



**TURUN  
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen  
tiedekunta

## **Yhden nukleotidin polymorfismien havainnointi**

Kemia  
LuK-tutkielma  
Laajuus: 6 op

Laatija(t):  
Mei Ling Pham

26.07.2024  
Turku

Turun yliopiston laatu järjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

LuK-tutkielma

**Pääaine:** Kemia

**Tekijä(t):** Mei Ling Pham

**Otsikko:** Yhden nukleotidin polymorfismien havainnointi

**Ohjaaja(t):** Kari Kopra

**Sivumäärä:** 19 sivua

**Päivämäärä:** 26.07.2024

---

Yhden nukleotidin polymorfismit (engl. single nucleotide polymorphism, SNP) ovat yhden emäsparin muutoksia DNA-ketjussa. DNA:ssa esiintyvät emäsparin muutokset aiheuttavat suurimman osan ihmisen genomien muunteluista ja periytyessään nämä pistemutaatiot voivat muuttaa esimerkiksi ihmisen lääkevastetta tietyille lääkeaineille. Ne voivat myös altistaa tietyille sairauksille, kuten syöville, autoimmuunisairauksille, Parkinsonin taudille ja Alzheimerin taudille.

Yleisimmät käytetyt menetelmät SNP:iden tutkimiseen ovat fluoresenssiin perustuvia. Fluoresenssiin perustuvissa havainnointimenetelmissä käytetyt fluoresenssikoettimet ovat leimattu fluoresoivalla väriaineella ja ne ovat yleensä alleelispesifisiä. Näitä koettimia voidaan soveltaa moniin polymeraasketjureaktio- ja sekvensointimenetelmiin, joiden avulla tutkitaan DNA:ssa esiintyviä SNP:itä. Muita havainnointimenetelmiä ovat muun muassa DNA-microsirutekniikka ja DNA:n erilaisiin ominaisuuksiin perustuvat menetelmät, kuten lämpökäyrät ja DNA-molekyylin massaan perustuva massaspektrometria.

Monet kaupallisessa käytössä olevat SNP-havainnointimenetelmät ovat työläitä ja kustannukset erittäin korkeita. Myös määrityksessä käytetyt näytepitoisuudet ovat suuria, jonka takia pyritään kehittämään herkempiä menetelmiä. Uusia SNP-havainnointimenetelmiä tutkitaan ja kehitetään jatkuvasti, jotta saadaan menetelmistä myös kustannustehokkaampi SNP:iden havainnointiin.

---

**Avainsanat:** SNP, DNA, PCR, sekvensointi, microsiru

# Sisällysluettelo

<b>1. JOHDANTO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. YHDEN NUKLEOTIDIN POLYMORFISMIT .....</b>	<b>2</b>
<b>3. POLYMERAASIKETJUREAKTIOON JA DNA-SEKVENSOINTIIN POHJAUTUVAT HAVAINNOINTIMENETELMÄT .....</b>	<b>3</b>
3.1. POLYMERAASIKETJUREAKTIOON PERUSTUVAT MENETELMÄT .....	4
3.1.1. <i>TaqMan</i> .....	5
3.1.2. <i>Kilpaileva alleelispesifinen –PCR</i> .....	6
3.1.3. <i>Amplifikaatio-refraktorinen mutaatiojärjestelmä –PCR</i> .....	7
3.1.5 <i>Silmukkavälitteinen isoterminen monistus</i> .....	7
3.2. SEKVENSOINTIMENETELMÄT .....	8
3.2.1. <i>Sangerin sekvensointi</i> .....	8
3.2.2. <i>Seuraavan sukupolven sekvensointi</i> .....	9
3.2.3. <i>MinION</i> .....	9
3.2.4. <i>PolyPhred</i> .....	10
<b>4. DNA-MICROSIRUMENETELMÄT .....</b>	<b>11</b>
4.1. AFFYMETRIX-SIRU .....	12
4.2. ILLUMINAN GOLDENGATE .....	13
4.3. ALUKELAAJENNUS.....	14
4.4. INFINIUMIN KOKO GENOMIN GENOTYYPIMÄÄRITYS .....	15
<b>5. MUITA HAVAINNOINTIMENETELMIÄ .....</b>	<b>16</b>
5.1. MATRIISIAVUSTEINEN LASERDESORPTIOIONISAATIO LENTOAIKAMASSASPEKTROMETRIA.....	16
5.2. DENATUROIVA KORKEAN EROTUSKYVYN NESTEKROMATOGRAFIA.....	17
5.3. KORKEA RESOLUUTIO SULAMISANALYYSI .....	17
<b>6. JOHTOPÄÄTÖKSET JA YHTEENVETO .....</b>	<b>18</b>
<b>VIITTEET .....</b>	<b>20</b>

## Käytetyt lyhenteet selityksineen

ARMS = amplikaatio-refraktorinen mutaatiojärjestelmä (engl. amplification-refractory mutation system)

ddNTP = dideoksinukleotidi

dHPLC = denaturoiva korkean erotuskyvyn nestekromatografia (engl. denaturing high performance liquid chromatography)

DNA = deoksiribonukleiinihappo

FRET = fluoresenssi-resonanssi-energiansiirto (engl. fluorescent resonance energy transfer)

HRMA = korkea resoluutio sulamisanalyysi (engl. high-resolution melting analysis)

KASP = kilpaileva alleelispesifinen –PCR (engl. competitive allele specific PCR)

LAMP = silmukkavälitteinen isoterminen monistus (engl. loop-mediated isothermal amplification)

MALDI-TOF MS = matriisiavusteinen laserdesorptioionisaatio lentoaikamassaspektrometri (engl. matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry)

NGS = seuraavan sukupolven sekvensointi (engl. next generation sequencing)

PCR = polymeraasiketjureakio

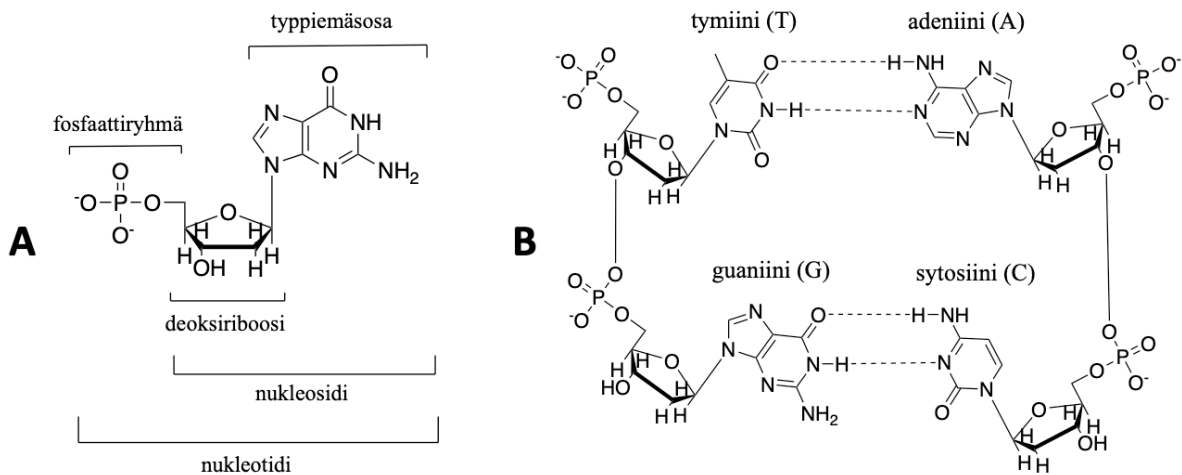
RNA = ribonukleiinihappo

SNP = yhden nukleotidin polymorfismi (engl. single nucleotide polymorphism)

# 1. Johdanto

Deoksiribonukleiinihappo (DNA) on yksi tärkeimmistä molekyyleistä elävissä soluissa, koska se sisältää elävien solujen geneettisen materiaalin. Genomi on organismin geneettisen tiedon täydellinen joukko, kuten eukaryooteilla DNA sijaitsee kromosomeissa, ja toimiva genomi on ehto yksilön normaalille kehitykselle ja elämän ylläpitämiselle. Lisääntyessä jälkeläinen perii yhden kromosomisarjan kummaltakin vanhemmalta, jolloin jälkeläiselle syntyy diploidinen genomi.<sup>1</sup>

DNA on monomeeriyksiköistä koostuva polymeeri, missä monomeeriyksiköt ovat nukleotidejä. Nukleotidi koostuu 5-hiilisestä sokeriosasta, deoksiriboosista, typpiemäsosasta sekä yhdestä tai useasta fosfaattiryhmästä (Kuva 1 A). DNA-synteesin aikana fosfaattiryhmät häviävät, jolloin DNA-nukleotidiin jää jäljelle yksi fosfaattiryhmä. Nukleosidi on nukleotidin osa, johon fosfaattiryhmät kiinnittyvät (Kuva 1 A).<sup>1</sup> DNA-ketjussa esiintyy neljä erilaista typpiemästä (Kuva 1 B). DNA on kaksijuosteinen rakenne, jossa kaksi juostetta kulkee vastakkaisiin suuntiin. Nämä ketjut ovat sitoutuneet toisiinsa emäsparien välillä olevilla vetysidoksilla.<sup>1</sup>

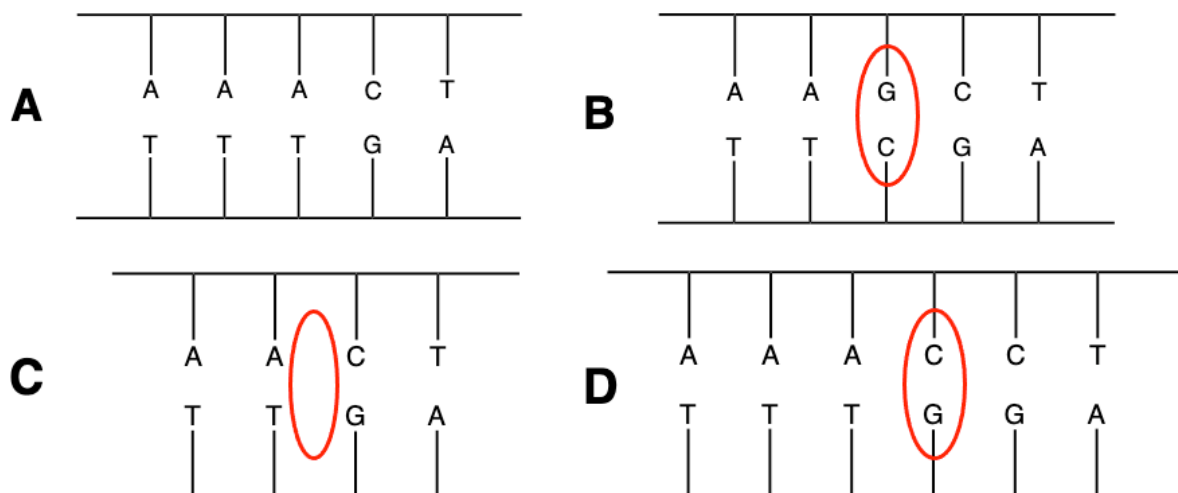


**Kuva 1.** DNA:n nukleotidin rakenne sekä emäspariutuminen DNA:ssa. A) DNA-nukleotidin rakenne koostuu nukleosidista. Nukleosidin rakenteessa deoksiriboosiin on kiinnittynyt typpiemäsosa, ja fosfaattiryhmän kiinnittyessä nukleosidiin muodostaa nukleotidin. Kuvassa deoksiriboosiin kiinnittynyt typpiemäsosa, jolloin muodostunut nukleotidi on guanosiinimonofosfaatti. B) DNA:ssa typpiemäkset pariutuvat emäsparisäännön mukaisesti siten, että kaksirenkaiset puriiniemäkset adeniini (A) ja guaniini (G) pariutuvat ja yksirenkaiset pyrimidiiniemäkset sytosiini (C) ja tymiini (T) pariutuvat.

Perinnöllisen tiedon tutkimiseen vaaditaan erilaisia määrittämenetelmiä. Näiden menetelmien valintaan vaikuttaa halutun tiedon saanti ja menetelmien rajoitukset. Jokaisella menetelmällä on omat rajoituksensa, jonka takia niiden ymmärtäminen on peruspohjana määrittämenetelmän valinnalle. Genotyypimäärittäminen on prosessi, jossa määritetään geneettinen rakenne eli genotyyppi. Genotyypimäärittämisellä on monenlaisia sovelluskohteita muun muassa perinnöllisten sairauksien ja terveystieteiden tutkimuksessa sekä erilaisien tutkimuksien ja rikostutkimuksen tutkimusmenetelmissä. Useita menetelmiä on tutkittu ja osa niistä ovat jo kaupallisesti saatavilla. Viime vuosikymmenien aikana genotyypimäärittämenetelmissä on tapahtunut merkittävää kehitystä.<sup>2</sup> Tutkielmassani perehdyn erilaisiin havainnointimenetelmiin, joilla on mahdollista havainnoida yhden nukleotidin polymorfismeja DNA-näytteestä. Tarkemmin keskityn polymeerasiketjureaktioon (engl. polymerase chain reaction, PCR), sekvensointiin ja DNA-microsiruun pohjautuviin menetelmiin. Lopuksi esittelen myös muita vaihtoehtoisia menetelmiä. Aiheeseen perehdyn tarkemmin, miten esitellyt menetelmät toimivat ja soveltuvat SNP:iden havainnointiin.

## 2. Yhden nukleotidin polymorfismit

Yhden nukleotidin polymorfismit ovat DNA-ketjussa esiintyviä yleisimpiä geneettisen variaation muotoja.<sup>3</sup> SNP:t ovat yhden emäsparin vaihdoksia, deleetioita ja insertioita, joita esiintyy genomien koodaavilla alueilla ja säätelyalueilla (Kuva 2). Nämä muutokset vaikuttavat ihmisten sairauksiin sekä lääkekestoisuuteen, geenien ilmentymiseen ja populaatiogenetiikkaan.<sup>4</sup> Suuri osa geneettisistä mutaatioista altistavat tietyille sairauksille, kuten syöpät, diabetes, Parkinsonin tauti, autoimmuunisairaudet ja Alzheimerin tauti.<sup>5</sup>



**Kuva 2.** DNA-sekvenssissä (A) tapahtuneet kolme mahdollista SNP:n esiintymismuotoa. B) DNA-sekvenssissä on yhden emäsparin vaihdoksen aiheuttama SNP, jossa kuvassa A–T-emäspari on vaihtunut G–C-pariksi. C) DNA-sekvenssissä esiintyvä SNP on deleetio, missä yksi emäspari on hävinnyt kokonaan DNA-sekvenssistä. D) SNP esiintyminen DNA-sekvenssissä on insertio, jossa DNA-sekvenssiin on liittynyt ylimääräinen emäspari.

SNP:t esiintyvät ihmisen genomissa keskimäärin muutaman sadan emäksen välein ja ovat periytyviä muunnelmia. DNA-sekvenssien analyysien avulla on saatu selville, että suuri osa yksilöiden genomien välillä tapahtuvat vaihtelut ja mutaatiot johtuvat DNA:ssa esiintyvistä SNP:istä. Tämän takia SNP:iden havaitseminen on tärkeää muun muassa taudin aiheuttavien geenien tunnistamisessa ja sopivien lääkeaineiden annostuksissa. Potentiaalisesti ikävimmät SNP:iden aiheuttamat seuraukset ovat perinnölliset sairaudet, sillä SNP:illä on merkittävä rooli perinnöllisten sairauksien kehittämisessä. <sup>5</sup> Seuraavissa osioissa käsitellään PCR:ään, sekvensointiin ja DNA-microsiruun pohjautuvia menetelmiä, joilla on mahdollista havainnoida tutkittavista DNA-sekvensseistä esiintyviä SNP:itä. Lopuksi on vielä muita vaihtoehtoisia havainnointimenetelmiä, joissa sovelletaan DNA:n omia erilaisia ominaisuuksia.

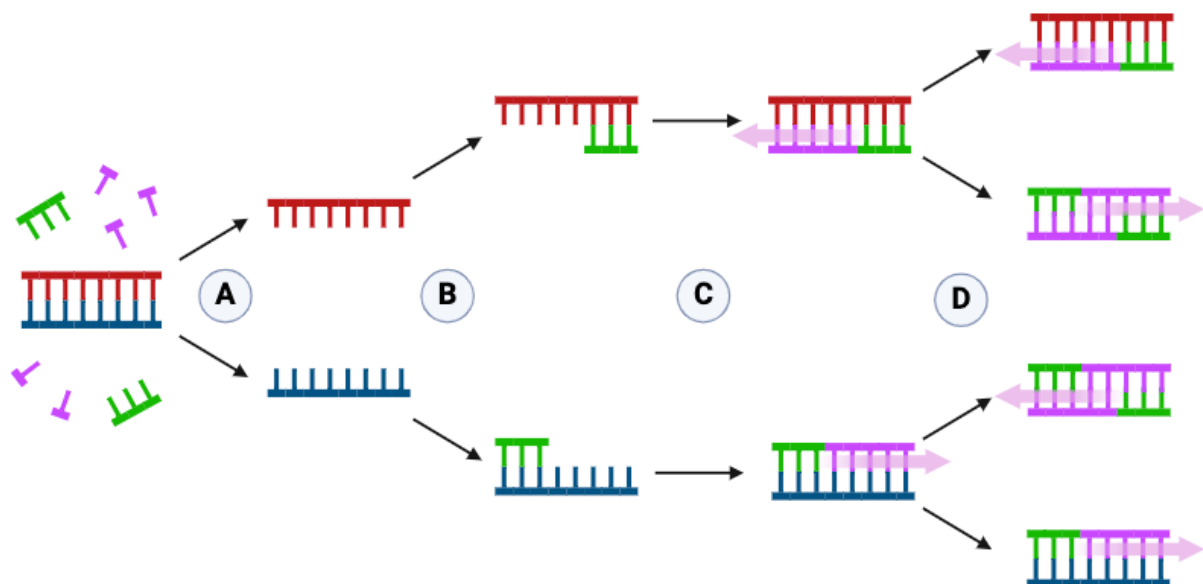
### 3. Polymeraasiketjureaktioon ja DNA-sekvensointiin pohjautuvat havainnointimenetelmät

Tutkielmassani esitetyissä polymeraasiketjureaktioon ja DNA-sekvensointiin pohjautuvissa menetelmissä havainnointiin on sovellettu fluoresoivalla väriaineella leimattuja koettimia (engl. probe). Niiden tuottaman fluoresenssi-signaalien avulla tarkastellaan tutkittavan DNA-näytteessä esiintyviä SNP:itä. PCR:ään pohjautuvissa menetelmissä sovelletaan DNA-sekvenssin monistusvaiheessa olevan DNA-polymeraasientsyymin toimintaa, jolloin SNP:n esiintyminen DNA-sekvenssissä havaitaan estyneenä DNA-polymeraasientsyymin eksonukleasin toimintana. Viimeisenä PCR-menetelmistä esittelen vaihtoehtoisen menetelmän PCR:lle, missä määritykset voidaan suorittaa ilman PCR:ssä tarvittavaa lämpösyklivaihetta. Sekvensointiin pohjautuvissa menetelmissä sekvensoinnin avulla määrittää tutkittavan DNA-sekvenssin nukleotidimäsjärjestys, jolloin voidaan nukleotidimäsjärjestystä selvittämällä tutkia tutkittavista sekvensseistä esiintyvät SNP:t. Sekvensointiin pohjautuvissa menetelmissä esittelen lopuksi myös käsittelyohjelman, jolla voidaan automatisoidusti käsitellä sekvensointidataa.

### 3.1. Polymeraasiketjureaktioon perustuvat menetelmät

Polymeraasiketjureaktio on DNA-sekvensien monistusmenetelmä, joka on nopea ja herkkä. Menetelmässä tutkimuksen kohteena oleva DNA-sekvenssi on tunnettava ennen monistusvaihetta PCR:llä, jotta monistettavan DNA-alueen päihin voidaan kiinnittää monistettavaa aluetta rajaavia synteettisiä alukkeita, ja tehdä DNA-sekvenssille komplementaarisen koettimen. Tällöin DNA-polymeraasientsyymi voi monistaa alukkeiden rajaaman halutun DNA-pätkän.

Menetelmä koostuu kolmesta vaiheesta, jotka toistuvat sykleittäin (Kuva 3). Ensimmäinen vaihe on denaturointi, missä kaksoisjuosteiset DNA-fragmentit lämmitetään, kunnes ne avautuvat yksijuosteisiksi. Toisessa vaiheessa lämpötilan laskiessa yksijuosteiset DNA-fragmentit eli alukkeet sitoutuvat sen komplementaarisiin tutkittavan näytteen sekvensseihin. Viimeisessä vaiheessa tapahtuu DNA-synteesi, jossa DNA-polymeraasi laajentaa DNA-sekvenssin alukkeista tutkittavaa DNA:ta pitkin. Useasti toistuvat syklit saavat aikaan tutkittavan DNA-kohteen moninkertaisen monistuksen.<sup>2</sup> PCR:ään pohjautuvista menetelmistä tarkastellaan tarkemmin kolmea erilaista menetelmää sekä käydään tarkemmin läpi ja lopuksi käydään läpi PCR-vapaan monistukseen perustuvaa menetelmää, jossa DNA-näytteen monistus voidaan tehdä ilman PCR:ssä vaadittavaa lämpösyklivaihetta.



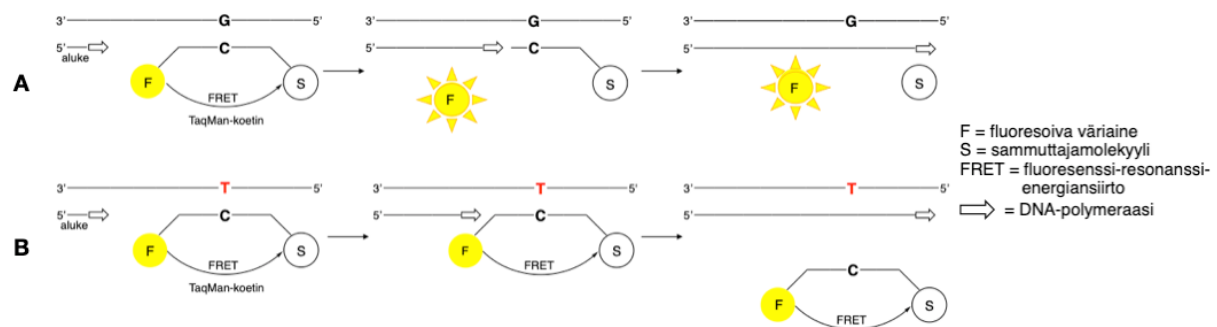
**Kuva 3.** PCR:n toimintaperiaate. A) Denaturointivaihe korkeassa lämpötilassa (94–98 °C), missä kaksijuosteiset DNA-ketjut aukeavat yksijuosteisiksi DNA-ketjuiksi. B) Lämpötilaa lasketaan (55–70 °C), jolloin alukkeiden nukleotidisekvenssit voivat liittyä niihin komplementaarisiin yksijuosteisiin DNA-ketjuihin. C) Alukkeen liittymisen jälkeen tapahtuu



DNA-synteesi lämpötilassa 68–72 °C, jossa DNA-polymeraasi luo yksijuosteiselle DNA:lle alukkeesta alkaen vastinjuosteen. D) A-, B- ja C-kohdan vaiheet toistetaan useina sykleinä riippuen tarvittavan PCR-tuotteen määrästä. Tyypillinen syklimäärä vaihtelee 20–40 välillä. <sup>2</sup> Kuva piirretty BioRender.com

### 3.1.1. TaqMan

TaqMan-menetelmässä käytetään SNP:iden havainnointiin kaksoisleimattua hydrolyysikoetinta, joka on leimattu fluoresoivalla väriaineella. Menetelmän toiminta perustuu DNA:n 5'-päähen kiinnittyneen Taq-entsyymin polymeraasin eksonukleasin aktiivisuuteen. TaqManin hybridisoituessa DNA-sekvenssiin tapahtuu täydellinen pariutuminen, jossa TaqMan-koetin on komplementaarinen DNA-sekvenssille. Tällöin Taq-polymeraasin eksonukleasin toiminta on aktiivista ja Taq-polymeraasin eksonukleasiaktiivisuudella hajotetaan koetin, jolloin muodostuu fluoresenssi-signaali (Kuva 4 A). <sup>6,7</sup> DNA-sekvenssissä oleva SNP estää Taq-polymeraasin eksonukleasin toiminnan, jonka takia koetin ei pysty sitoutumaan täydellisesti DNA-sekvenssiin, jolloin fluoresenssi-signaali pysyy matalana, kun fluoresoivan väriaineen ja sammuttajamolekyylin etäisyys toisiinsa on läheinen (Kuva 4 B). TaqMan-menetelmässä havainnointi tapahtuu PCR:n aikana fluoresoivan alleelispesifisen koettimen avulla. <sup>7</sup>



**Kuva 4.** TaqMan-menetelmän toimintaperiaate. A) Menetelmässä DNA-sekvenssiin spesifisesti sitoutunut TaqMan-koetin korvataan pidentyvällä alukkeella (engl. primer) ja DNA-polymeraasin eksonukleasiaktiivisuus pilkkoo koettimen tuottaen korkean fluoresenssi-signaalin. B) DNA-sekvenssissä olevan SNP estää Taq-polymeraasin eksonukleasiaktiivisuuden, jolloin koetin ei pysty sitoutumaan DNA-sekvenssiin. Tällöin fluoresenssi-signaali pysyy matalana, koska sammuttajamolekyylin ja fluoresoivan väriaineen etäisyys säilyy lyhyenä ja fluoresenssi-signaali sammuu. <sup>8</sup>

TaqMan-menetelmä on yksi ensimmäisiä menetelmiä SNP-genotyypimäärityksille. SNP-genotyypimääritykset voidaan suorittaa päätepiste-PCR:llä tai yhdistämällä päätepiste-PCR ja reaaliaikaisen-PCR. TaqMan-menetelmällä pystytään sekä päätepiste- ja reaaliaikaiseen-PCR:ään. Tämä mahdollistaa automatisoidut SNP-genotyypimääritykset sekä manuaaliset määritykset tuntemattomille näytteille muodostuneiden PCR-sykliden avulla. TaqMan-menetelmän avulla pystytään erottamaan kahden eri alleelin epäspesifiset fluoresenssi-signaalit toisistaan, jotka tuottavat haasteita SNP-genotyypimäärityksien myöhäisessä vaiheessa.<sup>7</sup>

### 3.1.2. Kilpaileva alleelispesifinen –PCR

Kilpaileva alleelispesifinen PCR (engl. competitive allele specific PCR, KASP) on homogeeninen ja fluoresenssipohjainen genotyypimääritysmenetelmä. KASP perustuu alleelispesifiseen oligonukleotidien määrän kasvattamiseen PCR:n avulla. Fluoresenssi-signaalin tuotto tapahtuu fluoresenssi-resonanssi-energiasiirron (FRET) avulla, missä kahta fluoresoivaa koetinta käytetään tunnistamaan alleelispesifiset monistukset yksittäiselle kaksoisalleelille SNP:lle. PCR:n alkuvaiheessa fluoresoivalla väriaineella leimattu oligonukleotidisekvenssit ovat sitoutuneena sammuttajamolekyylillä leimattuihin komplementaarisiiin oligonukleotidisekvensseihin, jolloin fluoresenssi-signaali on alhainen. PCR:n edetessä fluoresoivalla väriaineella leimatut oligonukleotidisekvenssit korvataan pidentyvällä alukkeella, joiden polymeerasin eksonukleaasiaktiivisuus pilkkoo nämä leimatut oligonukleotidisekvenssit, ja havaitaan korkea fluoresenssi-signaali.<sup>9,10</sup> SNP-genotyypimääritykset KASP-menetelmän avulla vaativat kaksi alleelispesifistä aluketta, jossa kummatkin ovat fluoresoivasti leimattuja erilaisilla väriaineilla sekä yhden yhteisen käänteisalukkeen (engl. reverse primer). Tämän jälkeen KASP:n avulla saadaan jokainen tutkittava alleeli monistettua.<sup>11</sup>

KASP-systeemissä voidaan käyttää vain päätepiste-PCR:n avulla näytteen tuottamaa fluoresenssia erottamaan leimatut alleelit, kun taas TaqManissa voidaan käyttää päätepiste-PCR:n lisäksi myös reaaliaikaista-PCR genotyypimäärityksissä, mikä on erittäin tärkeää, jotta pystytään erottamaan kahden eri alleelin tuottamat epäspesifiset fluoresenssi-signaalit toisistaan. Tällöin KASP-menetelmän käyttö SNP-genotyypimäärityksissä on rajoittuneempi, mutta kustannuksiltaan se on halvempi menetelmä kuin TaqMan.<sup>7</sup>

### 3.1.3. Amplifikaatio-refraktorinen mutaatiojärjestelmä –PCR

Amplifikaatio-refraktorinen mutaatiojärjestelmä (engl. amplification-refractory mutation system, ARMS) on klassinen ja vakiintunut PCR-menetelmä SNP-genotyypimäärityksille. Menetelmässä määrityksien periaatteena on käyttää kahta alleelispesifistä aluketta, jotka pystyvät kohdentamaan SNP:t kahteen erilaiseen alleelisekvenssiin.<sup>12</sup> ARMS-PCR-menetelmää voidaan käyttää erilaisten SNP-tyyppien alukespesifisyyden vaikutuksien analysointiin ja eripari emäksien ominaisuuksien tarkasteluun.<sup>13</sup> ARMS-PCR:llä voidaan reaktiosyklissä havaita näytteestä vain yhden mutaation, mikä tekee siitä työlää ja kalliin menetelmän tutkimaan näytteessä olevia erilaisia mutaatioita. Myös menetelmässä tarvittava tutkittavan näytteen pitoisuudet ovat suuret, jolloin menetelmää ei voida käyttää, kun tutkittavaa DNA:ta on rajoitetun määrän.<sup>14</sup> ARMS-PCR-menetelmässä monistussyklien lisääntymisen myötä menetelmän luotettavuus kärsii. Tämän takia sen soveltuvuus kliiniseen käyttöön on vielä erittäin rajoittunut.<sup>15</sup> Menetelmä käyttää päätepiste-PCR:ää ja menetelmän käyttö tutkimuksissa vaatii näytteen jälkikäsittelyä, joka on erittäin työlästä ja aikaa vievää. TaqMan-menetelmää käyttämällä on voitu välttämään ARMS-PCR-menetelmän haasteet, sillä TaqMan on ARMS-PCR:ää herkempi ja nopeampi menetelmä. TaqMan-menetelmässä näytepitoisuudet ovat pienempiä eikä myöskään vaadi tutkittavan näytteen jälkikäsittelyä, jolloin voidaan välttää mahdollinen kontaminaatoriski, ja myös sen takia näytteen määritykset ovat nopeampia kuin ARMS-PCR:llä.<sup>14</sup>

### 3.1.5 Silmukavälitteinen isoterminen monistus

Silmukavälitteisessä isotermisessä monistuksessa (engl. loop-mediated isothermal amplification, LAMP) voidaan haluttu DNA-sekvenssi monistaa ilman PCR:ssä tarvittavaa lämpösykliä. LAMP-menetelmän avulla DNA-alueen replikaatio on erittäin spesifistä ja tehokasta. Määritysajossa lämpötila on vakio koko määritysajan ajan, jolloin menetelmä ei tarvitse kalliita laitteistoja muodostamaan lämpösyklejä. Määrityksessä monistetut tuotteet voidaan havainnoida monilla eri tavoilla, kuten fluoresenssin avulla.<sup>16</sup> Soveltamalla fluoresenssikoetin LAMP-menetelmään on saatu SNP:iden havainnointiherkkyyttä paranneltua.<sup>17</sup>

LAMP-menetelmästä on tullut vaihtoehtoinen menetelmä PCR:ään pohjautuviin menetelmiin, sillä se mahdollistaa yksinkertaisen, edullisen ja nopean tavan DNA-näytteen tutkimiseen. Menetelmällä on onnistuttu tekemään samoja genotyypimäärityksiä havaitsemaan DNA-

näytteissä tapahtuneet mutaatiot kuten TaqManilla. Lisäksi LAMP-menetelmässä näytteenkäsittelyä voidaan tehdä monissa erilaisissa olosuhteissa.<sup>16,18</sup>

## 3.2. Sekvensointimenetelmät

DNA-sekvensointi on menetelmä, jossa selvitetään DNA:n nukleotidisekvenssin emäsjärjestys saadakseen välttämätöntä tietoa geenistä tai genomista. DNA:n nukleotidisekvenssin tunteminen toimii geneettisen toiminnan ymmärtämisen pohjana. Sekvensointimenetelmiä SNP:iden havainnointiin on olemassa monia ja niitä voidaan muokata erilaisilla tavoilla, kuten menetelmässä käytetyn laitteiston, kemian ja erilaisten ohjelmistojen valinnalla voidaan vaikuttaa sekvensoitavan alueen pituuden tarkkuuteen ja toistettavuuteen.<sup>19</sup>

DNA-sekvensointimenetelmiä on useita ja yksi tapa luokitella ne ovat ensimmäisen, toisen ja kolmannen sukupolven DNA-sekvensointimenetelmiin, joista jokaisesta esittelen tarkemmin yhden menetelmän ja niiden soveltuvuudet SNP:iden havainnointiin. Kunkin sukupolven menetelmät ovat kehittyneet edellisen sukupolven pohjalta, kun on ollut tarvetta kehittää ja parantaa vanhoja menetelmiä jatkuvasti luotettavimpien ja tarkempien tutkimustuloksien saavuttamiseksi ja siten lisätä menetelmien sovelluksia DNA:n tutkimiseen.

### 3.2.1. Sangerin sekvensointi

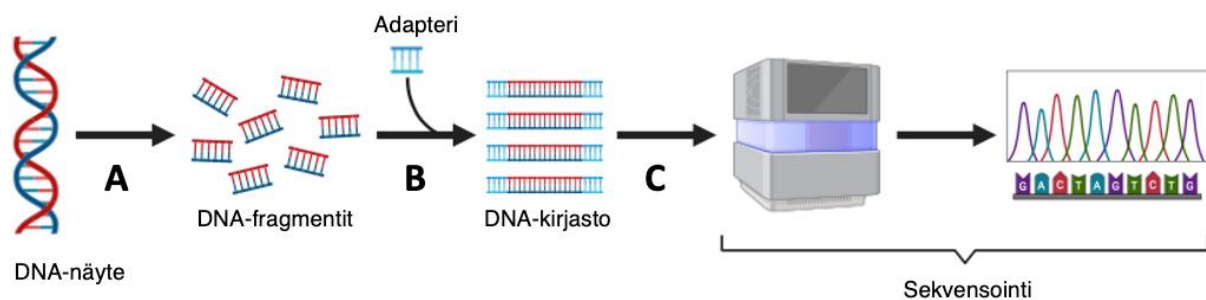
Sangerin sekvensointi (engl. Sanger sequencing) on ensimmäisen sukupolven DNA-sekvensointimenetelmä, joka perustuu selektiivisiin DNA-ketjujen muodostumisen päättymiseen, joita tapahtuu DNA-polymeerasin muodostamien ddNTP:den avulla DNA-replikaation aikana. On olemassa neljä erilaista ddNTP:tä jokaiselle nukleotidille, ja ne ovat fluoresoivalla väriaineella leimattuja.<sup>20</sup> Sekvensointilaitteistossa DNA-sekvenssin havainnointi tapahtuu leimattujen ddNTP:iden tuottamien fluoresenssi-signaalien avulla. Ennen sekvensointia on tarvittaessa PCR-vaihe, jonka avulla voidaan monistaa tutkittavat spesifiset alleelit.<sup>20,21</sup>

Sangerin sekvensointia pidetään SNP:iden havaitsemisen ja tunnistamisen standardimenetelmänä, sillä menetelmä toimii perustana uudemmille ja automatisoiduille menetelmille sekä tuottaa luotettavaa määritystulosta. Menetelmä kuitenkin vaatii kalliita laitteistoja, jonka takia sen käyttökustannukset ovat suuret, ja myös menetelmän eri työvaiheet ovat työläitä ja hitaita.<sup>15</sup> Tämän takia menetelmä ei ole enää kovin käytetty, koska on kehitetty

muita havainnointimenetelmiä, jotka ovat esimerkiksi nopeampia tai kustannukset ovat pienemmät.

### 3.2.2. Seuraavan sukupolven sekvensointi

Seuraavan sukupolven sekvensoinnissa (engl. next generation sequencing, NGS) kokonaiset genomit sekvensoidaan fragmentteina (Kuva 5). Toisen sukupolven NGS-menetelmä on nopea sekä kustannustehokas menetelmä, joka mahdollistaa kattavan geneettisen tiedon saannin. Yksi NGS-menetelmän tärkeimmistä sovelluksista on yksilöiden välisten genomitason variaatioiden havainnointi, kuten tutkittavien näytteiden sisältämien SNP:iden havainnointi.<sup>22,23</sup>



**Kuva 5.** NGS-menetelmän toimintaperiaate. A) DNA-näyte fragmentoidaan eli pilkotaan lyhyiksi DNA-pätkiksi. B) DNA-fragmentteja käsitellään siten, että molempiin päihin liitetään adapterisekvenssi. Adapterisekvenssit ovat synteettisiä tunnettuja oligonukleotidejä. C) Joukko käsiteltyjä DNA-fragmentteja muodostaa DNA-kirjaston. Adapterien välissä olevat DNA-fragmentit ovat tutkittavaa DNA-näytettä, joiden sekvenssien nukleotidimäsjärjestyistä saadaan selville DNA-kirjaston sekvensoinnilla.<sup>24</sup> Kuva piirretty BioRender.com

Kokonaisten genomien sekvensoinnin myötä kaikkien olemassa olevien SNP:iden löytäminen on mahdollista. Menetelmän avulla voidaan yleisesti ilmenevien SNP:iden lisäksi tunnistaa harvinaiset SNP:t. Hyvä kattavuus genomista on edellytys luotettavaan SNP:iden havainnointiin.<sup>25</sup> Genomitason tieto helpottaa tautia aiheuttavien geenien ja sairauksiin liittyvien säätelyelementtien löytämistä. Kohdennettu sekvensointi mahdollistaa tautia aiheuttavan mutaation tunnistamista taudin diagnosointia varten.<sup>24</sup>

### 3.2.3. MinION

MinION-menetelmä on kolmannen sukupolven sekvensointimenetelmä. Menetelmällä sekvensoidaan yksittäisiä DNA- ja RNA-molekyylejä ilman PCR-monistusvaihetta. MinION-sekvensointimenetelmä on virtauspohjainen nanopore-menetelmä, missä DNA-näyte

kulkeutuu nanopore-kalvon läpi, joka läpäisyyttää yhden DNA-molekyylin kerrallaan sähkövirran ja sopivan puskuriliuoksen avulla. Tutkittavan DNA:n virratessa läpi nanopore-kalvosta, jokaisen nukleotidin vaikutus sähkövirtaan voidaan havaita menetelmässä käytettävällä sensorilla. Tutkittavan DNA:n pituus ei ole rajoitteena menetelmän käytölle, koska sekvensointi tapahtuu jatkuvasti jokaiselle huokoselle läpäisevälle DNA-molekyylille. Kuitenkin menetelmän rajoituksena on käyttäjän kyky saada ehjiä ja pitkiä DNA-fragmentteja tutkittavasta kohdealueesta.<sup>26</sup>

MinION-menetelmä mahdollistaa myös pitkien DNA-molekyylien sekvensoinnin.<sup>26</sup> MinION on NGS:tä nopeampi ja edullisempi menetelmä kokonaisten genomien sekvensointiin. Menetelmän etuutena NGS-menetelmään on, että MinION pystyy sekvensoimaan pidempiä DNA-molekyylejä. Myös MinIONilla saadun sekvensointidatan analysointia on kehitetty käyttäjäystävällisemmäksi kuin NGS-datan analysointia. NGS-datan analysointi on aikaa vievää, sillä raakadatan on käytävä useita analyysivaiheita. Tämän takia menetelmän käyttö voi vaatia käyttäjältä bioinformatiikan erityisosaamista saadakseen oikeaa tietoa sekvensointidatasta.<sup>24,27</sup> Yksi MinIONin suurena etuutena toisiin sekvensointimenetelmiin, kuten NGS, on sekvensointilaitteen pienikokoisuus ja mahdollisuus reaaliaikaiseen data-analyysiin. MinION-menetelmän reaaliaikaisen data-analyysi saadaan sekvenssilukemien lukumäärästä sekä DNA-pituuksien jakautumisesta, jonka takia saatujen tietojen analysointiin tarvittava järjestelmä vaatii rajoitetun laskentainfrastruktuurin. Kuitenkin jatkuvan kehityksen sekvensointikemiassa ja ohjelmistojen parannuksilla menetelmän kapasiteettia on saatu parannettua.<sup>26</sup>

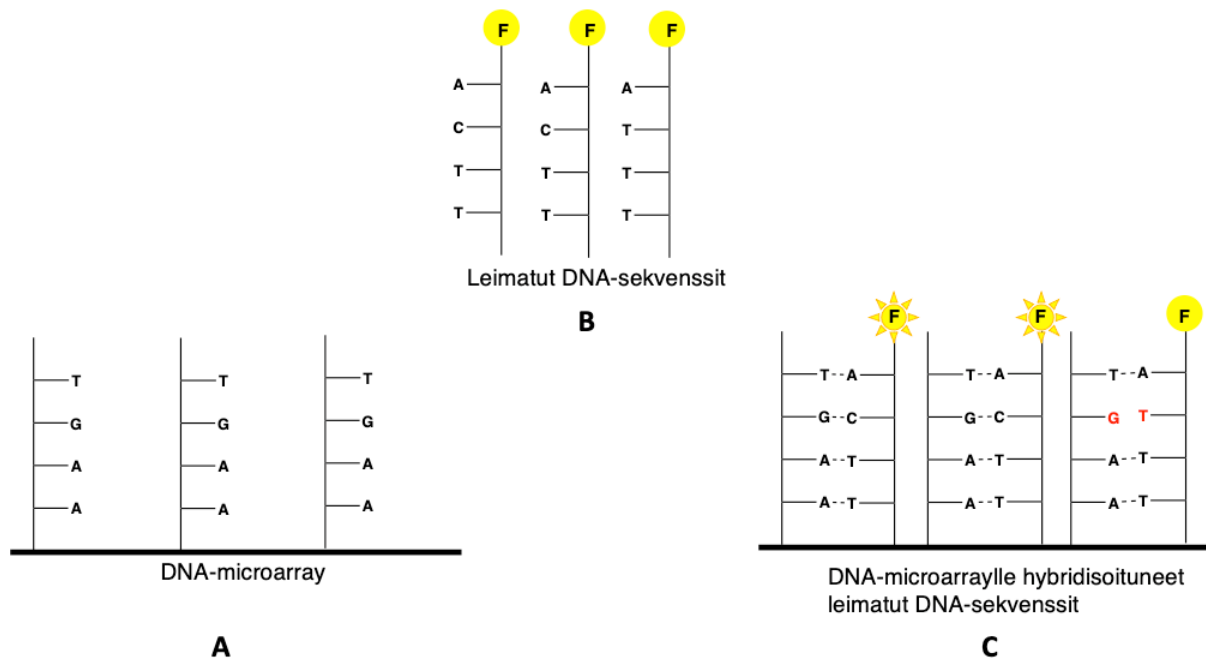
#### 3.2.4. PolyPhred

PolyPhred on automatisoidun PRC-datan käsittelyohjelma. PolyPhredissä sovelletaan kolme eri menetelmää. Nämä kolme menetelmää, joita sovelletaan yhdessä ovat Phred, Phrap ja Consed. PolyPhred-menetelmällä havaitaan fluoresenssipohjaisella sekvensoinnilla yksittäisten heterotsygoottisten nukleotidien substituutioiden olemassaolo PCR-tuotteiden sekvensseissä. PolyPhredissa käytettyä fluoresenssipohjaista sekvensointia voidaan käyttää myös tutkittavien näytteiden uudelleensekvensointiin, jonka takia menetelmä soveltuu DNA:n polymorfismien ja mutaatioiden havainnointiin.<sup>28</sup>

PolyPhred on yleinen menetelmä SNP:iden tunnistamisesta saatujen tietojen uudelleensekvensointiin, koska menetelmällä pystytään havaitsemaan sekvenssissä ilmenevät heterotsygootit ja niiden sijainnit. PolyPhred-menetelmää käytetään ensisijaisesti pienten sekvenssien tietojen analysointiin.<sup>29</sup> Fluoresoivien väriaineiden käyttö menetelmässä antaa paremman tarkkuuden heterotsygoottien tunnistamisessa sekvensseissä. Näiden väriaineiden käyttö olisi hyvä mahdollinen kehitys menetelmään. Menetelmää voitaisiin siten soveltaa paremmin diagnostiikassa, missä hyvä havainnointitarkkuus on välttämätöntä. PolyPhred-menetelmän myötä voidaan tehdä automatisoidusta fluoresenssipohjaisesta uudelleensekvensoinnista käytännöllisempää ja kustannustehokkaampaa SNP:iden havainnointiin moniin biologisiin ja lääketieteellisiin sovelluksiin.<sup>28</sup>

## 4. DNA-microsirumenetelmät

DNA-microsirumenetelmät ovat DNA:n hybridisaatioon perustuvia menetelmiä, missä näyte hybridisoituu DNA-microsiruihin. DNA-microsirumenetelmässä virusysteemin DNA-lastussa kiinnitetään tai syntetisoidaan spesifisiä tunnettuja oligonukleotidisekvenssejä kovalenttisesti tai ei-kovalenttisesti kiinteälle alustalle (Kuva 6 A), mihin tutkittavat DNA-sekvenssit hybridisoituvat. DNA-microsiru koostuu useista tunnetuista oligonukleotidisekvensseistä sekä fluoresoivalla väriaineella leimatuista tutkittavista DNA-näytteen sekvensseistä. DNA-microsirussa käytetyn kiinteän alustan materiaali voi vaihdella käytetystä microsirumenetelmästä. Oligonukleotidisekvenssit toimivat menetelmässä koettimina, mihin tutkittava DNA hybridisoituu sen löydettyä komplementaarisen oligonukleotidisekvenssin (Kuva 6). Koettiin liittynneiden DNA-sekvenssien tuottamien fluoresenssi-signaalien avulla tarkastellaan tutkittavan näytteen DNA:ta, ja yhdellä microsirulla voidaan samanaikaisesti tutkia tuhansia SNP:iden aiheuttamia sekvenssimuutoksia näytteestä.<sup>30</sup>



**Kuva 6.** DNA-microsirin toimintaperiaate. A) Kiinteälle alustalle on kiinnittyneenä tunnetut oligonukleotidisekvenssit, johon tutkittavat DNA-sekvenssit voivat hybridisoitua löydettyään komplementaariset oligonukleotidisekvenssit microsiralustalta. B) Tutkittavat DNA-sekvenssit käsitellään siten, että ne leimataan fluoresoivalla väriaineella. DNA-sekvenssien hybridisoituessa oligonukleotidisekvensseihin voidaan tarkastella muodostuneiden fluoresenssi-signaalien voimakkuutta. C) DNA-sekvensseissä, joissa ei esiinny SNP, hybridisoituvat täydellisesti oligonukleotidisekvensseihin. Hybridisoitumisen jälkeen microsiuru pestään, jolloin täydellisesti hybridisoituneet DNA-sekvenssit tuottavat fluoresenssi-signaalia. SNP:tä sisältävissä DNA-sekvensseissä hybridisoituminen oligonukleotidisekvensseihin on epätäydellistä, jolloin DNA-microsirin pesun aikana suurin osa niistä pestään pois. Tällöin fluoresenssi-signaali on matala.<sup>30</sup>

#### 4.1. Affymetrix-siru

Affymetrix-microsirimenetelmällä voidaan tutkia satoja tuhansia ihmisen SNP:itä. Menetelmässä tutkittava DNA-ketju fragmentoidaan tunnetuista alueista siten, että SNP:t ovat kaukana DNA-fragmenttien päistä. Näytteen DNA-fragmentit monistetaan PCR:n avulla, jonka jälkeen fragmentit leimataan. Käsittelyn jälkeen näyte hybridisoituu microsirulla oleville tunnettuihin koettimiin.<sup>31</sup> Näytteessä olevien DNA-fragmenttien SNP-kohtien tutkimiseen käytetään microsirulla olevia koettimia, jotka ovat DNA-näytteen molemmille alleeleille suunniteltuja 25:n oligonukleotidin pituisia sekvenssejä. Ne ovat suunniteltu komplementaariseksi tutkittavan DNA-sekvenssien kanssa, jolloin DNA pystyy



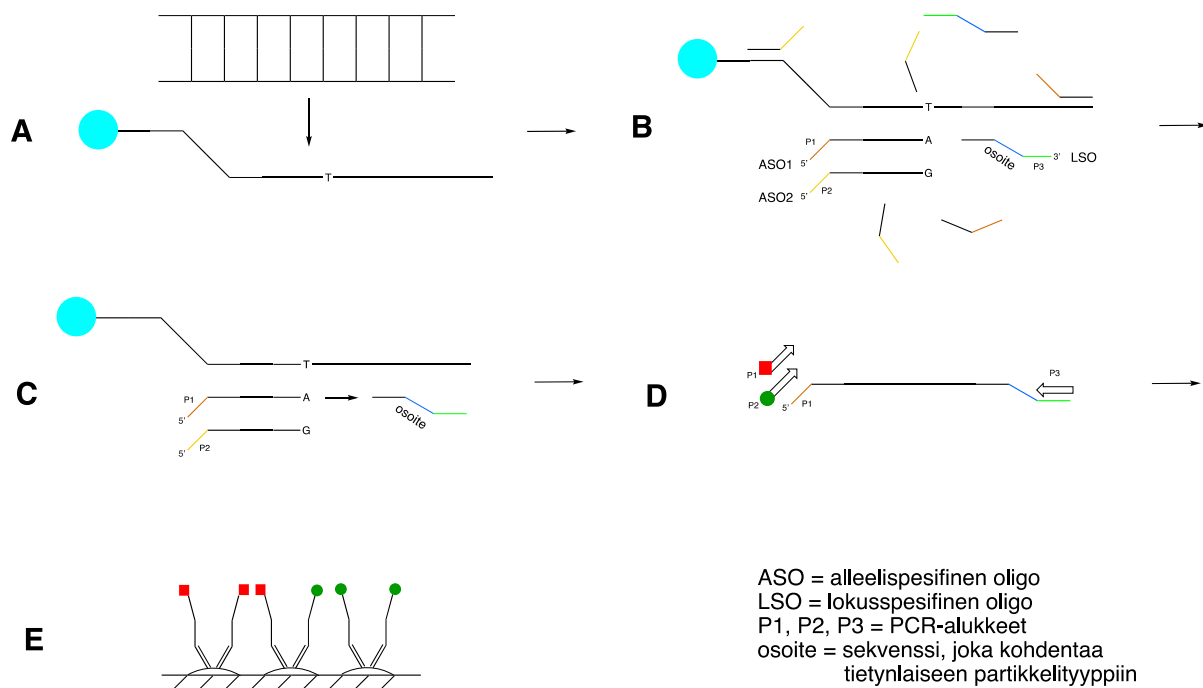
hybridisoitumaan molempiin koettiin riippumatta koettimen kantamasta alleelistä. SNP:n esiintyminen DNA-sekvensseissä havaitaan oligonukleotidisekvenssien hybridisoitumisen perusteella, ja SNP:tä sisältävässä DNA-sekvenssissä hybridisoituminen koettimen oligonukleotidisekvenssiin on epätäydellistä, jolloin fluoresenssi-signaali on matala.<sup>32</sup>

Affymetrix-siru on ensimmäinen kaupallisesti tuotettu sirumenetelmä SNP:iden havainnointia varten, jolla pystyttiin tekemään 1500 SNP:iden genotyyppimäärytyksiä yhdellä sirun DNA-lastulla. Menetelmää on kehitetty jatkuvasti suuremmille näytemäärille, ja nykypäivänä on saatavilla jopa 500 000 (500k) SNP:iden genotyyppimäärytyksiä yhdellä DNA-lastulla. Sirudatan luotettava analysointi vaatii useita määrytyksiä, jonka takia väärin positiivisten tuloksien välttämiseksi yhden määrytyksen merkitsevyytaso on alhainen, jolloin voidaan poissulkea määrytyksissä huonosti toimivat SNP:t.<sup>33</sup>

## 4.2. Illuminan GoldenGate

Illuminan GoldenGate-menetelmä mahdollistaa suuren määrän lokusten multipleksoinnin eli moninkertaistumisen yhden reaktion aikana spesifisen laajennus- ja monistusvaiheen kautta. Menetelmässä DNA-näytettä ei tarvitse monistaa ennen määrytystä, mikä on menetelmän yksi tärkeimmistä eduista.<sup>34</sup>

GoldenGate-sirun kolme oligonukleotidisekvenssiä muokataan kullekin tutkittavan näytesekvenssin SNP-lokukselle komplementaariseksi, siten että kaksi näistä oligonukleotidisekvensseistä ovat spesifisiä SNP-kohdan alleelille, joita kutsutaan alleelispesifisiksi oligoiksi (ASO) ja kolmas oligonukleotidisekvenssi hybridisoituu ASO-kohdasta alaspäin on lokusspesifinen oligo (LSO) (Kuva 7). Sekvenssi on suunniteltu niin, että SNP ja LSO välinen etäisyys on 1–20 emäsparia, jolloin SNP:n havainnointi on tehokkainta eikä LSO:n sitoutuminen häiritse sitä. Hybridisaatioprosessin aikana oligonukleotidisekvenssit hybridisoituvat DNA-näytteen komplementaarisiiin kohtiin sitoutuneisiin paramagneettisiin hiukkasiin. Monistettu GoldenGate-menetelmällä saatu tuote jälleen hybridisoituu toiselle sirulle, kuten Satrix-sirulle, jolloin voidaan analysoida tuotteen tuottamaa fluoresenssi-signaalia.<sup>34</sup>



**Kuva 7.** Illuminan GoldenGate-sirumenetelmän toimintaperiaate. A) Leimattu yksijuosteinen DNA-sekvenssi, jossa sijaitsee SNP. B) Yksijuosteinen DNA-näytteeseen lisätään oligonukleotidejä, johon tutkittava DNA-sekvenssi voi hybridisoitua sen löydettyä komplementaarisen oligonukleotidisekvenssin. Hybridisaation aikana oligonukleotidisekvenssit hybridisoituvat tutkittavan DNA-näytteen komplementaarisiiin kohtiin sitoutuneisiin paramagneettisiin hiukkasiin (B) ja pestään ylimääräiset ja epätäydellisesti hybridisoituneet oligonukleotidisekvenssit (C). Tämän jälkeen tapahtuu alleelispesifinen laajennus- ja ligaatiovaihe. D) Laajennus- ja ligaatiovaiheen jälkeinen tuote leimataan fluoresoivalla väriaineella ja monistetaan PCR:n avulla siten, että DNA-sekvenssi esiintyy näytteessä yksijuosteisena. E) Fluoresoivalla väriaineella leimatut ja monistetut yksijuosteiset DNA-sekvenssit hybridisoituvat Sentrix-sirulle, jolloin voidaan tutkia näytteen tuottamaa fluoresenssi-signaalia.<sup>34</sup>

### 4.3. Alukelaajennus

Alukelaajennus (engl. arrayed primer extension, APEX) on minisekvensointimicrosirumenetelmä, joka perustuu kaksikulotteisiin oligonukleotidikoettimiin. APEX-menetelmässä käytettyjen koettimien oligonukleotidien 5'-päätä muokataan, jolloin ne sitoutuvat kovalenttisesti microsirun lasialustaan. Oligonukleotidikoettimet on suunniteltu sitoutumaan täydellisesti näytteen DNA-sekvensseihin jättäen tutkittavat SNP:t vapaiksi, joka mahdollistaa hybridisaation koettimien komplementaaristen oligonukleotidien kanssa. Kaikkia

neljää erilaista ddNTP-fragmenttia muokataan neljällä eri fluoroforilla, jolloin jokainen fragmentti hybridisoituu niille spesifisiin koettimiin microsiruialustalla. Tämän jälkeen DNA-polymeraasin eksonukleaasi pidentää hybridisoituneita sekvenssejä SNP-kohdista alkaen, sillä ne ovat komplementaarisia käsiteltyjen ddNTP-fragmenttien kanssa. Tällöin jokaiselle emäkselle spesifinen fluoresoiva väriaineen havainnointi antaa tietoa tutkittavista SNP:istä. Samalla alustalla voidaan tehdä erilaisia SNP:iden rinnakkaisanalyysiä erilaisten microsiruialustalla käytettyjen oligonukleotidien havainnoinnin avulla.<sup>35,36</sup> Affymetrixin ja Illuminan määrytykset kestävät useita tunteja, jotta tutkittavat DNA-sekvenssit hybridisoituvat sirusysteemiin, joten APEX verrattuna Affymetrixin ja Illuminan on huomattavasti nopeampi määrytysmenetelmä, sillä määrytykset kestävät vain 20 minuuttia.<sup>37</sup>

#### 4.4. Infiniumin koko genomien genotyypimäärytykset

Infiniumin koko genomien genotyypimäärytykset (engl. whole-genome genotyping, WGG) on yksinkertainen ja vakaa menetelmä genomilaajuisiin määrytyksiin.<sup>38</sup> Menetelmä perustuu alleelispesifiseen hybridisaatioon, johon on yhdistettynä genomisen DNA:n alukelaajennus (engl. allele-specific primer extension, ASPE) tai yhden emäksen laajennus (engl. single base extension, SBE). ASPE:ssä käytetään kahdenlaisia partikkeleita (engl. beads) yhtä SNP:tä varten. Nämä partikkelit ovat leimattu samalla fluoresoivalla väriaineella. SBE:ssä käytetään yhdenlaisia partikkeleita yhtä SNP:tä kohti, joka on leimattu kahdella erilaisella fluoresoivalla väriaineella.<sup>38,39</sup>

Menetelmässä käytetty koetin koostuu 80:n emäksen oligonukleotidisekvensseistä, joiden 5'-päätt ovat muokattu siten, että ensimmäiset 30 emästä kiinnittyvät tutkittavaan näytteeseen. Loput 50 emästä muodostavat ensin sekvenssin, johon SNP:tä sisältävä tutkittavan näytteen sekvenssin pystyy hybridisoitumaan sen löytäessä komplementaarisen oligonukleotidisekvenssin. Hybridisaation jälkeen tapahtuu alukkeen laajennus menetelmässä valitun ASPE:n tai SBE:n kautta, mikä luo alleelisen erottelun liitetyn alukkeen koetinsekvenssin DNA-polymeraasin pidennysvaiheessa. Tällöin koetinsekvenssien tietyissä partikkeleissa pidennetään ja leimataan vain niiden hybridisoituessaan täydellisesti komplementaarisiin sekvensseihin. Tämän jälkeen näytteestä tutkitaan menetelmän samalta valmistajalta tarjoamalla data-analysointiohjelmalla, kuten Illuminan GenCall-ohjelmalla, partikkeleiden tuottamien fluoresoivan-signaalien välistä intensiteettisuhdetta, jossa verrataan

suuressa näytemäärässä olevien koettimien intensiteettisuhdetta näytteen sisältämien erilaisten alleelien välillä.<sup>38,40</sup>

## 5. Muita havainnointimenetelmiä

PCR:ään, sekvensointiin ja microsiruun pohjautuvien havainnointimenetelmien lisäksi on useita muita menetelmiä tutkia SNP:itä. Muita havainnointimenetelmiä ovat muun muassa massaspektrometriaan, korkean erotuskyvyn nestekromatografiaan ja lämpökäyriin perustuvia. Osa näistä menetelmistä voidaan käyttää edeltävien menetelmien sijasta, kun halutaan tutkia SNP:itä ilman fluoresoivia leima-aineita.

### 5.1. Matriisiavusteinen laserdesorptioionisaatio

#### lentoaikamassaspektrometria

Matriisiavusteinen laserdesorptioionisaatio lentoaikamassaspektrometria (engl. matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS) on menetelmä, jolla tutkitaan biomolekyylejä. Menetelmän MALDI-osassa biomolekyylit upotetaan matriisiin, joka sisältää aromaattisia yhdisteitä, joiden tunnusomaisena ominaisuutena on niiden alhainen molekyylipaino. Menetelmässä laserin käyttö tietyllä aallonpituudella saa aikaan molekyylien desorption ja ionisaation. Desorptoituneet ja ionisoituneet molekyylit kiihdytetään sähkökentässä lentoaikalaitteessa (TOF), jolloin näytteen molekyylien massavaraussuhteet lasketaan lentoaikalaitteen putken päässä olevalla detektorilla.<sup>41</sup>

Menetelmässä näytteiden määritykset ovat nopeita, jonka takia voidaan tuhansia näytteitä määrittää päivässä ja näitä määrityksiä on mahdollista automatisoida.<sup>42</sup> Menetelmä on herkkä emäsvaihdoksien havainnointiin homotsygooteissa sekä heterotsygooteissa, jolloin massaspektrometrin tuottamat signaalit ovat tarkkoja ja niiden signaali-kohinasuhteet ovat korkeita. Tämä johtaa siihen, että menetelmän antamat väärät signaalit ovat alhaiset.<sup>43</sup> Toisin kuin monet muut hybridisaatioon perustuvat genotyypimääritystekniikat, MALDI-TOF MS avulla molekyylien molekyyli-massat saadaan suoraan mitattua. Menetelmä tarjoaa siis joustavan ja erittäin spesifisen lähestymistavan SNP:iden havainnointiin ja analysointiin.<sup>44</sup> MALDI-TOF MS:llä tehdyt määritykset ei vaadi valmistajan tehtyjä templaatteja, kuten esimerkiksi DNA-microsiruissa, tällöin MALDI-TOF MS -menetelmää voidaan vapaasti muokata ja mukauttaa tutkittavien SNP:iden havaitsemiseksi.<sup>45</sup>

## 5.2. Denaturoiva korkean erotuskyvyn nestekromatografia

Denaturoiva korkean erotuskyvyn nestekromatografiaa (engl. denaturing high performance liquid chromatography, dHPLC) käytetään usein yhdessä PCR:n kanssa, sillä näytettä pitää usein monistaa ennen kuin dHPLC-menetelmää käytetään SNP:iden analysointiin.<sup>46</sup> SNP:iden havainnointi dHPLC-menetelmässä perustuu DNA:n erilaisiin termodynaamisiin ominaisuuksiin. Periaatteena on heterodupleksi-DNA:n havainnointi PCR-tuotteesta, joka on heterotsygoottinen sekvenssimuunnokselle. Näiden heterodupleksien havainnointiherkkyys on riippuvainen dHPLC:ssä käytetyn kolonnin lämpötilasta. Kolonnin lämpötilaa pidetään vakiona määrittämisen ajan, jotta SNP:tä sisältävä heterodupleksi-DNA on havaittavissa. Optimilämpötila SNP:iden havainnoinnille on lämpötila, jossa puolet näytteestä olevat DNA:t ovat yksijuosteisena ja loput puolet ovat kaksijuosteisena tai sen sulamispisteessä, jossa kaksijuosteinen DNA aukeaa yksijuosteiseksi DNA:ksi.<sup>47</sup>

dHPLC:stä on tullut hyödyllinen menetelmä SNP:iden tunnistamiseen. Menetelmässä kuitenkin määritykset tehdään yksi määrittysajo kerrallaan, jolloin menetelmä ei ole erittäin tehokas tapa tehdä suurten näytemäärien genotyypimäärityksiä. On kuitenkin tehty lukuisia tutkimuksia dHPLC:n tarkkuudesta ja herkkyydestä DNA-mutaatioiden havaitsemisessa, ja menetelmän on osoitettu olevan luotettava polymorfisten geenien analysoinnissa.<sup>46</sup>

## 5.3. Korkea resoluutio sulamisanalyysi

Korkea resoluutio sulamisanalyysi (HRMA) on post-PCR-menetelmä, jossa kaksijuosteiset PCR-tuotteet altistetaan kasvavalle lämpötilalle käyttäen reaaliaikaisia PCR-laitteistoja. Menetelmässä lämpötilaa lasketaan PCR-reaktion jälkeen, jotta yksijuosteinen DNA pariutuisi kaksijuosteiseksi ennen kuin lämpötilaa nostetaan jälleen, jolloin kaksijuosteinen DNA aukeaa erilleen yksijuosteisiksi. Tutkittavaan näytteeseen lisätään fluoresoiva väriaine, joka sitoutuu kaksijuosteiseen DNA:han, mutta ei yksijuosteiseen DNA:han. Fluoresoivan väriaineen erottuminen kaksijuosteisesta DNA:sta johtaa fluoresenssi-signaalin laskuun, jonka takia fluoresenssi on verrannollinen näytteen jäljellä olevaan kaksijuosteisen DNA:n määrään. Fluoresenssi-signaalin intensiteetti suhteessa lämpötilaan vaihtelevien lämpötilavaiheiden alueella saadaan määritettyä tutkittavan DNA-näytteen juosteille sulamiskäyrät, ja näytteen DNA-juosteiden fluoresenssi-signaalien intensiteetti muutokset ovat verrattavissa vertailuprofiiliin, joka sisältää tunnettujen DNA-juosteiden sulamiskäyrät, jolloin on mahdollista tarkasti määrittää tutkittavien juosteiden sulamislämpötilat.<sup>48,49</sup>

HRMA on suljettu, yhden putken määrittäminen, jolloin näytettä ei tarvitse siirtää useisiin putkiin, ja näin voidaan välttää mahdollinen PRC:n jälkeen tapahtuva kontaminaatoriski. Määrittämisessä luotettavimmat tulokset saadaan, kun SNP:tä sisältävien sekvenssien välillä olevat sulamislämpötilaerot ovat selkeät.<sup>48</sup> HRMA:lla on monia käyttökohteita, kuten mutaatioiden havainnointi ja yksittäiset SNP-genotyypin määritykset. Hyvistä suorituksista huolimatta HRMA:lla ei ole toistaiseksi saatu käyttöön laajamittaisissa SNP-genotyypin tutkimuksissa, mikä johtuu menetelmän rajoituksista erottaen kahta homotsygotiprofiilia toisistaan, kun niiden sulamislämpötilaerot ovat pienet.<sup>50</sup>

## 6. Johtopäätökset ja yhteenveto

SNP:t ovat yksi yleisimmistä mutaatiomuodoista, joita esiintyy ihmisten keskuudessa. Niiden havaitseminen on tärkeässä roolissa monissa erilaisissa sovelluksissa, kuten sairauksien ennustamisessa, ehkäisyssä ja diagnosoinnissa, potilaiden lääkeväesteen tutkimuksissa ja geenitutkimuksissa. Perinnöllisen materiaalin ymmärtäminen on tärkeää havainnointimenetelmän valinnassa sekä tulosten tulkinnassa. Tämän takia on ymmärrettävää, että jokaisella menetelmällä on omat rajoituksensa DNA-tutkimuksissa. Menetelmän valinta riippuu tutkimuksen erityisvaatimuksista, ja on otettava huomioon tarvittavan geneettisen tiedon tarkkuus, tutkittavien näytteiden määrä, näytteen esi- ja jälkikäsitelyvaiheet, erilaisten laitteiden ja ohjelmistojen analyysikyvyt sekä lopuksi taloudelliset rajoitteet. Havainnointimenetelmän tulee tarjota hyvän tasapainoin tutkitun näytteen tarvittavan tiedon kattavuuden ja herkkyyden välillä, joka sopii parhaiten näytteen geneettisen tutkimuksen tarkoitukseen. Tällöin voidaan parantaa SNP-havainnoinnin kestävyyttä ja tarkkuutta, kun tiedetään menetelmän vahvuudet kattavan geneettisen analyysin saavuttamiseksi.

PCR-menetelmät tarjoavat spesifisen ja tarkan tavan pienten näytemäärien olevien SNP:iden havainnointiin. Näiden menetelmien rajoituksena on vain entuudestaan tunnettujen SNP:iden havainnointi näytteestä, sillä menetelmät vaativat tarkan alukkeen suunnittelun, jotta havainnointi olisi mahdollista. PCR:ää käytetään myös osana useissa muissa menetelmissä näytemäärien monistuksessa. Sekvensointimenetelmät puolestaan soveltuvat koko genomin tai tietyn halutun alueen analyysiin, ja ne tarjoavat kattavan analyysin tunnettujen sekä uusien SNP:iden tunnistamisen. Sekvensointiin pohjautuvat menetelmät ovat määritysajoiltaan

PCR:iä nopeampia, mutta sekvensointidatan analysointi edellyttää käyttäjältä kehittyntä bioinformatiikan osaamista. PCR:ään ja sekvensointiin verrattuna suurin etu DNA-microsirumenetelmissä ovat niiden mahdollisuudet tehdä samanaikaisesti suurien näyttemäärien määrityksiä. Kuitenkin määritysherkyys ovat PCR:ää ja sekvensointia heikkomat ja määritykset rajoittuvat sirusysteemissä oleviin ennalta määriteltyihin oligonukleotidisekvensseihin. Tällöin uusien SNP:iden tunnistaminen ei ole mahdollista DNA-microsirumenetelmillä.

Kaikissa menetelmissä on edelleen omat haasteensa, ja jatkuva suuri haaste on menetelmien korkeat käyttökustannukset, mikä rajoittaa niiden käyttöä. Kuten PCR:ssä, menetelmät eivät ole itsessään erittäin kalliita, mutta tarvittavat laitteistot ovat puolestaan hyvin kalliita. Sekvensointimenetelmät ovat PCR:iä kalliimpi, mutta ne tarjoavat kattavampaa tietoa SNP:iden havainnointiin, mikä tekee niistä kuitenkin kustannustehokkaan laajamittaisissa tutkimuksissa tai kun tarvitaan yksityiskohtaista geneettistä tietoa. DNA-microsirut puolestaan tarjoavat kustannustehokkaan tavan laajamittaiseen SNP-genotyypimääritykseen, etenkin kun käsitellään suuria määriä SNP:itä näytteestä.

Kaikki yllä esitellyistä menetelmistä ovat kaupallisesti saatavilla, mutta näitä havainnointimenetelmiä ja muita tekniikoita kehitetään jatkuvasti, sillä menetelmistä pyritään tekemään kustannustehokkaampia, jotta ne olisivat laajemmin käytössä. Mahdollinen tapa saada käyttökustannukset alhaisemmaksi on automatisoida määritykset, jolloin voidaan vähentää työvoimakustannukset menetelmissä ja tehdä enemmän määrityksiä samanaikaisesti. Kaikissa mainituissa menetelmissä käytettyjen teknologian ja data-analysoinnin kehittäminen tehokkaammaksi voidaan saada menetelmien kustannukset alhaisemmaksi. Myös jatkuva yleinen kehityksen kohteena monissa menetelmissä ovat näytteen kapasiteettien kasvattaminen määrityksissä sekä menetelmien herkkyuden kasvattaminen, jotta SNP:iden havainnointi olisi entistä tarkempaa ja luotettavampaa.

## Viitteet

1. Minchin, S. & Lodge, J. Understanding biochemistry: structure and function of nucleic acids. in *UNDERSTANDING BIOCHEMISTRY 5* vol. 63 433–456 (PORTLAND PRESS LTD, 5TH FL, 90 HIGH HOLBORN, LONDON, WC1V 6LJ, ENGLAND, 2019).
2. Kockum, I., Huang, J. & Stridh, P. Overview of Genotyping Technologies and Methods. *Curr Protoc* **3**, (2023).
3. Yang, S., Gill, R. A., Zaman, Q. U. & Ulhassan Zaid and Zhou, W. Insights on SNP types, detection methods and their utilization in Brassica species: Recent progress and future perspectives. *J Biotechnol* **324**, 11–20 (2020).
4. Sun, Y. *et al.* Real-time fluorescence ligase chain reaction for sensitive detection of single nucleotide polymorphism based on fluorescence resonance energy transfer. *Biosens Bioelectron* **74**, 705–710 (2015).
5. Xu, Y. *et al.* An effective method based on real time fluorescence quenching for single nucleotide polymorphism detection. *J Biotechnol* **186**, 156–161 (2014).
6. Daum, L. T. *et al.* Comparison of TaqMan™ and Epoch Dark Quenchers™ during real-time reverse transcription PCR. *Mol Cell Probes* **18**, 207–209 (2004).
7. Broccanello, C. *et al.* Comparison of three PCR-based assays for SNP genotyping in plants. *Plant Methods* **14**, (2018).
8. Nakatani, K. Chemistry challenges in SNP typing. *CHEMBIOCHEM* **5**, 1623–1633 (2004).
9. Semagn, K., Babu, R., Hearne, S. & Olsen, M. Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): overview of the technology and its application in crop improvement. *MOLECULAR BREEDING* **33**, 1–14 (2014).
10. Alvarez-Fernandez, A. *et al.* KASP: a genotyping method to rapid identification of resistance in Plasmodium falciparum. *Malar J* **20**, (2021).
11. de Wouw, A. P. *et al.* Molecular Markers for Identifying Resistance Genes in *Brassica napus*. *AGRONOMY-BASEL* **12**, (2022).
12. Zhang, R. *et al.* A new approach to detect a set of SNP-SNP markers: Combining ARMS-PCR with SNaPshot technology. *Electrophoresis* **41**, 1189–1197 (2020).
13. Han, E.-H. *et al.* Molecular marker analysis of *Cynanchum wilfordii* and *C-auriculatum* using the simple ARMS-PCR method with mismatched primers. *Plant Biotechnol Rep* **11**, 127–133 (2017).
14. Teh, L.-K., Lee, T.-Y., Tan, J. A. M. A., Lai, M.-I. & George, E. The use of Taqman genotyping assays for rapid confirmation of  $\beta$ -thalassaemia mutations in the Malays: accurate diagnosis with low DNA concentrations. *Int J Lab Hematol* **37**, 79–89 (2015).
15. Li, B. *et al.* Universal probe-based intermediate primer-triggered qPCR (UPIP-qPCR) for SNP genotyping. *BMC Genomics* **22**, (2021).
16. Atceken, N., Alseed, M. M., Dabbagh Sajjad Rahmani and Yetisen, A. K. & Tasoglu, S. Point-of-Care Diagnostic Platforms for Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Adv Eng Mater* **25**, (2023).
17. Hyman, L. B., Christopher, C. R. & Romero, P. A. Competitive SNP-LAMP probes for rapid and robust single-nucleotide polymorphism detection. *CELL REPORTS METHODS* **2**, (2022).
18. Higgins, O. & Smith, T. J. Loop-Primer Endonuclease Cleavage-Loop-Mediated Isothermal Amplification Technology for Multiplex Pathogen Detection and Single-Nucleotide Polymorphism Identification. *JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS* **22**, 640–651 (2020).



19. Phillips, K. A. *et al.* Genomic Sequencing: Assessing The Health Care System, Policy, And Big-Data Implications. *Health Aff* **33**, 1246–1253 (2014).
20. Belhassan, K. & Granadillo, J. L. Chapter 2 - Current approaches to genetic testing in pediatric disease. in *Biochemical and Molecular Basis of Pediatric Disease (Fifth Edition)* (eds. Dietzen, D., Bennett, M., Wong, E. & Haymond, S.) 15–36 (Academic Press, 2021). doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817962-8.00017-2.
21. Chapter 2 - Techniques for Oral Microbiology. in *Atlas of Oral Microbiology* (eds. Zhou, X. & Li, Y.) 15–40 (Academic Press, Oxford, 2015). doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802234-4.00002-1.
22. Wei, L., Xiao, M., Hayward, A. & Fu, D. Applications and challenges of next-generation sequencing in *Brassica* species. *Planta* **238**, 1005–1024 (2013).
23. Xu, Y. *et al.* BM-SNP: A Bayesian Model for SNP Calling Using High Throughput Sequencing Data. *IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform* **11**, 1038–1044 (2014).
24. Grada, A. & Weinbrecht, K. Next-Generation Sequencing: Methodology and Application. *JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY* **133**, E1–E4 (2013).
25. Mielczarek, M. & Szyda, J. Review of alignment and SNP calling algorithms for next-generation sequencing data. *J Appl Genet* **57**, 71–79 (2016).
26. Wasswa, F. B., Kassaza, K., Nielsen, K. & Bazira, J. MinION Whole-Genome Sequencing in Resource-Limited Settings: Challenges and Opportunities. *Curr Clin Microbiol Rep* **9**, 52–59 (2022).
27. Tabata, Y., Matsuo, Y., Fujii, Y., Ohta, A. & Hirota, K. Rapid detection of single nucleotide polymorphisms using the MinION nanopore sequencer: a feasibility study for perioperative precision medicine. *JA Clin Rep* **8**, (2022).
28. Nickerson, D. A., Tobe, V. O. & Taylor, S. L. PolyPhred: Automating the detection and genotyping of single nucleotide substitutions using fluorescence-based resequencing. *Nucleic Acids Res* **25**, 2745–2751 (1997).
29. Matukumalli, L. K. *et al.* Application of machine learning in SNP discovery. *BMC Bioinformatics* **7**, (2006).
30. Bumgarner, R. Overview of dna microarrays: Types, applications, and their future. *Curr Protoc Mol Biol* (2013) doi:10.1002/0471142727.mb2201s101.
31. Carvalho, B., Bengtsson, H., Speed, T. P. & Irizarry, R. A. Exploration, normalization, and genotype calls of high-density oligonucleotide SNP array data. *BIOSTATISTICS* **8**, 485–499 (2007).
32. LaFramboise, T. Single nucleotide polymorphism arrays: a decade of biological, computational and technological advances. *Nucleic Acids Res* **37**, 4181–4193 (2009).
33. Lamy, P., Andersen, C. L., Wikman, F. P. & Wiuf, C. Genotyping and annotation of Affymetrix SNP arrays. *Nucleic Acids Res* **34**, (2006).
34. Shen, R. *et al.* High-throughput SNP genotyping on universal bead arrays. *MUTATION RESEARCH-FUNDAMENTAL AND MOLECULAR MECHANISMS OF MUTAGENESIS* **573**, 70–82 (2005).
35. Marasso, S. L. *et al.* APEX protocol implementation on a lab-on-a-chip for SNPs detection. *Microelectron Eng* **85**, 1326–1329 (2008).
36. Podder, M., Ruan, J., Tripp, B. W., Chu, Z. E. & Tebbutt, S. J. Robust SNP genotyping by multiplex PCR and arrayed primer extension. *BMC Med Genomics* **1**, (2008).
37. Podder, M., Welch, W. J., Zamar, R. H. & Tebbutt, S. J. Dynamic variable selection in SNP genotype autocalling from APEX microarray data. *BMC Bioinformatics* **7**, (2006).
38. Gunderson, K. L. *et al.* Whole-genome genotyping. in *DNA MICROARRAYS PART A: ARRAY PLATFORMS AND WET-BENCH PROTOCOLS* (eds. Kimmel, A. & Oliver, B.) vol. 410 359+ (ELSEVIER ACADEMIC PRESS INC, 525 B STREET, SUITE 1900, SAN DIEGO, CA 92101-4495 USA, 2006).

39. Staaf, J. *et al.* Normalization of Illumina Infinium whole-genome SNP data improves copy number estimates and allelic intensity ratios. *BMC Bioinformatics* **9**, (2008).
40. Gunderson, K. L., Steemers, F. J., Lee, G., Mendoza, L. G. & Chee, M. S. A genome-wide scalable SNP genotyping assay using microarray technology. *Nat Genet* **37**, 549–554 (2005).
41. Richter, D. *et al.* MALDI-TOF mass spectrometry screening of cholelithiasis risk markers in the gene of *HNF1alpha*. *J Proteomics* **75**, 3386–3399 (2012).
42. Hahner, S., Kostrzewa, M., Wenzel, T. & Fröhlich, T. Strategies for SNP genotyping by mass spectrometry. in *PROGRESS IN FORENSIC GENETICS 9* (eds. Brinkman, B. & Carracedo, A.) vol. 1239 11–16 (ELSEVIER SCIENCE BV, SARA BURGERHARTSTRAAT 25, PO BOX 211, 1000 AE AMSTERDAM, NETHERLANDS, 2003).
43. Stanssens, P. *et al.* High-throughput MALDI-TOF discovery of genomic sequence polymorphisms. *Genome Res* **14**, 126–133 (2004).
44. Blievernicht, J. K. *et al.* MALDI-TOF mass spectrometry for multiplex genotyping of *CYP2B6* single-nucleotide polymorphisms. *Clin Chem* **53**, 24–33 (2007).
45. Tanaka, M., Kamada, I., Takahashi, J., Kimura, T. & Tani, Y. Genotyping of the *ABCG2* gene using Matrix-Associated Laser Desorption/Ionisation, Time-of-Flight Mass Spectrometry. *TRANSFUSION MEDICINE* **28**, 255–260 (2018).
46. Westley, I. S. *et al.* A PRIMER EXTENSION DENATURING HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD FOR THE IDENTIFICATION OF THREE *ABCC2* GENETIC POLYMORPHISMS. *J Liq Chromatogr Relat Technol* **37**, 1249–1256 (2014).
47. Rudolph, J. G. *et al.* Determination of melting temperature for variant detection using dHPLC: A comparison between an empirical approach and DNA melting prediction software. *Genet Test* **6**, 169–176 (2002).
48. Mehta, B., Daniel, R. & McNevin, D. HRM and SNaPshot as alternative forensic SNP genotyping methods. *Forensic Sci Med Pathol* **13**, 293–301 (2017).
49. Shang, Z., Zhu, Y., Guo, X. & Zhao, M. Identification of Polymorphic Markers by High-Resolution Melting (HRM) Assay for High-Throughput SNP Genotyping in Maize. *PHYTON-INTERNATIONAL JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY* **90**, 1711–1725 (2021).
50. Martino, A., Mancuso, T. & Rossi, A. M. Application of High-Resolution Melting to Large-Scale, High-Throughput SNP Genotyping: A Comparison with the TaqMan® Method. *J Biomol Screen* **15**, 623–629 (2010).