

Dvynių genetiniai tyrimai

Darbą atliko: Elena Everatt ir Veronika Everatt, Vilniaus jėzuitų gimnazija, III kl.
Darbo vadovė: j.m.d. dokt. Kristina Daniūnaitė, VU Gamtos mokslų fakultetas (GMF);
mokytoja Ala Vaicekauskienė.
Darbas atliktas: VU GMF Žmogaus genomo tyrimų centre.

Įvadas

Dvyniai – unikalūs tyrimų objektas, leidžiantis tirti paveldėjimo ir gyvenimo eigoje atsiradusių fenotipinių pokyčių atsiradimo principus. Šio darbo tikslas yra ištirti genetinius ir epigenetinius dvynių skirtumus molekuliniiais metodais. Antropologijoje dažnai taikomi mtDNR tyrimai. Tai mitochondrijose randamos žiedinės DNR molekulės, paveldimos iš motinos per kiaušialąstės citoplazmą. Joms nebūdinga rekombinacija, todėl sukaupti genetiniai skirtumai perduodami iš kartos į kartą. Pagal mtDNR sekas žmonių populiacija skirstoma į haplogrupes. Jos nustatomos pagal genetines žymes, vieno nukleotido polimorfizmus (VNP). VNP –konkrečioje sekos vietoje esančio nukleotido skirtumas tarp skirtingų žmonių, nelaikomas mutacija. Šias variacijas mažai veikia gamtinė atranka.

Tyrimo uždaviniai

Remiantis *Pardinas et al.* (2010) metodologija, palyginti dvynių ir ne dvynės sesers mtDNR pagal du konkrečius VNP ir nustatyti galimas haplogrupes.

Tyrimo hipotezė

Trijų seserų, dvynių ir ne dvynės, mtDNR sekoje nebus nustatyta VNP skirtumų, nes mtDNR paveldima tik per motinos liniją.

Tyrimo eiga

DNR skyrimas

DNR išgryninimui iš ląstelių naudotas *GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini* komercinis rinkinys (*Thermo Fisher Scientific*; TF). Steriliais įrankiais paimta burnos gleivinės nuograndų ir perkelta į mėgintuvėlius su izotoniniu tirpalu. Lizės buferiu suardytos ląstelių membranos, proteinaze K – baltymai. Mėginiai 10 min. laikyti terminėje purtyklėje (56°C), po to DNR išgryninta, naudojant filtrines kolonėles. Įvertinta išskirtos DNR koncentracija ir švarumas.

Polimerazės grandininė reakcija (PGR)

Du mtDNR fragmentai, apimantys skirtingus VNP, pagausinti PGR būdu. PGR mišinį sudarė reakcijos buferis, atitinkama pradmenų pora (kad nežiedinis dvigrandis fragmentas būtų generuojamas nuo prasminės ir antiprasminės mtDNR grandinių), deoksiribonukleotidai, DNR polimerazė (*Maxima Hot Start Taq*; TF) ir tiriamasis mėginys. Abu fragmentai pagausinti atskiruose mėgintuvėliuose, taip pat įtraukta kontrolė (be DNR). Mėgintuvėliai nucentrifuguoti ir inkubuoti termocikleryje.

Restrikcinė analizė

VNP nustatymas pagrįstas fermentine restrikcijos reakcija, t.y. tikrinama, ar fragmentą kerpa restriktazės, į kurių atpažįstamą trumpą DNR seką patenka tiriamasis VNP (1 lentelė). Buvo naudoti fermentai *HinfI* ir *Sau96I* (*FastDigest* produktų linija; TF). Vieno VNP ištyrimui buvo paruošta po 2 mėgintuvėlius kiekvienam mėginiui ištirti (reakcijai su (+) ir be (-) fermento; iš viso 6 mėgintuvėliai) bei reakcijos taršos kontrolė (NTC; 1 mėgintuvėlis). Į paruoštus mėgintuvėlius įpilta *FastDigest* buferio, DNR, (ne)įdėta restriktazės. Restrikcija vykdyta 15 min 37°C. Po to fermentai, neatidarius mėgintuvėlių, inaktyvuoti aukšta temperatūra. Rezultatai analizuoti atlikus elektroforezę 3 % agarozės gelyje.

1 lentelė.VNP nustatymui mtDNR taikytos restriktazės ir rezultatų interpretavimas.

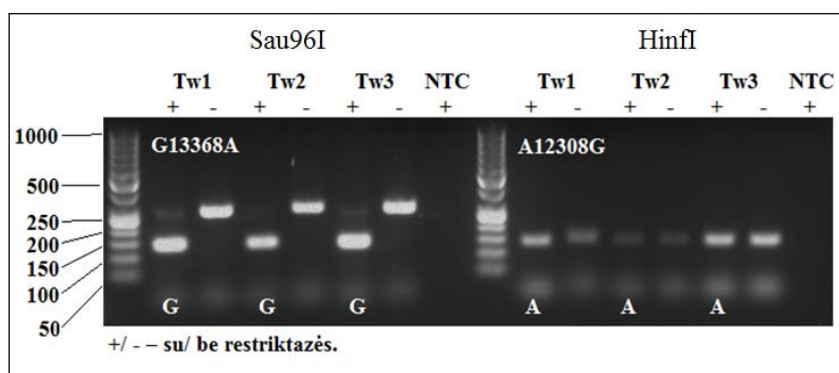
Vieno nukleotido polimorfizmas (VNP)	Restriktazė	Deoksiribonukleotidas (kirpta/ nekirpta)
A12308G	Hinfl	G/ A
G13368A	Sau96I	G/ A

Rezultatai ir jų analizė

VNP nustatymas

Tyrimo rezultatai pateikti 1 pav. Atlikus VNP (G13368A) analizę su Sau96I, matyti, kad paveikus mėginius (dvynių seserų Tw1 ir Tw2 bei ne dvynės sesers Tw3) fermentu (+) visur susidarė trumpesni (~140 bp) ilgio fragmentai, lyginant su neveiktais (-). Tai rodo, kad Sau96I kirpo mtDNR fragmentą savo atpažinimo sekoje. Remiantis 1 lentele, tiriamoje pozicijoje visos seserys turi tą patį nukleotidą, guaniną (G).

VNP (A12308G) analizė, naudojant Hinfl, parodė, kad + ir - reakcijose gauti fragmentų ilgiai nesiskyrė (~134 bp). Vadinasi, šiame mtDNR fragmente nebuvo šios restriktazės atpažįstamos sekos. Pagal 1 lentelę nustatyta, kad tiriamoje vietoje yra adenino nukleotidas (A).



1 pav. Dviejų VNP tyrimo (G13368A ir A12308G) rezultatų analizė agarozės gelyje. Tw1-3 – tiriamieji mėginiai, NTC – taršos kontrolė. Kairėje nurodytas DNR ilgio žymens fragmentų ilgis (bazių poromis).

Haplogrupių nustatymas

Remiantis *Pardinas et al.* publikacijoje pateikta haplogrupių nustatymo lentele, atmesta galimybė, kad seserys priklauso haplogrupėms K, T,U. Tačiau iš turimų duomenų tikslios haplogrupės pagal du ištirtus VNP nustatyti neįmanoma, t.y. galimi 6 variantas: H, I, J, V, W arba X.

Išvados

- Visų trijų seserų mtDNR pagal du ištirtus VNP skirtumų nerasta.
- Remiantis atliktu mtDNR dviejų VNP tyrimu, seserys gali priklausyti vienai iš 6 haplogrupių (H, I, J, V, W arba X). Konkrečios haplogrupės identifikuoti neįmanoma.

Tolimesni uždaviniai

- Genetiškai nustatyti Rh (rezus) faktorių
- Genetiškai įvertinti laktozės netoleravimo tikimybę
- Ištirti mažųjų reguliacinių RNR raišką
- Įvertinti kiekybinius DNR metilinimo skirtumus

Literatūra

1. Pardinas AF *et al.* Introducing human population biology through an easy laboratory exercise on mitochondrial DNA. *Biochem Mol Biol Educ* 2010; 38(2).
2. Thermo Fisher Scientific. <http://www.thermoscientific.com> [internetinė svetainė]