendite geenijärjestusi.
- Meetod lubab tuvastada isadust ja emadust.
- Meditsiinis kasutatakse PCRi, tegemaks kindlaks tõvestajaid (viirused, bakterid jne).

Ühtlasi võimaldab see diagnoosida mõnda pärilikku haigust. Näiteks saab meetodi abil kindlaks teha, kas geenides BRCA1 ja BRCA2 leidub mutatsioone. Need on rinna- ja munasarjavähi kõige olulisemad pärilikud riskitegurid.

tuks. See tähendas, et polümeraasi tuli pärast iga DNA denatureerimise etappi reaktsioonisegusse juurde lisada ning DNA süntees toimus madalamal temperatuuril. Termotabiilse *Taq*-polümeraasi kasutuselevõtt lahendas selle probleemi.

Esialgu saadi vajalik reaktsioonisegu temperatuur katseklaasi vesivannide vahel liigutades. Peagi võtsid üksluise töö üle termotsüklerid, programmeeritavad masinad, mis võimaldavad kerge vaevaga määrata reaktsiooni iga etapi jaoks vajalikud

tingimused. Selle tulemusena ongi PCR-ist saanud lihtne, kuid võimas ja rikkaliku potentsiaaliga tööriist, mida kasutatakse tuhandetes laborites üle kogu maailma. Eriti kuulsaks sai PCR koroonapandeemia alguses. Sellest kirjutame lähemalt järgmises numbris. ■

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

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

Targad teosed hea hinnaga Eesti Kirjandusmuuseum

Külasta meie e-poodi veebiaadressil
pood.kirmus.ee

