



**TEKNIikka JA LIIKENNE**

**Laboratorioalan koulutusohjelma**

**OPINNÄYTETYÖ**

**GENOMISTEN MENETELMIEN KEHITYS JA OPTIMOINTI VERKKOPERHOSEN (*Melittaea cinxia*) SNP- JA MIKROSATELLIITTIMARKKEREIDEN MÄÄRITTÄMISEEN**

**Työn tekijä: Annukka Ruokolainen  
Työn ohjaaja: Arja Miettinen-Oinonen  
Työpaikkaohjaaja: Mikko Frilander**

**Työ hyväksytty: \_\_. \_\_. 2008**

**Arja Miettinen-Oinonen  
Yliopettaja**



## **ALKULAUSE**

Tämä opinnäytetyö tehtiin Helsingin yliopiston Biotekniikan Instituutin ja bio- sekä ympäristötieteiden laitoksen yhteistyöprojektissa. Ensimmäiseksi haluan kiittää Prof. Ilkka Hanskia ja Dos. Mikko Frilanderia mahdollisuudesta tehdä tämä opinnäytetyöni heidän tutkimusryhmissään. Tämän opinnäytetyön kokeellinen osuus suoritettiin pääosin Mikko Frilanderin laboratoriossa ja haluankin kiittää häneltä saamastani käytännön työn ohjauksesta ja hyvistä vinkeistä. Koko tutkimusryhmän henkilökunta oli avuliasta ja he loivat mukavan työilmapiirin. Kiitos myös toht. Christopher Wheat, laboratorioteknikko Toshka Nyman ja Eeva-Marja Turkki sekä MegaBace-yksikön henkilökunta. Tämän opinnäytetyön ohjaajana toimi koulun puolelta yliopettaja Arja Miettinen-Oinonen ja haluankin kiittää myös häntä hyvästä ohjauksesta ja kannustuksesta.

Helsingissä 26.11.2008

Annukka Ruokolainen

## OPINNÄYTETYÖN TIIVISTELMÄ

<b>Työn tekijä:</b> Annukka Ruokolainen	
<b>Työn nimi:</b> Genomisten menetelmien kehitys ja optimointi verkkoperhosen ( <i>Melitaea cinxia</i> ) SNP- ja mikrosatelliittimarkkereiden määrittämiseen	
<b>Päivämäärä:</b> 19.11.2008	<b>Sivumäärä:</b> 43 s. + 6 liitettä
<b>Koulutusohjelma:</b> Laboratorioala	<b>Ammatillinen suuntautuminen:</b> Tutkimuspainotteinen
<b>Työn ohjaaja:</b> Arja Miettinen-Oinonen	
<b>Työpaikkaohjaaja:</b> Mikko Frilander	
<p>Verkkoperhosesta on tullut viime vuosikymmenenä tärkeä metapopulaatiobiologian malliorganismi. Sen geenitason monimuotoisuuden tutkimusta on kuitenkin vaikeuttanut sekvenssiedon ja kustannustehokkaiden genotyypitysmenetelmien puuttuminen. Tässä opinnäytetyössä pyrittiin optimoimaan jo käytössä olleita verkkoperhosen SNP-analyysimenetelmiä ja toisaalta testaamaan vaihtoehtoisia genotyypitysmenetelmiä. Opinnäytetyö tehtiin osana Helsingin yliopiston metapopulaatiobiologian laajaa verkkoperhosen tutkimushanketta, joka keskittyy Ahvenanmaan hyvin tunnettuun metapopulaatioon.</p> <p>Työn ensimmäisessä osassa keskityttiin verkkoperhosen <i>PGI</i>-geenin kolmen tunnetun SNP-markkerin genotyypitykseen. Tarkoituksena oli optimoida näiden markkereiden PCR-monistus. Tehokas monistuminen on edellytyksenä SnuPe-minisekvensointi-tekniikalla tehtävään genotyypitykseen. Lisäksi tälle geenille kokeiltiin vaihtoehtoisia qPCR-pohjaisia genotyypitysmenetelmiä, SimpleProbe- ja HybProbe-tekniikoilla. Työn toisessa osassa karakterisoitiin uusia SNP- ja mikrosatelliittilokuksia SnuPe-minisekvensointi-tekniikalla. Tarkoituksena oli seuloa suuresta geenimarkkerijoukosta jatkotutkimuksiin sopivat SNP- ja mikrosatelliittilokukset sekvenssivertailujen ja genotyypityksen avulla. Mikrosatelliittilokuksista tutkittiin, esiintyykö niissä geenimarkkereille ominaista vaihtelua eri populaatioiden välillä.</p> <p><i>PGI</i>-geenin genotyypitykseen ei löytynyt tässä työssä hyvin toimivaa vaihtoehtoista genotyypitysmenetelmää. qPCR-pohjaiset analyysit eivät riittäneet tunnistamaan heterotsygoottisia genotyyppiä luotettavasti. Työssä karakterisoitiin 18 uutta SNP-markkeria ja 7 mikrosatelliittilokusta. Kahdesta analysoidusta mikrosatelliittilokuksesta löytyi geneettistä polymorfismia.</p>	
<b>Avainsanat:</b> SNP, mikrosatelliitti, geenimarkkeri, verkkoperhonen	

## ABSTRACT

<b>Name:</b> Annukka Ruokolainen	
<b>Title:</b> Development and Optimization of Genomic Methods for Analysis of SNP and Microsatellite Markers of the Glanville Fritillary Butterfly ( <i>Melitaea cinxia</i> )	
<b>Date:</b> 19 November 2008	<b>Number of pages:</b> 43
<b>Department:</b> Laboratory Sciences	<b>Study Programme:</b> Research
<b>Instructor:</b> Arja Miettinen-Oinonen	
<b>Supervisor:</b> Mikko Frilander	
<p>The Glanville fritillary butterfly has become an important model organism for metapopulation biology research. It has, however, been challenging to investigate genetic polymorphism due to lack of comprehensive sequence information and cost-effective genotyping methods. This thesis concentrates on the optimization of already used SNP- and microsatellite genotyping methods and testing new alternative methods for Glanville fritillary SNP-genotyping. This work was carried out as a part of a comprehensive Glanville fritillary research in the Metapopulation Research Group at the University of Helsinki. This research project focuses on the well studied metapopulation in the Åland Islands.</p> <p>The first part of this thesis deals with the genotyping of <i>PGI</i>-gene of the Glanville fritillary. The goal was to optimize PCR conditions in order to achieve better genotyping results with the SnuPe minisequencing method. In addition, alternative qPCR based genotyping methods, with SimpleProbe and HybProbe format, were tested for the analysis of <i>PGI</i> SNPs. In the second part of this thesis, new SNP- and microsatellite loci were characterized with SnuPe minisequencing. The aim was to screen genetic marker loci by sequence comparisons and genotyping. An additional goal was to analyze the level of polymorphism among microsatellite loci between the different sub-populations.</p> <p>No alternative genotyping methods for the <i>PGI</i>-gene were found in this study as the qPCR based methods were not able to detect heterozygous samples reliably. In this thesis, 18 new SNP markers and 7 microsatellite loci were characterized. Genetic polymorphism was found among 2 of these microsatellites.</p>	
<b>Keywords:</b> SNP, microsatellite, genetic marker, Glanville fritillary	

# SISÄLLYS

## ALKULAUSE

## TIIVISTELMÄ

## ABSTRACT

<b>1</b>	<b>GENEETTISET MARKKERIT</b>	<b>1</b>
1.1	Yhden nukleotidin polymorfismi eli SNP-markkerit	1
1.2	Suuren näytemäärän SNP-genotyypitysmenetelmät	3
1.3	Yhden nukleotidin ekstensiomenetelmä	4
1.4	Mikrosatelliitit	6
1.5	Reaaliaikainen qPCR –menetelmä	7
1.6	qPCR-menetelmä SNP-genotyypityksessä	9
<b>2</b>	<b>VERKKOPERHONEN METAPOPULAATIOBIOLOGIAN MALLIORGANISMINA</b>	<b>11</b>
2.1	Verkkoperhosen geenimarkkeritutkimus	13
2.2	Verkkoperhosen PGI-geeni ja molekyyylitason vaihtelun merkitys populaation ekologiaan	14
<b>3</b>	<b>ANALYYSILAITTEISTOT JA -OHJELMAT</b>	<b>15</b>
3.1	MegaBace 1000 DNA –analysaattori	15
3.2	LightCycler 480 reaaliaikainen qPCR –analysaattori	17
<b>4</b>	<b>TYÖN TAVOITTEET</b>	<b>18</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAALIT JA MENETELMÄT</b>	<b>19</b>
5.1	<i>PGI</i> -geeni	19
5.2	Kolmen eri SNP-lokuksen PCR-monistuksen optimointi	19
5.3	SNP-genotyypitys qPCR-menetelmällä	20
5.4	Uusien SNP-lokusten karakterisointi	21
5.4.1	<i>Bioinformatiikka ja PCR-monistus</i>	22
5.4.2	<i>SNuPe-tekniikka ja Megabace-minisekvensointi</i>	23
5.5	Mikrosatelliittianalyysit	24
5.5.1	<i>Bioinformatiikka</i>	25
5.5.2	<i>MegaBace-analyysi</i>	26
<b>6</b>	<b>TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU</b>	<b>27</b>

<b>6.1</b>	<b>DNA-eristys ja näytteen lisääminen</b>	<b>27</b>
<b>6.2</b>	<b><i>PGI</i>-geenin SNP-lokusten PCR-monistuksen optimointi</b>	<b>29</b>
<b>6.3</b>	<b>PGI SNP –lokusten genotyypitys SimpleProbe ja HybProbe qPCR –menetelmillä</b>	<b>30</b>
<b>6.4</b>	<b>Uusien SNP-lokusten karakterisointi: sekvenssivertailut ja PCR-monistus</b>	<b>31</b>
<b>6.5</b>	<b>Uusien SNP-lokusten genotyypitys SNUPe-MegaBace –tekniikalla</b>	<b>32</b>
<b>6.6</b>	<b>SNUPe-minisekvensointitekniikan ja qPCR-menetelmien vertailu</b>	<b>34</b>
6.6.1	<i>Menetelmän työmäärä</i>	34
6.6.2	<i>Tulosten luotettavuus</i>	34
6.6.3	<i>Kustannukset</i>	36
<b>6.7</b>	<b>Mikrosatelliittianalyysit</b>	<b>36</b>
<b>7</b>	<b>YHTEENVETO</b>	<b>38</b>
	<b>VIITELUETTELO</b>	<b>39</b>
<b>LIITTEET:</b>	Liite 1: <i>PGI</i> -geenin sekvenssi ja SNP-lokukset	
	Liite 2: qPCR-ohjelmat	
	Liite 3: SNP-geenit	
	Liite 4: Mikrosatelliittigeenit	
	Liite 5: SNP-lokusten MegaBace-tulokset	
	Liite 6: Mikrosatelliittilokusten MegaBace-tulokset	

## 1 GENEETTISET MARKKERIT

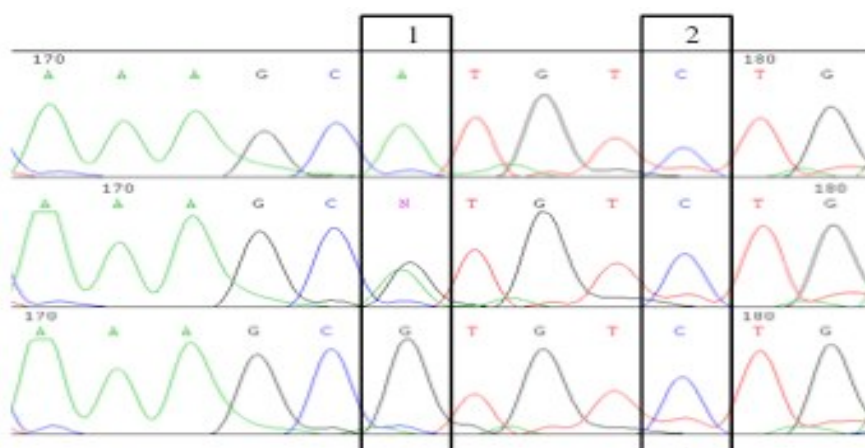
Geneettisillä markkereilla tarkoitetaan kokonaista merkkigeeniä, lyhyttä DNA-jaksoa tai vain yksittäistä nukleotidia, jonka avulla voidaan merkitä genomi tai sen osa. Geneettisestä markerista voidaan puhua myös tarkoittaessa geneettisesti säädeltyä fenotyypistä (ilmiasu) eroa. Näitä markkereita, joiden avulla voidaan tutkia polymorfismia eli monimuotoisuutta, käytetään hyväksi mm. lääketieteessä, eläingenetiikassa ja ekologiassa (Esim. Goldstein & Schlötterer 1999, Sunnucks 2000, Vignal ym. 2002). Niiden avulla voidaan esimerkiksi tunnistaa periytyviä tauteja aiheuttavia geenejä tai seurata tietyn populaation leviämistä uusille elinalueille ja jopa jäljittää sukulaisuussuhteita. Markkereita käytetään myös keinotekoisesti aiheutettujen mutaatiokohtien paikantamiseen (Berger ym. 2001).

### 1.1 Yhden nukleotidin polymorfismi eli SNP-markkerit

SNP-markkerit (Single Nucleotide Polymorphism) ovat nimensä mukaisesti yhden nukleotidin vaihtelevia DNA-kohtia. Ne ovat yleisin geneettisen vaihtelun muoto (Collins ym. 1998, Griffin & Smith 2000). Tällainen markkeri esiintyy ihmisen genomissa noin yhden kiloemäksen välein (Kruglyak 1997, Wang ym. 1998). SNP-markkerit ovat yleensä käytännössä bialleelisiä eli niistä esiintyy vain kahta vaihtoehtoista muotoa, joista harvinaisempaa täytyy esiintyä vähintään 1 %:n osuudella (esim. Brookes 1999, Vignal ym. 2002). Bialleelisyyden syyksi on esitetty kahden erillisen mutaatiotapahtuman hyvin pientä todennäköisyyttä osua samaan nukleotidikohtaan, jolloin vasta muodostuisi useampi SNP-alleeli. Lisäksi transitiomutaatiot, joissa puriiniemäs (A tai G) muuttuu toiseksi puriiniemäkseksi tai vastaavasti pyrimidiiniemäs (T tai C) toiseksi pyrimidiiniemäkseksi, ovat paljon yleisempiä kuin transversiomutaatiot, joissa tapahtuu puriini-pyrimidiinimuutos.

Tällaisia vaihtelevia SNP-nukleotideja etsitään genomista vertaamalla eri yksilöiden sekvenssejä (esim. Brookes 1999, Gut 2001, Vignal ym. 2002). SNP-lokusten tunnistaminen voidaan tehdä tunnetuimpien organismien kohdalla yksinkertaisimmillaan vertaamalla jo aikaisemmin sekvenssitietokantoihin kerättyä tietoa. Esimerkiksi EST-projekteista (Expressed Sequence Tag, ekspressoituvan sekvenssin leima) on saatu paljon sekvenssitietoa, jota analysoimalla voidaan tunnistaa erityisesti koodaavien alueiden SNP-

markkereita (Picoult-Newberg ym. 1999). SNP-lokuksia voidaan etsiä myös monistamalla tiettyjä alueita genomista PCR-menetelmällä (Polymerase Chain Reaction, polymeraasiketjureaktio) ja sekvensoimalla ne joko suoraan tai kloonamalla genomipätkiä esimerkiksi BAC-vektoriin eli keinotekoiseen bakteerikromosomiin. Kloonauksen jälkeen monistettujen alueiden sekvensointia on suositeltavaa, koska suorassa sekvensoinnissa heterotsygoottien ja sekvensointiartefaktoiden erottaminen voi olla haastavaa (kuva 1; Vignal ym. 2002). Vähemmän tunnettujen, niin sanottujen ei-malliorganismien kohdalla, joiden sekvenssitietoa ei ole saatavilla samassa mittakaavassa, on käytetty esimerkiksi bakteerifaagi Mu:n transposiitokoneistoon perustuvaa SNP-kohtien tunnistusta (Orsini ym. 2007). Suuren mittakaavan SNP-markkereiden tunnistusprojekteissa on hyödynnetty lähinnä koko genomia kattavaa sattumanvaraisen DNA-jakson sisältävien kloonien sekvensointia eli WGS-menetelmää (Whole Genome Shotgun sequencing) sekä RRS-menetelmää (Reduced Representation Shotgun sequencing) (Weber & Myers 1997, Altshuler ym. 2000). RRS-menetelmässä tuotetaan esimerkiksi restriktioentsyymien avulla tunnistettavan kokoisia DNA-pätkiä tai tiettyyn proteiiniin sitoutuvia alueita, jotka sitten sekvensoidaan eri yksilöistä (Altshuler 2000). Tällaisella menettelyllä samat tunnistettavissa olevat DNA-jaksot on mahdollista tuottaa helposti eri yksilöistä tai tarvittaessa myös uudelleen samasta yksilöstä. Molempien menetelmien etuna on, ettei niissä tarvita etukäteistietoa sekvenssistä, eikä pohjalla ole PCR-monistusta, joka voi jo siinäkin tuottaa virhettä.



Kuva 1. SNP-lokusten tunnistus suoralla PCR-tuotteiden sekvensoinnilla (Vignal ym. 2000). Laatikossa 1 on esitetty selkeä sekvensointitulokset, jossa keskimmäisenä kaksoispiikin antava heterotsygootti. Laatikossa 2 sekvensointitulokset on epäselvä, jolloin ei voida olla varmoja onko kaksoispiikki sekvensointi-ongelmasta vai heterotsygoottisesta näytteestä johtuva. Kloonauksen jälkeen sekvensointia poistaa tämän ongelman, jolloin kaksoispiikki on aina merkki huonosta sekvensointituloksesta.



SNP-markkereiden suosiota geneettisinä markkereina voidaan perustella niiden korkealla esiintyvyydellä genomissa, jolloin on todennäköistä että useampi markkeri voidaan paikallistaa läheltä tutkittavaa geenialuetta (Landegren ym. 1998). SNP-lokusten etu on myös niiden hyvin stabiili periytyminen eli mutaatiot eivät juurikaan vaikuta niihin. Lisäksi, koska SNP-markkereita esiintyy myös koodaavilla DNA-alueilla, jotkut niistä voivat vaikuttaa suoraan proteiinirakenteeseen tai geenin ilmenemistasoon.

## 1.2 Suuren näytemäärän SNP-genotyypitysmenetelmät

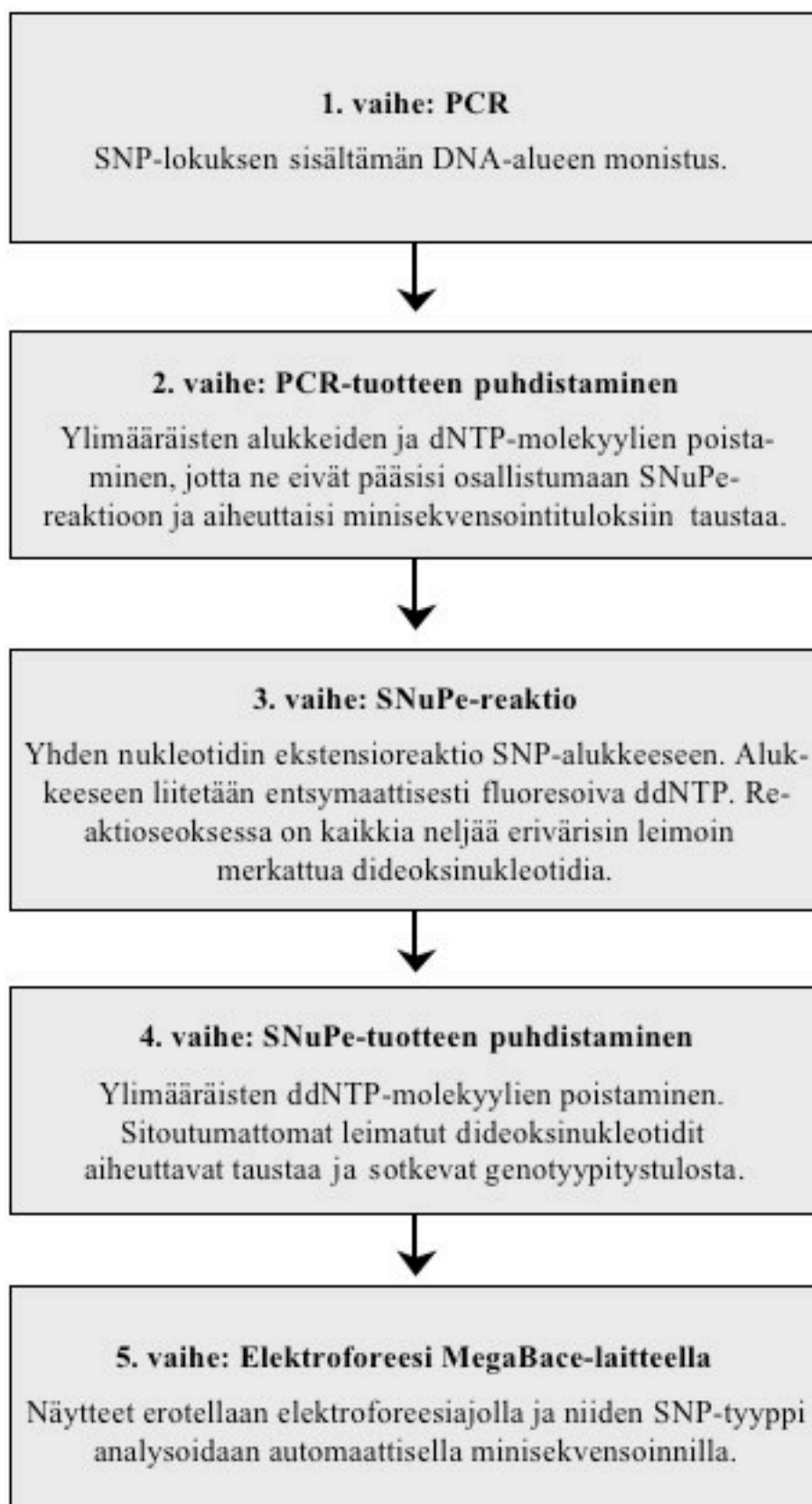
SNP-genotyypitys eli yksilöiden SNP-alleelimuotojen tunnistus vaatii tehokkaan analyysimenetelmän, koska usein näitä markkereita halutaan tunnistaa kerralla suuri määrä suuresta näytejoukosta (esim. Kwok 2000, Gut 2001, Kwok 2001, Tsuchihashi 2002, Vignal ym. 2002, Morin ym. 2004). Näin voidaan laatia esimerkiksi assosiaatioanalyysijä tiettyyn genotyyppiseen piirteeseen eri populaatioissa. SNP-genotyypityksessä käytetään useita erilaisia suuren mittakaavan analyysihin sopivia tekniikoita, joilla käsitetään kymmenistä jopa satoihin tuhansiin näytteisiin päivässä analysoituja menetelmiä. Näissäkin tekniikoissa on kuitenkin vielä kehitettävää, erityisesti näytemäärän, tulosten luotettavuuden, kustannusten ja automaatiotason suhteen. Verrattuna mikrosatelliittien genotyypitysmenetelmiin, ovat SNP-markkereiden määritysmenetelmät kehittyneempiä ja pidemmälle automatisoituja, mikä on yksi syy SNP-lokusten suurempaan suosioon geneettisinä markkereina (Landegren ym. 1998).

Valittaessa sopivaa genotyypitysmenetelmää on Kwok Pui-Yan (2000) mukaan huomioitava kolme analyysivaihetta. Ensimmäinen on arvioitava millä menetelmällä alleelit halutaan erottaa toisistaan eli esimerkiksi käytetäänkö alleelispesifistä hybridisaatiota, alleelispesifistä alukkeiden ekstensiota, alleelispesifistä oligonukleotidien liittämistä vai alleelispesifistä koettimen pariutumattoman hännän kohdalta katkaisevaa endonukleaasimenetelmää (Flap-endonukleaasi). Toisessa vaiheessa on ratkaistava mitä reaktiotyyppiä halutaan käyttää eli käytetäänkö liuoksessa tapahtuvaa reaktiota, kiinteätä alustaa kuten mikrosiruja vai näiden yhdistelmää. Lopuksi ratkaistaan miten reaktion tulos analysoidaan, ehkä massaspektrometrisesti tai esimerkiksi fluoresenssin intensiteetin perusteella. Genotyypitysmenetelmissä käytetään siis monenlaisia näiden kolmen vaiheen analyysiyhdistelmiä.

Hybridisaatioon perustuvien menetelmien ongelmana on vain yhden nukleotidin verran eroavien molekyylien hybridisaatio-olosuhteiden erottaminen (Kwok 2000). Esimerkiksi sirutekniikka perustuu kiinteällä pinnalla tapahtuvaan hybridisaatioon. Tällaisten sirujen ongelmana on epäselvien genotyypitystulosten suuri määrä. Liuoksessa tapahtuvaa hybridisaatioreaktiota käytetään hyväksi monessa reaaliaikaiseen qPCR-detektioon perustuvassa menetelmässä. Näistä menetelmistä kerrotaan tarkemmin kohdassa 1.6 qPCR-menetelmä SNP-genotyypityksessä.

### 1.3 Yhden nukleotidin ekstensiomenetelmä

Yhden nukleotidin ekstensiomenetelmä eli SNUPe (Single Nucleotide Primer Extension) perustuu juuri ennen SNP-kohtaa sitoutuvaan alukkeeseen, johon liitetään entsyymaattisesti yksi nukleotidi. Koettimen jälkeisen nukleotidin tunnistuksessa käytetään usein automaattista minisekvensointia. Menetelmä kehitettiin 1990-luvun alussa apolipoproteiinin alleelivarianttien analysointiin (Syvänen ym. 1990). Tekniikassa analysoitavasta genomista monistetaan ensin PCR-menetelmällä haluttu pätkä eli se vaatii etukäteisinformaatiota SNP-lokukseen lähialueen sekvenssistä. Saatua PCR-tuotetta puhdistetaan ja siihen liitetään juuri ennen SNP-kohtaa sitoutuva aluke sekä tämän jälkeen SNP-lokukseen sitoutuva leimattu dideoksinukleotidi. Tämän jälkeen reaktio edelleen puhdistetaan ylimääräisistä nukleotideista ennen varsinaista minisekvensointia. Tekniikka vaatii siis useamman näytteen käsittelyvaiheen. Työvaiheet on esitetty kuvassa 2. Tätä menetelmää käytetään SNP-genotyypityksen ohella muun muassa DNA:n metylaatiotutkimuksissa (Jones & Gonzalgo 1997, Sievers ym. 2005).



Kuva 2. SNaPe-menetelmän työvaiheet (mukailten Batley & Hayes 2003).

SNuPe-menetelmää voidaan hyödyntää myös niin, että sekvensointialukkeet sidotaan kiinteälle alustalle kuten mikrosirulle, jolloin saadaan rinnakkain samanaikaisesti suuri määrä leimattujen dideoksinukleotidien ekstensioreaktioita (Kwok 2000). SNuPe-reaktiotuotteita voidaan myös tunnistaa massaspektrometrisesti, jolloin ei tarvita lainkaan leimaa, vaan tuote tunnistetaan jokaisen dideoksinukleotidin erilaisen massan perusteella. Tekniikan etuna on hyvä homo- ja heterotsygoottien tunnistus (Stanssen ym. 2004). Massaspektrometrilla saavutetaan erityisesti suuri näytesignaalin ja taustan suhde, mikä parantaa tämän menetelmän herkkyyttä.

Pyrosekvensointi voidaan luokitella myös yhden nukleotidin ekstensioreaktioksi (Ronaghi ym. 1998). Tässä genotyyppitysmenetelmässä mitataan DNA:n ekstensioreaktion sivutuotetta, pyrofosfaattia, joka muutetaan entsyymireaktioissa korkeaenergiseksi ATP-molekyyliksi. ATP toimii valoa tuottavan lusiferaasi-entsyymin energianlähteenä ja edelleen seuraamalla mikä nukleotidi tuottaa valoreaktion, voidaan oligonukleotidin jälkeinen emäs tunnistaa. Pyrosekvensointia voidaan hyödyntää myös useamman peräkkäisen SNP-markkerin tunnistukseen.

SNuPe-menetelmän etuna on, että sillä saadaan selville SNP-kohdassa oleva emästyppi (Kwok 2000). Useimmilla muilla genotyyppitysmenetelmillä saadaan selville vain, että onko SNP-lokuksen nukleotidi sama kuin esimerkiksi käytetyssä hybridisaatiokoettimessa. Vaikka SNP-markkerit ovatkin käytännössä bialleelisiä, tuo tällainen tarkka genotyyppitystieto lisävarmuutta analyysiin.

#### **1.4 Mikrosatelliitit**

Mikrosatelliitit, joita joskus kutsutaan myös SSR- (Simple Sequence Repeats) tai STR-jaksoiksi (Short Tandem Repeats), ovat lyhyiden toistojaksojen sarjoja (Goldstein & Schlötterer 1999). Peräkkäiset toistojaksot ovat korkeintaan kuuden nukleotidin mittaisia jaksoja, joiden toistomäärä vaihtelee eri yksilöiden tai populaatioiden välillä eli mikrosatelliittilokuksen pituudessa esiintyy polymorfismia. Näitä mikrosatelliitteja on löydetty kaikkien tutkittujen organismien genomeista. Niitä esiintyy enemmän koodaamattomilla kuin koodaavilla DNA-alueilla, koska muutokset muissa kuin kolmen nukleotidin toistojaksojen pituuksissa sotkisivat DNA:n lukukehyksen koodaavilla alueilla.

Mikrosatelliitin pituus on yleensä muutamasta kymmenestä muutamiin satoihin nukleotideihin (Beckmann & Weber 1992). Ihmisellä tällainen jakso esiintyy keskimäärin joka kuudennen kiloemäksen välein. Tyypillisin toistojakson pituus on vain kaksi nukleotidia, joista AC-toisto on nisäkkäillä yleisin (Toth ym. 2000). Toiseksi yleisin toistojakso on AT-dinukleotidijakso. Ihmisen kolmen nukleotidin trinukleotiditoistot ovat erityisen kiinnostavia, koska niillä on osoitettu olevan yhteys moneen neurologiseen rappeumasairauteen, esimerkiksi Huntingtonin tautiin (Reddy & Housman 1997).

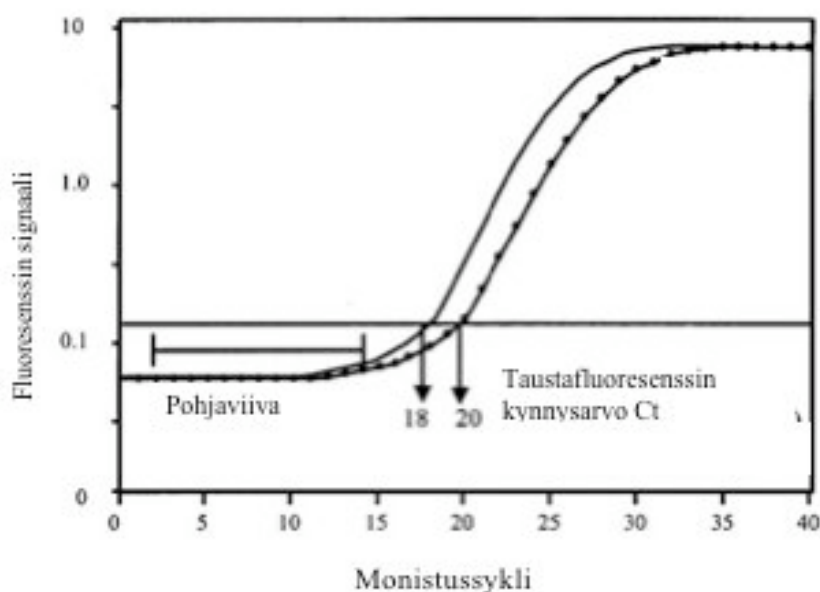
Mikrosatelliitit ja niissä esiintyvä yksilöiden tai populaatioiden välinen vaihtelu syntyvät DNA-polymeraasin tekemistä virheistä sen liukuessa pitkin genomia (slippage error; Richards & Shutherland 1992). Mikrosatelliittien toistojaksojen pituuserojen syyksi on esitetty myös epätasapainoista tai homologista rekombinaatiota (Tsiflidis ym. 1992 Jakupciak & Wells 1999 mukaan).

## 1.5 Reaaliaikainen qPCR –menetelmä

Reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR –menetelmä (qPCR) kehitettiin 1990-luvun alkupuolella ja yksi ensimmäisistä tekniikkaa käsitelleistä artikkeleista ilmestyi 1993 (Higuchi ym. 1993). Menetelmä yleistyi nopeasti 2000-luvun alkuun mennessä paljon käytetyksi kvantitointimenetelmäksi ja sitä käytetäänkin yleisesti mm. lähetti-RNA-tasojen, RNA-molekyylien silmikoinnin ja geenien kopioluvun kvantitointiin (Bustin 2000, Ginzinger 2002, Mason ym. 2002, Pessa ym. 2006).

qPCR-menetelmä perustuu reaaliaikaiseen tuotteen monistumisen mittaamiseen (Esim. Bustin 2000, Giulietti ym. 2001, Ginzinger 2002). Näin voidaan luotettavasti määrittää alkuperäisen näytteen sisältämä monistettavan DNA-jakson määrä. Tavallisessa PCR-menetelmässä voidaan mitata vasta monistumisen jälkeinen tuotteen kertymä, joka ei aina ole verrannollinen todelliseen näytteen sisältämään DNA-määrään. Tämä johtuu siitä, että monistumisteho laskee usein myöhäisissä sykleissä eri näytteissä eri aikaan. Monistumistehoa heikentävät esimerkiksi näytteen sisältämät inhibiittori- eli estäjä-molekyylit, reagenssien loppuminen reaktioseoksesta sekä pyrofosfaattimolekyylien kertyminen. Tämän vuoksi toiset reaktiot voivat tuottaa vähemmän lopputuotetta vaikka sisältäisivät enemmän lähtömateriaalia. qPCR-menetelmässä lopputuotteen kertyminen voidaan mitata jokaisen monistussyklin jälkeen erilaisten fluoresoivien leimojen avulla, kuten SYBR Green -

kemialla. Tämä leima sitoutuu kaksijuosteiseen DNA:han, jolloin sen lähettämän fluoresoivan säteilyn määrä voidaan mitata. Näin saadaan selville eksponentiaalisen monistumisen vaihe ja erityisesti se monistussykli, jossa tuotteen fluoresoiva signaali havaitaan taustakohinasta ensimmäisen kerran eli taustafluoresenssin kynnyсарvo, Ct-arvo (Cycle threshold). Kuvassa 3 on esitetty Ct-arvon määrittäminen ja monistustuotteiden kertyminen. Ct-arvon avulla voidaan määrittää näytteen sisältämä monistettavan jakson suhteellinen määrä tai jopa absoluuttinen molekyylimäärä standardisuoran avulla. Nämä voidaan määrittää myös Cp-arvon avulla (Crossing point), joka kertoo monistumiskäyrän toisen derivaatan maksimiарvo. Cp-arvo kertoo monistussyklin, jossa mitattu fluoresenssi kasvaa eniten ja eksponentiaalinen monistuminen alkaa. Cp-arvoon perustuvaa määritysmenetelmää on väitetty Ct-arvoon perustuvaa laskentaa tarkemmaksi (Molenkamp ym. 2007).



*Kuva 3. Reaaliaikaisessa qPCR-analyysin monistumiskäyrä (Ginzinger 2002 mukailen). Monistumiskäyrässä kuvataan fluoresenssin intensiteetin nousua monistussyklin suhteen. Pohjaviiva kuvaa monistumissyklejä, joissa fluoresenssisignaali on laitteen detektioherkkyyden alapuolella. Ct-arvo määritetään PCR-syklin mukaan, jossa näytteen lähettämä signaali on kymmenen kertaa suurempi kuin pohjaviivan keskihajonta. Kuvassa pisteillä merkityn näytteen Ct-arvo on kaksi kertaa ensin monistuvaa näytettä suurempi, mikä eksponentiaalisessa monistumisessa tarkoittaa nelinkertaista eroa näytteen sisältämässä monistusalueen määrässä.*

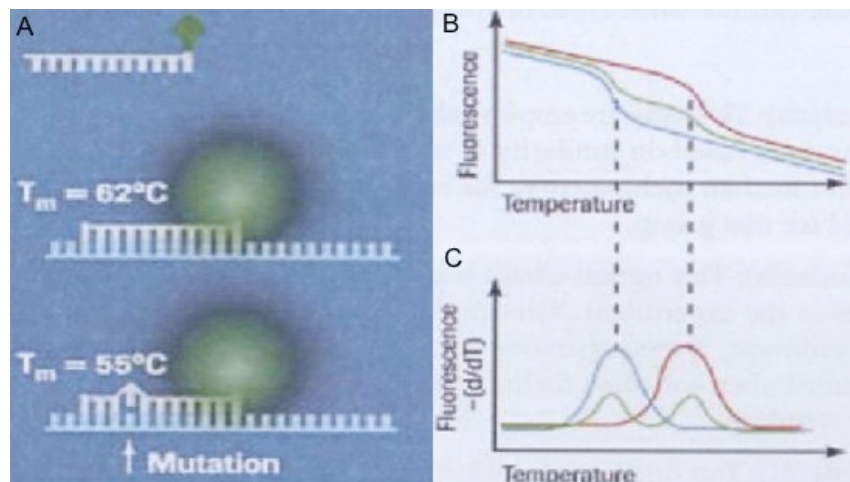
## 1.6 qPCR-menetelmä SNP-genotyypityksessä

Reaaliaikaisesta qPCR –analyysistä on tullut tärkeä menetelmä mutaatiotutkimuksessa. Sen avulla SNP-genotyypitys on parhaimmillaan nopeaa ja tarkkaa ja se mahdollistaa myös analyysin pienestä määrästä lähtömateriaalia (Dwight ym. 2000, Olney ym. 2002). Menetelmän etuna on myös koko määrittelyn tapahtuminen yhdellä kertaa samassa PCR-putkessa, jolloin näytteen käsittelyvaiheet ja siten myös kontaminaatoriski vähenevät verrattuna perinteisiin menetelmiin, kuten Southern hybridisaatioon tai minisekvensointiin. Genotyypitys perustuu qPCR-menetelmässä yleensä erilaisiin leimattuihin alukkeisiin ja/tai koettimiin, joiden avulla monistustuotteen genotyyppi voidaan nähdä monistussykliä jälkeen ajettavasta sulamiskäyrästä. Reaaliaikaista qPCR-tekniikkaa hyödyntävissä SNP-genotyypitysmenetelmissä etuna on monistuksen ja fluoresoivaan leimaan perustuvan genotyypityksen tapahtuminen samalla 96- tai 384-kuoppalevyllä ilman, että mitään reagensseja tarvitsee lisätä analyysin välissä (esim. Tsuchihashi 2002). Lisäksi menetelmässä voidaan käyttää niin sanottua multipleksausta eli samasta reaktioseoksesta voidaan tunnistaa useampi markkeri eriväristen fluoresoivien leimojen ja erikokoisten monistustuotteiden avulla. Menetelmän haittapuolena on kuitenkin korkeat kustannukset, etenkin jos analysoitavia SNP-lokuksia on suuri joukko.

SNP-genotyypitys SimpleProbe ja HybProbe –tekniikoilla perustuu qPCR-laitteella ajettaviin sulamiskäyräanalyyseihin (LightCycler 480 Instrument – Software Version 1.5 –käyttöohje, Roche). Tällöin mitataan leimattujen koettimien erilaista sitoutumiskykyä eri alleeleihin. Samat koettimet sitoutuvat molempiin alleeleihin, jolloin alleelispesifisiä koettimia ei välttämättä tarvita. Menetelmällä saavutetaan tosin vain tieto siitä, onko SNP-lokuksen nukleotidi sama kuin koettimessa vai jokin muu emäs. Tämä tieto usein riittää, koska SNP-lokukset ovat käytännössä vain bialleelisiä. Näillä koetintekniikoilla voidaan myös havainnoida useampaa lähekkäin sijaitsevaa SNP-lokusta samanaikaisesti. Molemmissa menetelmissä mitattava signaali tulee vain spesifisesti SNP-lokuksen sisältävästä monistustuotteesta, eivätkä reaktiossa mahdollisesti monistuvat epäspesifiset tuotteet juurikaan haittaa analyysiä.

SimpleProbe-tekniikassa käytetään nimensä mukaisesti vain yhtä leimattua koetinta. Menetelmä on siten yksinkertainen ja suhteellisen halpa. Detektio perustuu koettimen lähettämään fluoresoivaan signaaliin, joka voimistuu ko-

ettimen sitoutuessa vastinjuosteeseensa (kuva 4a). Sulamiskäyrän määrittämisen aikana reaktioseoksen lämpötilaa nostetaan kontrolloidusti, jolloin SNP-lokukseen heikommin sitoutuneet koettimet irtoavat vastinjuosteestaan ensin, jolloin näytteen fluoresoiva signaali heikkenee (kuva 4b). Vahvemmin sitoutuneiden koettimien sekvenssi vastaa täysin SNP-lokuksen sekvenssiä ja niiden sulamiskäyrästä muunnettujen sulamiskiikkien lämpötila on korkeampi (kuva 4c). Näytteissä, jotka ovat SNP-lokuksen suhteen heterotsygotteja, nähdään molemmat piikit.

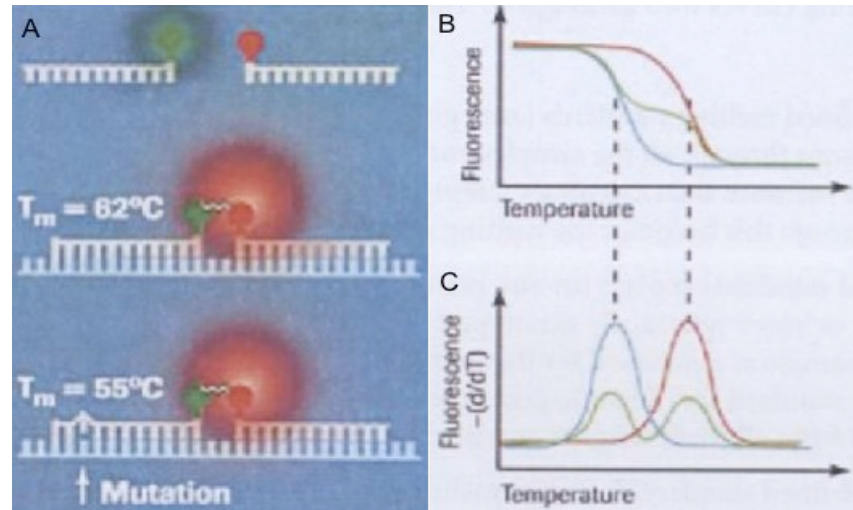


Kuva 4. SimpleProbe –tekniikka (LightCycler 480 Instrument – Software Version 1.5 –käyttöohje). A) Koettimen rakenne. B) Sulamiskäyrä, jossa on esitetty fluoresenssin lasku lämpötilan funktiona. C) Sulamiskäyrästä muunnellut sulamiskiikot. Heterotsygotisessa näytteessä erottuvat molemmat piikit.

Myös HybProbe-tekniikka perustuu sulamiskäyriin ja tällä tekniikalla saatava tulos näyttääkin käytännössä samalta kuin SimpleProbe-tekniikan sulamiskäyrät ja sulamiskiikot (kuvat 5b ja c) (LightCycler 480 Instrument – Software Version 1.5 –käyttöohje). HybProbe-tekniikka perustuu fluoresoivaan resonanssienergian siirtoon eli FRET-tekniikkaan. Tällöin analyysissä käytetään kahta leimattua hybridisaatiokoetinta, jotka sitoutuvat peräkkäin, muutaman nukleotidin päähän toisistaan (kuva 5a). Ensimmäinen koetin, jota kutsutaan luovuttajakoettimeksi, on leimattu fluoresoivalla leimalla 3' päästä. Tämän koettimen jälkeen sitoutuva vastaanottava koetin on puolestaan leimattu 5' päästä eri aallonpituudella emittoivalla leimalla. Kun luovuttajakoettimen leimaa viritetään sinisellä LED-valolla, se siirtää absorboimansa energian lähellä sijaitsevalle vastaanottavan koettimen leimalle. Tämän leiman lähettäminen emissio mitataan ja sen avulla voidaan määrittää koettimen sulamiskäyrät ja siten näytteen SNP-tyyppi. Kun koettimet ovat vapaana reaktioseoksessa, luovuttava ja vastaanottava leima eivät ole riittävän lähellä toi-



siaan, jotta energiansiirto pääsisi tapahtumaan. Menetelmän etuna on SimpleProbe –tekniikkaan verrattuna useampien eri aallonpituudella emittoivien leimojen käyttömahdollisuus. Tällöin analyysi voidaan tehdä multiplexformaattissa eli määrittää useampien SNP-lokusten genotyyppi samassa reaktioseoksessa.



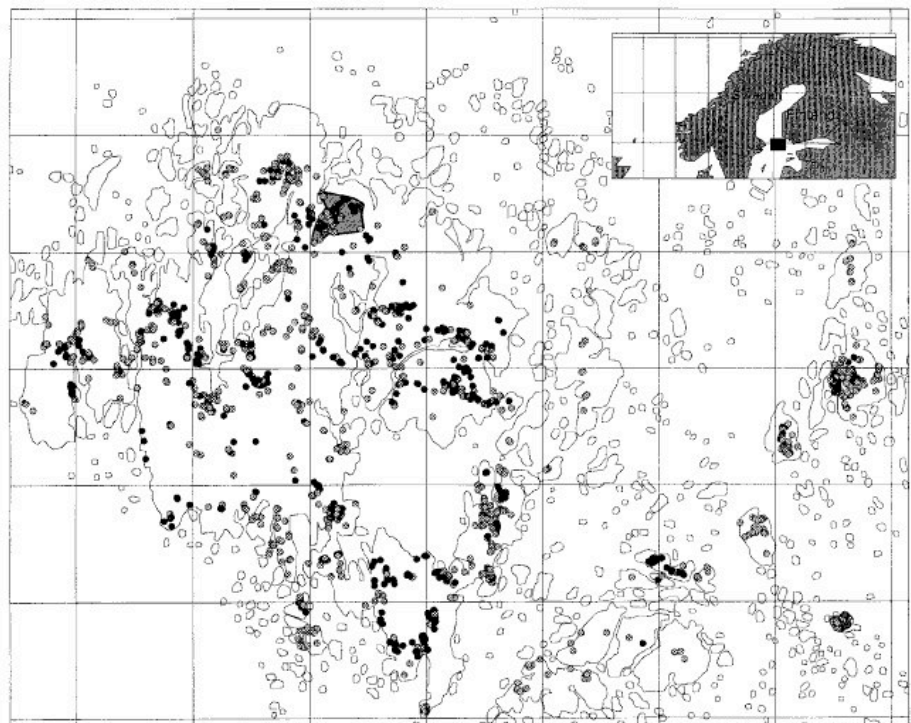
Kuva 5. HybProbe –tekniikka (LightCycler 480 Instrument – Software Version 1.5 – käyttöohje). A) Koettimen rakenne. B) Sulamiskäyrä, jossa on esitetty fluoresenssin lasku lämpötilan funktiona. C) Sulamiskäyrästä muunnetut sulamiskiikot. Heterotsygoottisessa näytteessä erottuvat molemmat piikit.

## 2 VERKKOPERHONEN METAPOPULAATIOBIOLOGIAN MALLIORGANISMINA

Metapopulaatiolla tarkoitetaan saman lajin, toisistaan erillisillä elinalueilla eli habitaateilla elävien alapopulaatioiden joukkoa (Levins 1970 Hanski & Gaggiotti 2004 mukaan). Habitaattilaikut eivät kuitenkaan ole toisistaan täysin eristyksissä, vaan niiden välillä tapahtuu muuttoliikettä ja näin myös geenien vaihtoa. Metapopulaatiobiologissa tutkimuksessa keskitytäänkin ajatukseen, että paikalliset populaatiot, jotka muodostavat yhdessä metapopulaation, ovat erillisiä tutkimusyksiköitä; yksiköitä joilla on kuitenkin yhteys toisiinsa satunnaisen muuttoliikkeen kautta (Hanski & Gaggiotti 2004). Verkkoperhosesta (*Melitaea cinxia*) on tullut viime vuosikymmenenä tärkeä metapopulaatiobiologian malliorganismi (Ehrlich & Hanski 2004). Se sopii hyvin tämän biologian haaran tutkimukseen, koska tällä perhosella on helposti määriteltävät ja tunnistettavat elinalueen vaatimukset. Sen habitaatit ovat toisistaan erillisiä kuivia niittyjä, jotka on helposti rajattavissa muusta maastosta. Lisäksi on tärkeää, että verkkoperhosen toukkia on helppo tutkia

maastossa ja laboratorio-olosuhteissa. Perhoset ovat herättäneet tutkijoiden mielenkiinnon tutkimusorganismina myös siksi että niiden on osoitettu reagoivan erityisen herkästi tämän hetkiseen tärkeään biologiseen ongelmaan; ilmaston ja elinalueiden muutoksiin (Thomas & Hanski 2004).

Suomessa verkkoperhosta esiintyy vain Ahvenanmaalla ja muutamilla sen pienillä lähisaarilla. Perhonen hävisi Manner-Suomesta 70-luvun lopulla. Professori Ilkka Hanskin johdolla on aloitettu 1991 verkkoperhosen Ahvenanmaan metapopulaation tutkimus, joka kattaa lajin koko nykyisen leviämisalueen Suomessa (Hanski ym. 1994). Kuvassa 6 on esitetty verkkoperhosen 4 000 habitaattilaikkua 50 x 70 km:n alueelta (Hanski ym. 1995). Nämä saariston alapopulaatiot ovat kaikki niin pieniä, että ne ovat vaarassa hävitä, mikä tekee Ahvenanmaan verkkoperhosmetapopulaatiosta mielenkiintoisen ekologisen tutkimuskohteen.



Kuva 6. Verkkoperhosen habitaattilaikut Ahvenanmaan saaristossa (Hanski ym. 1995). Asutetut habitaattilaikut on merkitty mustilla pisteillä ja harmaat pisteet kuvaavat tyhjiä elinalueita. Kuvan ruudukon mittakaava on 10 x 10 km<sup>2</sup>.

## 2.1 Verkkoperhosen geenimarkkeritutkimus

Usean perhoslajin kohdalla on osoitettu yhden geenin aminohappovaihtelun vaikuttavan merkittävästi perhosen elinkelpoisuuteen, mikä tekee perhosista hyviä esimerkkejä geneettisen monimuotoisuuden tutkimiseen (Watt ym. 2003). Tämän eliöryhmän perimän tutkimus on perinteisesti keskittynyt silkkiperhoseen (*Bombyx mori*), jonka koko genomi on sekvensoitu (Xia ym. 2004). Geneettisten markkereiden tutkimusta on kuitenkin jarruttanut, etenkin vähemmän tunnetuilla perhoslajeilla, sekvenssitiedon ja kustannustehokkaiden genotyypitysmenetelmien puute.

SNP-geenimarkkereita on tutkittu verkkoperhoselta vain vähän, koska sen sekvenssitietoa ei juurikaan ole ollut saatavilla. Sekvenssitiedon puutteesta johtuen verkkoperhosella on jouduttu käyttämään vaihtoehtoisia menetelmiä SNP-lokusten tunnistuksessa, joka perustuu bakteriofaagi Mu:n transpositiokoneistoon (Orsini ym. 2007). Tutkimuksen perusteella näyttäisi, että tämän perhoslajin genomi sisältää yllättävän paljon SNP-markkereita. Nytkin 454 pyrosekvensointi on tuottanut valtavasti lisää informaatiota tämänkin perhoslajin genomista (Vera ym. 2008). Tällä suuren mittakaavan sirupohjaisella pyrosekvensointimenetelmällä saatiin kerättyä 600 000 EST-sekvenssiä, joista määritettiin muiden lähilajien avulla noin 9000 tunnettua geeniä ja yli 6000 vielä tunnistamatonta geenisekvenssiä.

Verkkoperhosen, kuten muidenkin perhosten, mikrosatelliittien tutkimus on ollut vaikeaa (Neve & Mègelecz 2000, Keyghobadi ym. 1999, Keyghobadi ym. 2002, Sarhan 2006). Perhosten genomisista kirjastoista on löytynyt vain vähän vaihtelevia mikrosatelliittialueita (Ji & Zhang 2004 Zhang 2004 mukaan). Usein kirjastosta on saatu seulottua vain noin viisi polymorfista lokusta, kun muilla tutkituilla hyönteislajeilla tämä luku on ollut selvästi suurempi. Verkkoperhoselta näitä geenimarkkereita seulottiin neljästä mikrosatelliittien suhteen rikastuneesta geenikirjastosta, jolloin vain 37:en lokukseen saatiin suunniteltua PCR-alukkeet (Sarhan 2006). Useimpien tunnistettujen mikrosatelliittilokusten koko oli liian pitkä, toistojakso oli epäjatkovaa tai lokuksen ympäristössä oli toistojaksollista DNA:ta, mikä esti mikrosatelliitin PCR-monistamisen. Lopulta tuloksena oli vain viiden geenimarkkerina toimivan mikrosatelliittijakson eristys ja karakterisointi.

Perhosgenomeissa esiintyvät mikrosatelliitit ovat geenimarkkereina haasteellisia, koska niistä esiintyy usein niin sanottuja keskeytettyjä toistojaksoja

eli toistojaksojen välissä on tavallista sekvenssiä (Zhang 2004). Lisäksi perhosilla on havaittu mikrosatelliittiperheitä. Näillä tarkoitetaan lokuksia, joilla on identtiset tai lähes samanlaiset niitä reunustavat DNA-sekvenssit (Megléczy ym. 2004). Tällöin on mahdotonta suunnitella tietylle lokukselle spesifisiä alukkeita PCR-monistukseen, joten tällaisia perheisiin kuuluvia mikrosatelliitteja ei voida hyödyntää geenimarkkereina. Mikrosatelliittien genotyypityksessä tarvittava lokuksen monistaminen on osoittautunut vaikeaksi myös tavallisten toistojaksojen yhteydessä. Syyksi on epäilty näiden geenimarkkereiden ympäristön suurta sekvenssivaihtelua, jolloin satelliitin ympärille on vaikea suunnitella hyvin koko näytejoukosta lokuksen monistavia PCR-alukkeita.

## **2.2 Verkkoperhosen PGI-geeni ja molekyyli-tason vaihtelun merkitys populaation ekologiaan**

Fosfogluukoosi-isomeraasi (PGI) on glykolyysiin eli soluhengityksen ensimmäiseen reaktiosarjaan osallistuva entsyymi. Se katalysoi glykolyysin toisen vaiheen, glukoosi-6-fosfaatin muutoksen fruktoosi-6-fosfaatiksi. Tämä entsyymi on erityisen tärkeä paljon energiaa vaativassa lentämisessä, jossa se osallistuu nopeasti ATP-energiamolekyyliä kuluttavien lentolihasten energiataseen täydennykseen. Hyönteisten lentolihakset kuluttavat poikkeuksellisen määrän energiaa ja siten monen glykolyyttisen entsyymin on toimittava tässä liikuntamuodossa lähellä maksimitasoaan (Suarez 2000). PGI-geenin tiettyjen alleelimuotojen onkin osoitettu olevan yhteydessä verkkoperhosen leviämistehokkuuteen uusille populaatioille ja populaation kasvuun (Haag ym. 2005, Hanski & Saccheri 2006). Sen geenitason vaihtelun on osoitettu vaikuttavan myös monen muun lajin elinkelpoisuuteen ja siten tämä entsyymi toimii hyvänä esimerkkinä alleelivaihtelun vaikutuksesta populaatiotasolle asti (Patarnello & Battaglia 1992, Katz & Harrison 1997, Dahlhoff & Rank 2000).

### 3 ANALYYSILAITTEISTOT JA -OHJELMAT

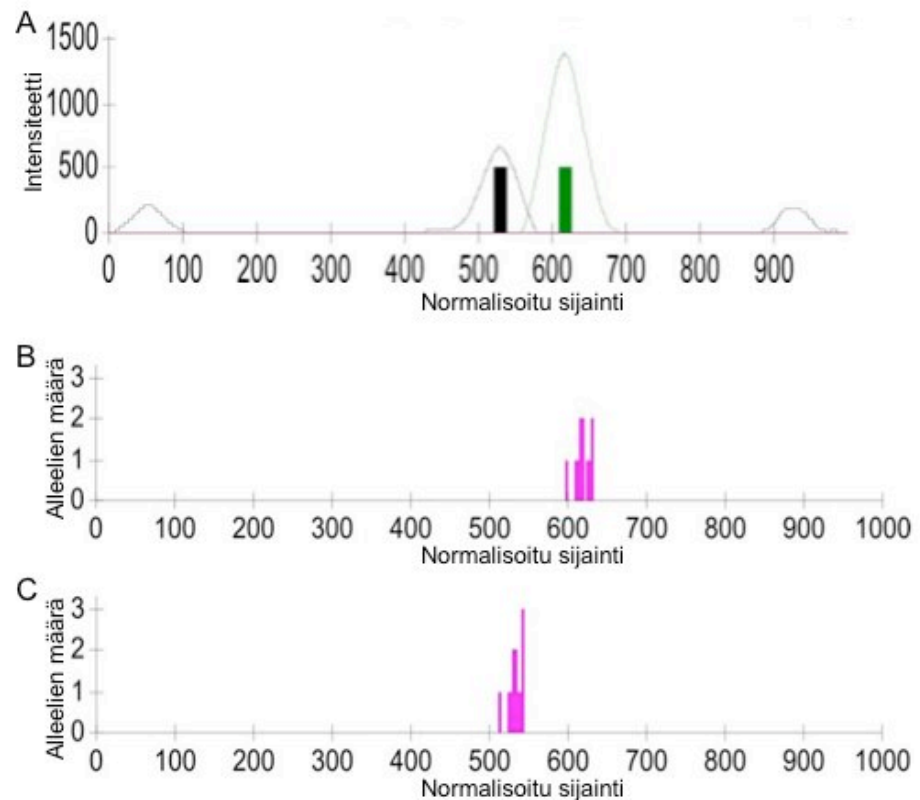
#### 3.1 MegaBace 1000 DNA –analysaattori

MegaBace 1000 DNA –analysaattorin (GE Healthcare) toiminta perustuu kapillaarielektroforeesiin, jonka avulla laite erottelee DNA:n koon mukaan ja piirtää tästä elektroferogrammin (MegaBACE SNP Profiler User's Guide Version 1.0). Laitteessa voidaan ajaa näytteitä 96:ssa kapillaarissa rinnakkain. Käytetyt kapillaarit ovat sisähalkaisijaltaan 75 µm, ulkohalkaisijaltaan 200 µm ja niiden detektiopituus on 40 cm. Sekvensaattorin toiminta perustuu kapillaarien lineaariseen polyakryyliamiditäytteeseen, jonka avulla tapahtuu näytteen pituuserottelu. Analysaattoria voidaan käyttää perinteiseen sekvensointiin, SNP-genotyypitykseen ja mikrosatellittianalyysiin.

Näytteet syötetään ajolaitteeseen 96-kuoppalevyllä jännitepulssin avulla, jolloin pieni osa kaikista levyn fluoresoivista näytteistä imaistaan kapillaareihin. Tämän jälkeen ne liikkuvat kapillaarien täyteaineessa kokonsa mukaan, lyhyet pisimmälle aivan kuten tavallisessa agarosigeelissä. Laitteen laservalo virittää näytteen fluoresoivaa leimaa, joka puolestaan alkaa emittoida fluoresoivaa valoa. Tämä valo suodatetaan neljän eri suodattimen avulla valon intensiteetin monistavaan putkeen, PMT-putkeen (Photo Multiplier Tube). Kahden PMT-putken avulla näytesignaalit saadaan monistettua ja muunnettua sähköiseen muotoon, josta tuloksenkäsittely yksikkö piirtää elektroferogrammin.

SNP-genotyypitys MegaBace-laitteistolla yhdistettynä SNUPe-tekniikkaan perustuu juuri ennen SNP-lokusta sitoutuneeseen koettiin, johon SNUPe-reaktiossa liitetään entsyymaattisesti leimattu dideoksinukleotidi. Tämä nukleotidi siis vastaa lokuksen SNP-genotyyppiä. Megabace-laitteella saadut genotyypitystulokset voidaan analysoida valmistajan SNP profiler –ohjelman avulla. Genotyypitys tapahtuu ohjelmaan syötetyn SNP-typin perusteella eli ohjelma hakee elektroferogrammista ennalta määritettyjä nukleotidipiikkejä. Ohjelma myös analysoi piikkien intensiteetin ja liikkuvuuden matriisissa, jolloin tulosten luotettavuutta on helpompi arvioida ja mahdolliset taustan aiheuttamasta kohinasta johtuvat väärät positiiviset tulokset on helpompi havaita. Analyysituloksen luotettavuudesta kertova piikkien intensiteetti ja suhteellinen liikkuvuus on mahdollista havainnoida histogrammista, sironakuvaajasta tai numeerisena arvona. Kuvassa 7 on esitetty erään tässä opinnäyte-

työssä analysoidun SNP-lokuksen genotyypistystulos sekä histogrammit. Kuvasta käy ilmi, että kyseinen näyte on ollut SNP-tyypiltään heterotsygootti (kuva 7a). Histogrammit kuvaavat näytesarjan alleelityyppien lukumäärää ja normalisoitua liikkuvuutta geelijaossa (kuvat 7b ja c). (MegaBACE SNP Profiler User's Guide Version 1.0)



Kuva 7. A) Yksittäisen näytteen elektroferogrammi, jossa G-alleeli on merkitty mustalla palkilla ja A-alleeli vihreällä. B) Kaikkien samassa ajossa mukana olleiden näytteidien A-alleelien histogrammi. C) G-alleelien histogrammi.

Mikrosatelliittianalyysi MegaBace-tekniikalla perustuu lokuksen sisältävän alueen PCR-tuotteen pituuden määrittämiseen leimatun alukkeen avulla. Mikrosatelliitteja voidaan analysoida useita eri lokuksia samasta reaktioseoksesta, hyvin suunniteltuna jopa 15 eri lokusta. Tällöin puhutaan paneeleista. Paneelin suunnittelussa on tärkeää välttää samalla leimalla merkattujen lokusten päällekkäinen kulkeutuminen kapillaarissa. Näin analyysissä voidaan siis käyttää samaa leimaa useampaan lokukseen, kunhan niiden pituusvaihtelu ei ole päällekkäistä. Tällainen näytelokusten ryhmittely säästää merkittävästi aikaa ja kustannuksia. Mikrosatelliittien analyysissä voidaan hyödyntää MegaBace-ajon jälkeen valmistajan Fragment Profiler –

ohjelmaa, jolla voidaan analysoida automattisesti esimerkiksi näytteen mikrosatelliittilokusten pituudet, alleelien jakaumat ja tulosten luotettavuuden.

### 3.2 LightCycler 480 reaaliaikainen qPCR –analysaattori

LightCycler 480 qPCR –laite (Roche) sopii 96- ja 384-levyjen ajoon, koska sen näyteyksikkö on laitteen käyttäjän vaihdettavissa (LightCycler 480 Instrument Operator's Manual Software version 1.5, Roche Diagnostics). Laitteen näytetilä sisältää kuusi Peltier-elementtiä, jotka mahdollistavat nopean lämmönsiirron ja siten lyhyet ajoajat. Reaaliaikainen qPCR –analyysi voidaan suorittaa näin alle 40 minuutissa. Laitteen toiminta perustuu jokaisen monistussyklin yhteydessä mitattavaan näytteeseen lisätyn kaksijuosteiseen DNA:han sitoutuvan fluoresoivan leiman tai jollain fluoroforilla leimatun sekvenssispesifisen oligonukleotidin leiman intensiteetin mittaukseen. Mittaus voidaan suorittaa myös monistuksen jälkeen sulamiskäyrän yhteydessä, jolloin seurataan missä lämpötilassa tietyn DNA-pätkän juosteet eroavat toisistaan ja fluoresoivan leiman lähettämän signaalin intensiteetti laskee. Tällaista PCR-monistuksen jälkeistä analyysiä käytetään paljon genotyypityksessä.

Laitteen havainnointiyksikkö koostuu ksenonlampusta, joka emittoi valoa laajalla aallonpituusalueella 430-630 nm. Lampun jälkeen näytteen leimaa virittävä valo ohjataan nestemäisen valo-ohjaimen avulla eksitaatiosuodattimille. Viiden suodattimen avulla valitaan sopiva aallonpituus virittämään näytteen leimaa. Valo ohjataan näytelevylle linssin läpi, niin että se osuu 2°:n kulmassa kaikkiin näytekaivoihin. Tämän jälkeen näytteen lähettämä emissio kerätään kuuden emissiosuodattimen avulla CCD-kameralle. Emissiosuodattimet mahdollistavat useamman eri aallonpituuden mittauksen nopeasti peräjäälkeen samasta näytekaivosta eli analyyseissä voidaan käyttää multipleks-tekniikkaa. Ksenonlampun lähettämän valon intensiteettiä mitataan samanaikaisesti rinnakkaisella referenssikanavalla, jolloin sen intensiteettivaihtelut eivät vaikuta näytteestä mitattavan emission voimakkuuteen.

#### 4 TYÖN TAVOITTEET

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli pystyttää uusia ja optimoida jo aikaisemmin käytettyjä SNP-genotyypitysmenetelmiä verkkoperhoselle. Ensimmäisenä tavoitteena oli optimoida jo aikaisemmin tutkitun PGI-geenin kolmen eri SNP-lokuksen PCR-monistus, joka on aikaisempien analyysien yhteydessä osoittautunut vaikeaksi. Tämän työvaiheen hyvä monistusteho on edellytys geenin onnistuneeseen genotyypitykseen SNUPe-menetelmällä ja minisekvensoinnilla. Tässä opinnäytetyössä etsittiin myös vaihtoehtoista tekniikkaa PGI-geenin SNP-analyysille, koska aikaisemmin käytetty SNUPe-menetelmä yhdistettynä automaattiseen minisekvensointiin on osoittautunut työlääksi ja tulokset laadultaan vaihteleviksi. Työssä kehitettiin kvantitatiiviseen PCR-analyysiin perustuvaa SNP-genotyypitystä, joka pohjautui kahden tyyppiin hybridisaatiokoettiin; SimpleProbe- ja HybProbe-tekniikoihin.

Työn toisessa osassa karakterisoitiin uusia SNP- ja mikrosatelliittilokuksia. Tarkoituksena oli seuloa suuresta geenijoukosta sopivia geenimarkkereita myöhempiä analyysijä varten. Työ alkoi laajalla bioinformatiikan osuudella, jossa etsittiin useita eri genomisia tietokantoja hyväksi käyttäen markkerit sisältävien geenien rakenteet, intronien ja eksonien paikat sekä mikrosatelliittien yhteydessä myös UTR-alueet (Untranslated Region). Näitä alueita tunnistettiin etsimällä tietokannoista lähilajien homologisia eli samasyntyisiä geenejä. Tämän jälkeen analysoitaviin lokuksiin suunniteltiin sopivat PCR-alueet ja niiden toiminta varmistettiin sekvensoimalla monistustuotteet. Lopuksi parhaiten monistuvat SNP- ja mikrosatelliittilokukset genotyypitettiin käyttäen SNP-markkereiden analysointiin SNUPe-menetelmää yhdistettynä automaattiseen minisekvensointiin ja mikrosatelliittilokusten analysointiin leimattujen alukkeiden ja minisekvensoinnin yhdistelmää. Mikrosatelliittianalyysissä oli myös tavoitteena selvittää, esiintyy lokuksissa geenimarkkereilta vaadittavaa vaihtelua eli polymorfismia eri populaatioiden välillä.



## 5 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

### 5.1 *PGI*-geeni

*PGI*-geenin sekvenssi ja tutkittujen SNP-lokusten tyyppi sekä sijainti ovat liitteessä 1. Kaikki *PGI*-geenin monistuksessa ja genotyypityksessä käytetyt alukkeet ovat taulukossa 1.

Taulukko 1. *PGI*-geenin SNP-lokusten monistuksessa ja genotyypityksessä käytetyt alukkeet ja koettimet.

SNP-lokus	Nimi	Tyyppi	Sekvenssi	*Modifikaatiot
PGI 1	PGI49	PCR-aluke	CCGTGTACTIONGAAAACCTTTATT	
	PGI230	PCR-aluke	ATTTTAAATAATATCGCACAA	
	PGI1-101F	qPCR-aluke	CCGTGTACTIONGAAAACCTTTATT	
	PGI1-101R	qPCR-aluke	CCAAATCTATTTGTGAAATAAATATTATC	
	PGI1-H1	HybProube	TCCACAACATTTCAACATGATCC*	3'-FL
	PGI1-H2	HybProube	*AAAGGTTAATAAGTTCAGGTTTGTGCG*	5'-LC610, 3'-PH
PGI 2	209F	PCR-aluke	TAGATGCTGCTGCCTTGTC	
	340R	PCR-aluke	CTTGCCGTTGACTAAGATAGG	
	PGISNP2-F100	PCR-aluke	GTCAAAGATCAACTTCACTGAG	
	PGISNP2-R100	PCR-aluke	CCTTCCACTTGCCACTGATAA	
	PGI2-102F	qPCR-aluke	GTGAATAGATTTATCCAATTAAGTTATAC	
	PGI2-102R	qPCR-aluke	CAGCATTGACATCAGGAGTAAC	
	PGI2-H1	HybProube	CAAAAGATCAACTTCACTGAGGATCGT*	3'-FL
	PGI2-H2	HybProube	*AGTACTACACATAGCATTGTAATAGACA*	5'-LC640, 3'-PH
PGI 3	PGI32	PCR/qPCR-aluke	YTTTCTAYTAGATTCGCAGCGT	
	PGI35	PCR/qPCR-aluke	GTACCTGGTCCCTGGTGTA	
	PGI3SP1	SimpleProbe	CTACACA*TAGCACTTCGTAATAGACA*	Fluoresoiva XT-leima, 3'-PH
	PGI3-103F	qPCR-aluke	ACTTATAATTTAAATTAATTATGGTCCG	
	PGI3-103R	qPCR-aluke	CAGCTGGTAGAAGGCGT	
	PGI3-H1	HybProube	AAGGCGACATGGAGAGCA*	3'-FL
	PGI3-H2	HybProube	*CGGTAATACGTCACACGTGGG*	5'-LC670, 3'-PH

### 5.2 Kolmen eri SNP-lokuksen PCR-monistuksen optimointi

PCR-optimointi aloitettiin tutkimalla kuinka paljon ja minkä laatuista DNA:ta verkkoperhosen toukkanäytteistä saadaan Macherey-Nagel Genomic DNA from Tissue –reagenssipakkauksella. Tätä varten eristettiin kymmenestä aikaisemmin Ranskasta kerätyistä perhosen toukista genominen DNA valmistajan ohjeen mukaisesti. Toukat punnittiin, jotta niiden massa voitiin ottaa huomioon saantoa laskettaessa. Eristetyn DNA:n konsentraatiot mitattiin spektrofotometrisesti mittaamalla näytteen absorbanssi aallonpituudella 260nm (HP 8452A, Hewlett Packard, Saksa). Näytteen laatua arvioitiin myös agarosigeelillä (0,6 % SeaKem LE agarosi). Agarosigeeliin lisättiin 0,2 µg/ml etidiumbromidia ja ajo tapahtui 1xTBE-puskurissa (89 mM Tris, 89 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8,3).

DNA-näytteen lisäämismahdollisuutta testattiin monistamalla näytettä sattumanvaraisten alukkeiden avulla GenomiPhi V2 –reagenssipakkauksella.

Monistaminen tehtiin kahdesta edellä eristetystä DNA-näytteestä, näytteet 3 ja 6, valmistajan ohjeiden mukaisesti (GE Healthcare). Monistettu näyte puhdistettiin käyttämättä jääneistä alukkeista, heksameereista, MicroSpin G-50 kolonnilla edelleen valmistajan ohjeiden mukaisesti (GE Healthcare). Saadut näytekonsentraatiot mitattiin spektrofotometrisesti kuten edellä ja näytteen laatu tarkastettiin monistamalla PGI SNP-lokukset rinnakkain alkuperäisistä näytteistä ja GenomiPhi-lisätyistä näytteistä.

PCR-monistuksessa optimoitavia parametrejä olivat: templaatin määrä, alukkeiden sitoutumis- eli anniilauksilämpötila gradienttiajolla, dNTP-, aluke- ja magnesiumkonsentraatiot. PCR-monistuksessa käytettiin DynaZyme II –entsyymiä (FinnZymes). Työssä testattiin myös DMSO:n ja BSA:n vaikutusta monistustehoon. Reaktioseokseen kokeiltiin myös lisätä prosessiivempää iProof (Bio-Rad) entsyymiä DynaZyme II DNA-polymeraasin lisäksi. Lopuksi testattiin vielä sisältääkö näyte DNA-polymeraasin synteesitehoa laskevia, sen toimintaa haittaavia, inhibiittoreita kuten esimerkiksi fenolisia yhdisteitä. Tämä testattiin monistamalla aikaisemmin tehokkaasti monistunutta plasmidinäytettä (pCI-neo 48K –konstruktio) sekä iProof että Dynazyme II –entsyymeillä. Tähän hyvin monistuvaan näytteeseen lisättiin eri määriä toukan DNA:ta, jolloin sen mahdollisesti sisältämä inhibiittori vaikuttaisi myös plasmidin sisältämän 48K-proteiinin monistumiseen. Monistuminen havainnoitiin agarosigeelillä kuten edellä. Kaikissa PCR-monistusvaiheissa käytettiin DNA Engine –laitetta (MJ Research) ja taulukossa 1 esitettyjä PCR-alukkeita.

Lopuksi heikoimmin monistuvaan PGI SNP2 -lokukseen suunniteltiin uudet PCR-alukkeet (Primer3-ohjelma v.0.4.0. <http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>). Myös nämä alukkeet ovat taulukossa 1 (PGISNP2-F100 ja –R100). Reaktio-olosuhteet tarkastettiin näille uusille alukkeille sopiviksi.

### 5.3 SNP-genotyypitys qPCR-menetelmällä

qPCR-pohjaisessa genotyypityksessä testattiin SimpleProbe- ja HybProbe-tekniikoita. Analyysit tehtiin LightCycler 480 v.2.0 –reaaliaikaisella qPCR-laitteella (Roche) ja tulokset käsiteltiin LightCycler 1.5 –analyysiohjelmalla (Roche). Näytteinä käytettiin aikaisemman tutkimuksen yhteydessä eristettyä verkkoperhosen toukka-DNA:ta. SimpleProbe-menetelmää käytettiin vain

PCR-optimoinnin yhteydessä parhaiten monistuneeseen PGI SNP 3 – lokukseen. Koetin suunniteltiin Roche Diagnosticin suositusten mukaisesti, ilman erityistä suunnitteluohjelmaa (taulukko 1). Ajossa käytettiin samoja alukkeita kuin edellä PCR-optimoinnissa. qPCR-ohjelma on liitteessä 2. Reaktioseoksessa testattiin erilaisia reagenssipitoisuuksia, mutta parhaimmat tulokset saavutettiin olosuhteilla: 20 ng genomista DNA:ta, 1:20 laimennus LightCycler 480 Genotyping Master mix, 2,25 mM lisättyä  $MgCl_2$ , 0,5  $\mu M$  molempia alukkeita sekä 0,2  $\mu M$  SimpleProbe-koetinta. Reaktion totaalivolyymi oli 10  $\mu l$  ja ajossa käytettiin 384-kuoppalevyjä (LightCycler 480 Multiwell Plate 384, Roche).

HybProbe-tekniikkaa käytettiin kaikkien kolmen PGI SNP –lokusten genotyyppitykseen. Myös tämän työvaiheen koettimet suunniteltiin Roche Diagnosticin suositusten mukaisesti, (Roche Molecular Biochemicals Technical Note No. LC 6/99) ilman erityistä suunnitteluohjelmaa. Koettimet ja käytetyt alukkeet ovat taulukossa 1. Tätä genotyyppitysmenetelmää optimoitiin ajamalla kukin SNP-locus erillisessä reaktiossa sekä yhdessä reaktioseoksessa eli multiplex-formaattissa. Reaktioseoksissa käytettiin LightCycler 480 Genotyping Master –reagenssia ja optimoinnissa seurattiin suurelta osin Roche Molecular Biochemicals Technical Note No. LC 9/2000 –ohjetta. Tuotteen monistuminen tarkastettiin optimoinnin aluksi ajamalla lopputuote agarosigee-lissä sekä käyttämällä LightCycler 480 SYBR Green I Master –reagenssia (Roche), jolloin monistumistehoa oli mahdollista seurata SYBR Green –kemian ja monistumiskuvaajien avulla. Parhaat genotyyppitystulokset multiplex-tekniikalla saavutettiin reaktioseoksella: 5 ng genomista DNA:ta, 1:5 laimennus LightCycler 480 Genotyping Master mix, 1,0  $\mu M$  kutakin aluketta sekä 0,2  $\mu M$  hybridisaatiokoettimia. Reaktion totaalivolyymi oli 10  $\mu l$  ja tässäkin analyysissä käytettiin 384-kuoppalevyjä. Ajo-ohjelma on liitteessä 2.

#### 5.4 Uusien SNP-lokusten karakterisointi

Tässä opinnäytetyössä oli mukana SNP-genotyyppityksessä alkujaan 40 verkkoperhosen geenii (liite 3), joista seulottiin sopivat geenit ja lokukset varsinaisiin analyysiin. Jokaisen geenin rakenteet pyrittiin selvittämään sekvenssivertailujen avulla. Ennustettujen eksoni-intronirakenteiden perusteella kustakin geenistä valittiin sopivimmat lokukset PCR-monistukseen. Edelleen tehokkaasti monistuvat geenialueet, jotka sisälsivät SNP-markkerit,

sekvensoitiin oikean monistustuotteen varmistamiseksi. Lopullisessa SNUPe-genotyypityksessä oli mukana 18 SNP-lokusta 17:sta eri geenistä ja 4 negatiivisena kontrollina toimivaa lokusta, joissa ei odotettu polymorfismia.

#### 5.4.1 Bioinformatiikka ja PCR-monistus

Geenien rakenteiden ennustamiseen käytettiin GenBank (NCBI, National Center for Biotechnology Information) sekä Ensembl –tietokantoja, joista etsittiin muiden lajien vastaavia geenejä. Käytettyjä lajeja olivat: *Bombyx mori*, *Apis mellifera*, *Toxoptera citricida*, *Aedes aegypti*, *Xenopus laevis*, *Drosophila melanogaster* ja muutamien geenien yhteydessä myös ihminen (*Homo sapiens*). Haku tehtiin valtaosassa geeneistä NCBI:n tBLASTx-haulla käyttäen tunnettua verkkoperhosen EST-sekvenssiä (Expressed Sequence Tag). Tämä haku etsii käännetyn nukleotidisekvenssin avulla mahdollisimman samankaltaisen käännetyn nukleotidisekvenssin tietokannasta. Tämän haku-toiminnon avulla etsittiin lähilajin lähetti-RNA sekvenssi sekä WGS-sekvenssi (Whole Genome Shotgun). Lähetti-RNA sekvenssin avulla oli mahdollista paikantaa oikea alue pitkästä WGS-sekvenssistä. Lopuksi tätä genomista sekvenssipätkää käytettiin tunnistamaan verkkoperhosen EST-sekvenssin eksoneiden rajat ja arvioimaan introneiden pituuksia. Tunnistuksessa käytettiin GenBank –tietokannan Spidey-työkalua (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Ostell/Spidey/>).

Geenirakenteiden arvioinnin pohjalta jokaisesta geenistä valittiin ne verkkoperhosen SNP-lokukset, joiden sijainti sekä tunnettu polymorfismi olivat genotyypitykseen sopivimpia. Tällaiselle alueelle suunniteltiin Primer3-ohjelmalla PCR-alueet (liite 3) ja monistuminen testattiin muutamalla eri toukkanäytteellä. Pisimmät monistustuotteet (>200 bp) eristettiin suoraan agarosigeelistä sekvensoitaviksi NucleoSpin Extract II –reagenssipakkauksella (Macherey-Nagel). Sekvensointi tehtiin toisella PCR-monistuksessa käytetyistä alueista. Lyhyemmät monistustuotteet kloonattiin ensin TOPO TA Cloning PCR 2.1 –kloonauspakkauksella valmistajan ohjeiden mukaisesti (Invitrogen) ja sekvensoitiin tämän jälkeen plasmidin T7-alueella (5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3'). Lyhyiden monistustuotteiden kloonaus tehtiin parempilaatuisen sekvenssin saamiseksi.

Lopuksi valitut SNP-lokukset monistettiin SNUPe-reaktiota varten. Näytteinä käytettiin viittätoista aikaisemmin Ahvenanmaalta kerättyä verkkoperhosen siiven DNA-näytettä ja seitsemää Länsi-Ranskasta kerättyä toukkanäytettä.

DNA:t oli eristetty jo valmiiksi aikaisempien tutkimusten yhteydessä. PCR-reaktio sisälsi: 0,750  $\mu$ M kutakin aluketta, 350  $\mu$ M dNTP:tä, 10-150 ng DNA-templaattia, 1x F511 reaktiopuskuria ja 0,02 U/ $\mu$ l DynaZyme II entsyymiä (Finnzymes). Monistuksessa käytettävät olosuhteet olivat: 5 min 95 °C, 1 min 94 °C, 30 s 54 °C, 40 s 72 °C. Reaktiosyklejä oli yhteensä 40.

Lopuksi monistustuotteet tarkastettiin ajamalla 5  $\mu$ l PCR-tuotetta 1 % aga-roosigeelissä. Tämän jälkeen PCR-reaktioista osa (5  $\mu$ l) puhdistettiin ylimääräisistä nukleotideista ja alukkeista Exonuclease I ja Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) –entsyymeillä (Fermentas). Puhdistuksessa käytettiin vain puolet valmistajan suosittelemasta entsyymimäärästä, koska tämä määrä on osoittautunut riittäväksi aikaisempien analyysien yhteydessä (5 U Exonuclease I ja 1 U Shrimp Alkaline Phosphatase -entsyymiä). Muilta osin puhdistuksessa seurattiin valmistajan ohjeita.

#### 5.4.2 SNuPe-tekniikka ja Megabace-minisekvensointi

SNuPe-reaktioissa käytettiin SNuPe premix –reagenssia (GE Healthcare). Reaktiot sisälsivät 1  $\mu$ l SNuPe premix –reagenssia, 0,2  $\mu$ M SNP-koetinta ja 1-3  $\mu$ l puhdistettua PCR-tuotetta 10  $\mu$ l:n reaktiovolyymissä. SNP-koettimet on listattu taulukossa 2. Alukkeet suunniteltiin sekvenssiin juuri ennen SNP-lokusta ilman erillistä suunnitteluohjelmaa. SNuPe-reaktiossa käytettiin PCR-laitetta ja reaktio-ohjelma sisälsi 25 monistussykliä olosuhteilla: 10 s 96 °C, 5 s 50 °C, 10 s 60 °C. Reaktion jälkeen tuote puhdistettiin ylimääräisistä nukleotideista SAP-entsyymillä (1 U, 30 min 37 °C, 15 min 65 °C) (GE Healthcare).

*Taulukko 2. SnuPe-reaktioissa käytetyt koettimet. Frekvenssi kertoo harvinaisemman SNP-alleelin esiintymistiheyden.*

Geenin numero	Geenin nimi (KO kuvaus)	Koetin	SNP-tyyppi	Frekvenssi
1	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	GAGTATGTCGTAGAAATCAACTG CAGTTGATTCTACGACATACTC	Neg. kontrolli: G CT	0.00 0.11
3	Alcohol dehydrogenase	CRITCATAAYCACTCCTCCAT GGCGCCACTGACAC	Neg. kontrolli: T CT	0.00 0.17
5	Aldehyde dehydrogenase (NAD <sup>+</sup> )	CTGGCAATTTTCATGTC	Neg. kontrolli: A	0.00
6	Phosphoglycerate mutase	CCAGCAATGGAAAAGG TCTACGCCAAATTTGCA	Neg. kontrolli: A GT	0.00 0.11
9	Aldose 1-epimerase	GCAAGGTTATCTTCAGCTAC	TC	0.25
10	6-phosphofruktokinase	ACTTTGCCCAAGAATAC	CT	0.15
14	Ribulose-phosphate 3-epimerase	ATTTGGTGGACAAAAGTT	TC	0.29
15	Ribose 5-phosphate isomerase A	CAACCTCCACCTCCTTT	TC	0.50
16	Ribose-phosphate pyrophosphokinase	TCTTGAGTAAGGGAAGCA	GA	0.25
18	Small subunit ribosomal protein S8e	CCATGTGCGACGTAAT AATATTAACATATGAAGCTTCAGT	TC TC	0.45 0.44
19	Large subunit ribosomal protein L11e	CAAGTCAATGTCTCTG	TC	0.13
24	Large subunit ribosomal protein L24e	AGAGGTTAAGAAAGGGACG	GT	0.18
29	Small subunit ribosomal protein S8e	ATTCCTGGGGATCAGA	AG	0.26
32	Large subunit ribosomal protein L4	AGGATTTAGAGGTACCAACAGA	GA	0.43
34	Small subunit ribosomal protein S23e	CGGTTGTTGAACCAT	CT	0.46
37	Large subunit ribosomal protein L27Ae	GTTGAACCTTGACAAGCT	TC	0.50
39	Large subunit ribosomal protein L23e	ACACTCCTTAGCTACGGG	CT	0.38
40	Small subunit ribosomal protein S27Ae	CAGAAGGAATCGACCCT	TC	0.40

MegaBace-ajoon pipetoitiin 5 µl SnuPe-tuotetta, 5 µl H<sub>2</sub>O, 5 µl latauspuskuria ja 0,008 µl injektioaerua (MegaBACE SnuPe Genotyping Kit, GE Healthcare). Reaktiot analysoitiin automaattisella minisekvensaattorilla, MegaBace 1000 –kapillaarilaitteella (GE Healthcare, GmbH, Germany). Tulokset käsiteltiin SNP profiler –ohjelmalla (GE Healthcare). Kaikki ohjelman analysoimat elektroferogrammit käytiin läpi myös manuaalisesti tulosten varmistamiseksi. Lopuksi epäselvät tulokset analysoitiin uudelleen, useimmissa tapauksista aloittaen alusta PCR-monistuksesta. Näissä varmistus-analyseissa nukleotidireaktiossa käytettiin selvemmän tuloksen saamiseksi 1 µl:n sijaan 3 µl SnuPe premix –reagenssia.

## 5.5 Mikrosatelliittianalyysit

Mikrosatelliittianalyseissa seulottiin suuresta geenimarkkerilistasta sopivimmat, hyvin monistuvat lokukset MegaBace-analyysiin. Kaikki mikrosatelliittianalyysissä mukana olleet geenit ovat liitteessä 4. Mikrosatelliittien vaihtelua tutkittiin lopulta kahdeksasta eri lokuksesta. Nämä geenit ja käytetyt PCR-alkueet ovat taulukossa 3.

*Taulukko 3. MegaBace-analyysissä mukana olleet geenit, homologin nimi, NCBI-numero, toistoyksikön tyyppi ja käytetyt PCR-alueet. Alukkeisiin on lisäksi merkitty niissä käytetyt 5'pään leimat.*

Numero	Homologin nimi	NCBI-numero	Toistoyksikkö	PCR-alueet ja leima
1	VPS72_DROME	Q9VKM6	AAG	Hex-GGCAATGCTATGGCAAAGTT TTGATCCGAAACTGGTTCATC
11	Q17L27_AEDAE	Q17L27	AAGAG	Hex-GAACTGTTATCATTTC AACCTTCC TGATAGTGATCTATATCTTGAAGAACG
17	Q6XJ11_DROYA	Q6XJ11	CCG	Fam-GCGTTAAATGACGCACCATA CTCCAGCGAAACCTCAGTTC
32	Q5UAL8_BOMMO	Q5UAL8	AAG	Fam-GGCTAAGCAGCCTCAGAAA CAGCTTGTACTGTGGCACTTCT
33	Q16UH6_AEDAE	Q16UH6	AAG	Tet-TCCTCGGTACCTCTGTCCAC CACGCTCGGAAATGACTTTA
36	Q1HQ22_BOMMO	Q1HQ22	AAC	Tet-TTCAAACCTGGTGGCATA GACAAATTGACTTTTGGTAACACC
37	Q5YJK1_MAMBR	Q5YJK1	AAG	Hex-CTGGCCAACATCATCGTCTA TGACGTTATCCACGGATTGA

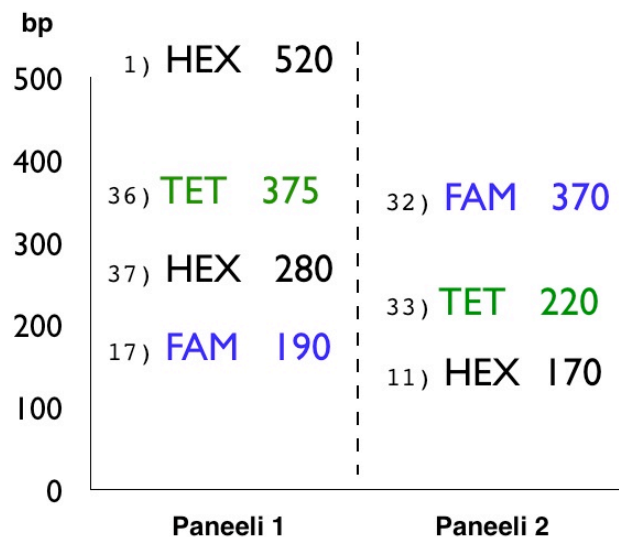
### 5.5.1 Bioinformatiikka

Sekvenssivertailuilla pyrittiin tunnistamaan mikrosatelliitin sisältävän geenin rakenteet. Kaikki mukana olleet geenit ovat liitteessä 4. Sekvenssivertailuilla pyrittiin selvittämään sijaitseeko mikrosatelliitiksi tunnistettu lokus UTR-alueella vai koodavassa osassa geeniä. Lokukset, jotka näyttivät sekvenssivertailun perusteella sijaitsevan eksonissa hylättiin, lukuunottamatta kolmen nukleotidin toistojaksoja eli triplettitoistoja. Muut kuin triplettitoistot eksoni-alueilla sotkisivat geenin lukukehysten, joten tällaiset lokukset eivät ole todennäköisiä käyttökelpoisia geenimarkkerilokuksia.

Mikrosatelliittien sekvenssivertailuissa käytettiin GenBank ja Ensembl sekvenssietokantoja kuten edellä SNP-analyysissä. Myös PCR-alueet, alustava PCR-monistus, jossa testattiin alueiden toiminta, ja monistustuotteen varmistaminen tehtiin samoilla menetelmillä. Kaikkien alukeparien 5'pään alue eli ns. forward-alue oli leimattu 6-FAM, TET tai HEX leimalla. Leima oli liitetty alueen 5'pään. Mikrosatelliittianalyysissä käytettiin 40:ä Ahvenanmaan verkkoperhosten siipinäytteistä jo aikaisemmin eristettyä DNA-näytettä. Näytteet edustivat eri alapopulaatioita niin, että samasta populaatiosta oli korkeintaan kaksi näytettä. Lisäksi mukana oli seitsemän Raskasta kerättyä näytettä.

### 5.5.2 MegaBace-analyysi

Analyysit tehtiin kahdessa eri paneelissa, koska mikrosatelliittien toistojaksojen pituusvaihtelusta ei ollut etukäteistietoa. Näin pyrittiin välttämään samalla leimalla merkittyjen monistustuotteiden päällekkäisyys. Paneelien ryhmittely on esitetty kuvassa 8. MegaBace-analyysiin tehdyt PCR-reaktiot sisälsivät 200 mM kutakin dNTP-molekyyliä, 0,35  $\mu$ M molempia alukkeita, 1x F-511 DynaZyme reaktiopuskuria, 0,02 U/ $\mu$ l DynaZyme II polymeraasia (FinnZymes) sekä 20-40 ng DNA-templaattia. Reaktio tehtiin 20  $\mu$ l:n totaali tilavuudessa. Monistusreaktio sisälsi 40 sykliä olosuhteilla: 10 min 95 °C, 60 s 94 °C, 30 s 55 °C, 50 s 72 °C ja viimeinen ekstensiovaihe 7 min 72 °C. Kaikki monistusreaktiot tehtiin erikseen ja saman paneelin tuotteet yhdistettiin vasta PCR-reaktion jälkeen, kun näytteen monistuminen oli vielä tarkastettu agarosigeelillä. Reaktiot laimennettiin ennen sekoitusta 1:100 ja tästä seoksesta otettiin analyysiin 3  $\mu$ l. Näyte sekoitettiin 12  $\mu$ l:aan Et-ROX 550 pituusstandardin laimennusta (1:47) (GE Healthcare). Näytteet ajettiin 96-kuoppalevyllä Megabace 1000 –kapillaarilaitteella (GE Healthcare, GmbH, Germany). Mikrosatelliittitulosten analysointiin käytettiin laitteen valmistajan Fragment Profiler 1.2 –ohjelmaa. Näytteistä ajettiin kaksi rinnakkaista ajoa tulosten varmistamiseksi.



Kuva 8. Mikrosatelliittilokusten MegaBace-ajoissa käytetyt paneelit. Paneeleissa on esitetty tutkitun geenin numero, käytetty leima ja sen väri sekä suuntaa antava tuotteen pituus.



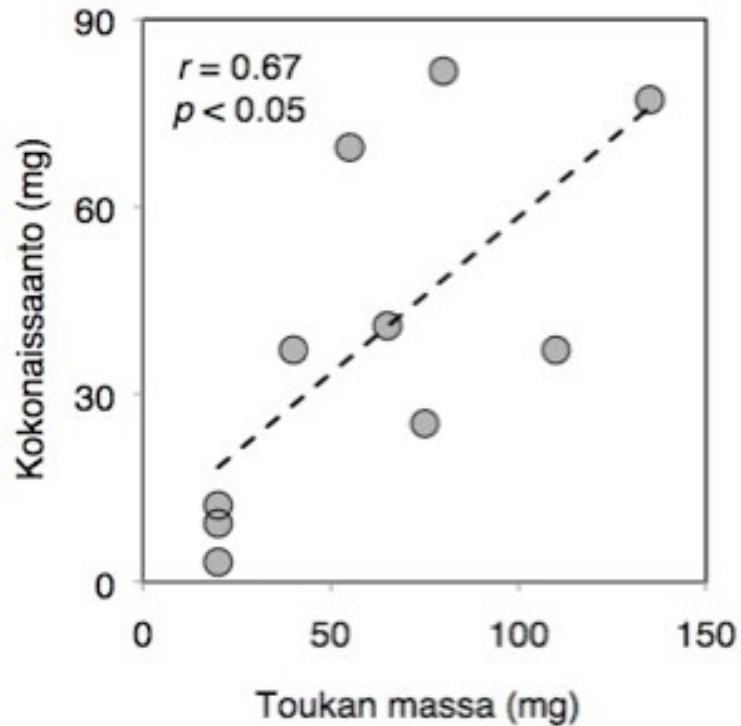
## 6 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU

### 6.1 DNA-eristys ja näytteen lisääminen

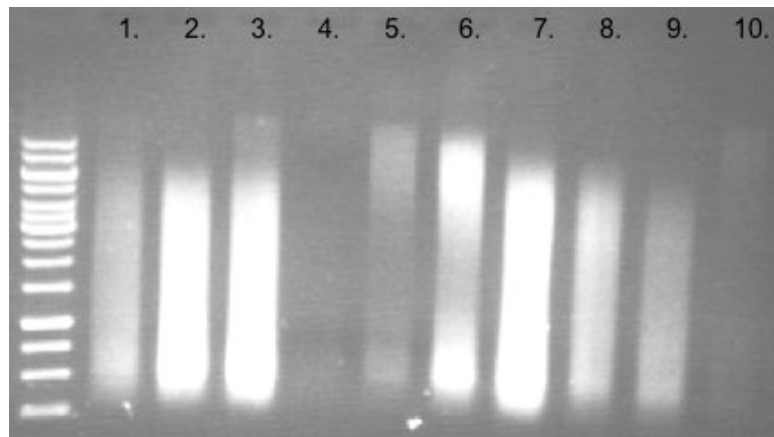
Eristetyn DNA:n laatu ja määrä vaihtelivat paljon eri toukkanäytteiden kesken. Taulukossa 4 on esitetty eristetyn DNA:n konsentraatiot, kokonaissaanto, saanto massaa kohden ja DNA:n puhtaudesta kertova  $A_{260}/A_{280}$  –suhdeluku. Konsentraatiot vaihtelivat paljon, välillä 105 – 2724 ng/ $\mu$ l. Saannossa toukan massan suhteen oli myös suurta vaihtelua, vaikka suurista toukista saatiinkin odotetusti keskimäärin enemmän DNA:ta (Spearmanin korrelaatio; kuva 9). Saanto oli muutaman toukkanäytteen kohdalla epäilyttävän suuri ja onkin mahdollista että näytteeseen jääneet väripigmentit absorboivat mittausaallonpituudella nostaa saantoa. Saantoa on voinut nostaa myös näytteeseen jäänyt RNA. Puhtaudessa ei ollut suuria eroja eri näytteiden välillä, ainakaan  $A_{260}/A_{280}$  –suhdeluvun perusteella. Agarosigeeliä perusteella eristetty DNA oli osittain pieniksi fragmenteiksi hajonnutta, tosin koska näytteelle ei tehty RNAasi-käsittelyä osan pienemmistä fragmenteista on voinut aiheuttaa näytteeseen jäänyt RNA (kuva 10). Geelissä ei kuitenkaan näkynyt selviä ribosomaaliselle RNA:lle tyypillisiä raitoja.

*Taulukko 4. Eristetyn DNA:n konsentraatio, kokonaissaanto, saanto massaa kohden ja  $A_{260}/A_{280}$  –suhdeluku.*

Näyttenumero ja toukan paino (mg)	Konsentraatio (ng/ $\mu$ l)	Kokonaissaanto (mg)	Saanto massaa kohden (ng/mg)	Puhtaus $A_{260}/A_{280}$
1) 110	1236	37.08	337	1.73
2) 55	2317	69.51	1264	1.90
3) 135	2571	77.13	571	1.83
4) 20	105	3.15	158	1.76
5) 20	408	12.24	612	1.72
6) 40	1237	37.11	928	1.86
7) 80	2724	81.72	1022	1.90
8) 65	1365	40.95	630	1.85
9) 75	844	25.32	338	1.84
10) 20	311	9.33	467	1.69



Kuva 9. Korrelaatio toukan massan ja DNA-saannon välillä.



Kuva 10. Agarosigeelikuva eristetyistä perhosentoukan DNA-näytteistä. Näytteitä on pipetoitu kaivoihin sama mikrolitramäärä. Käytetyn pituusstandardin lyhyin tuote on 250 emästä ja pisin 10 000 emästä pitkä.

Eristetyn DNA:n lisäys GenomiPhi-reagenssipakkauksella toimi, mutta saanto oli valmistajan ilmoittamaa pienempi. Monistusreaktiossa käytetty 10 ng lähtömateriaalia tuotti 1,8 ja 2,1  $\mu\text{g}$  DNA:ta. Pieneen saantoon on tosin voinut vaikuttaa jo edellä mainittu näytteen sisältämien väripigmenttien tai muiden yhdisteiden DNA-konsentraatiota nostava vaikutus spektrofotometris-

sa mittauksessa. Näin monistukseen ei ole välttämättä alun perinkään laitettu todellisuudessa 10 ng:aa lähtömateriaalia. Monistetuista näytteistä eri DNA-lähtömateriaalimäärillä tehty PGI SNP2 -lokusten PCR gradienttiajolla osoitti, että GenomiPhi -monistettu näyte toimii PCR-reaktiossa yhtä hyvin tai paremmin kuin monistamaton näyte (tuloksia ei ole esitetty).

## 6.2 PGI-geenin SNP-lokusten PCR-monistuksen optimointi

Geenin SNP-lokusten monistuksen optimoinnissa jouduttiin testaamaan sekä reaktio-olosuhteet että reaktioseoksen eri komponenttien määrät. Heikko monistuminen saattoi johtua alueelta tunnistettujen vaihtelevien emäksien suuresta määrästä, jolloin ne ovat voineet haitata alukkeiden sitoutumista joissakin näytteissä. Geenin tiedetään sisältävän paljon polymorfismia. Eri-tyisesti SNP 2 -lokusten kohdalla optimointi oli vaikeaa eikä tuottanut juurikaan tulosta. Tähän lokukseen päädyttiin suunnittelemaan kokonaan uusi alukepari. Vanhojen alukkeiden ongelmana saattoi olla, että ne monistivat eksonin ylittävän monistustuotteen. Tällöin on vaarana, että jos SNP-lokusten lisäksi tiettyyn genotyyppiin liittyy muitakin geenimuutoksia, esimerkiksi intronin pituudessa, tällaiset genotyypit eivät monistu yhtä tehokkaasti. Taulukossa 5 on esitetty kaikkien kolmen PGI-geenin SNP-lokusten optimoidut PCR-olosuhteet sekä taulukossa 6 niiden PCR-ohjelmat. SNP 2-lokusten kohdalla on esitetty olosuhteet uudelle, vain eksonin monistavalle, alukeparille. Huonoa PCR-monistumista ei näyttänyt selittävän näytteeseen jääneet fenoliset yhdisteet tai muut inhibiittorit.

Taulukko 5. PGI-geenin SNP-lokusten monistukseen optimoidut reagenssimäärät.

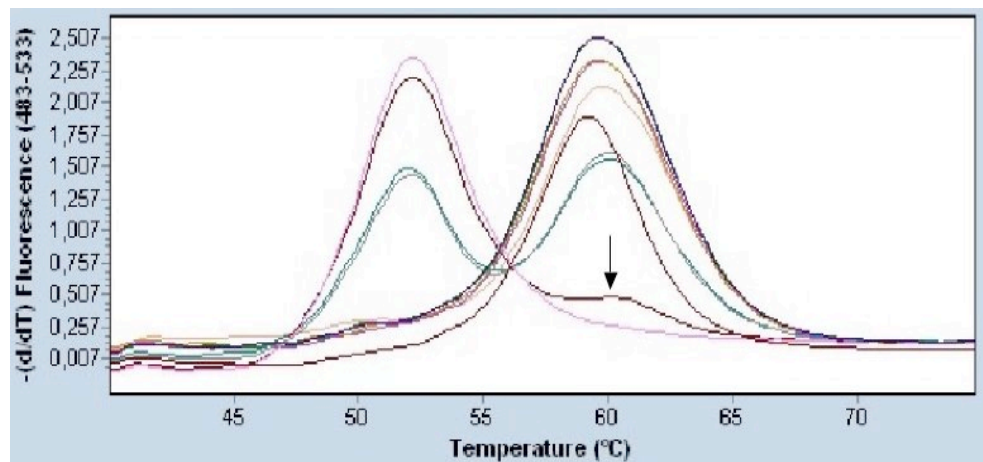
Reagenssi	SNP 1	SNP 2	SNP 3
Buffer 511	1x	1x	1x
DynaZyme II	0,02 U/ $\mu$ l	0,02 U/ $\mu$ l	0,02 U/ $\mu$ l
dNTP	0,2 mM	0,2 mM	0,3 mM
Alukkeet	1,0 $\mu$ M	0,680 $\mu$ M	0,5 $\mu$ M
Templaatti	5,0 ng	2,5 ng	5-2,0 ng
MgCl <sub>2</sub>	4 mM	2,5 mM	3,25 mM
BSA	20 ng	-	20 ng
DMSO	5%	-	-

Taulukko 6. PGI-geenin SNP-lokusten PCR-ohjelmat.

Sykli	SNP 1	SNP 2	SNP 3
Ensimmäinen denaturaatio	95 °C, 5:00	95 °C, 5:00	95 °C, 5:00
Denaturaatio	94 °C, 1:00	94 °C, 1:00	94 °C, 1:00
Anniilaus	51 °C, 0:30	55 °C, 0:30	59 °C, 0:30
Ekstensio	72 °C, 0:30	72 °C, 0:30	72 °C, 0:30
Sykliden määrä	x45	x39	x39
Viimeinen ekstensio	72 °C, 7:00	72 °C, 7:00	72 °C, 7:00

### 6.3 PGI SNP –lokusten genotyypitys SimpleProbe ja HybProbe qPCR –menetelmillä

Genotyypityksessä SimpleProbe-tekniikalla oli ongelmana heterotsygoottien näytteiden tunnistaminen. Tällä tekniikalla heterotrygootiksi tiedetty näyte vaikutti useamman näytteen kohdalla sulamiskäyrän perusteella homo-tygootilta (Kuva 11). Näiden kontrollinäytteiden genotyypitys oli aikaisemmin tehty SNUpe MegaBace –tekniikalla ja useiden näytteiden kohdalla tulos oli varmistettu myös sekvensoimalla monistustuote.

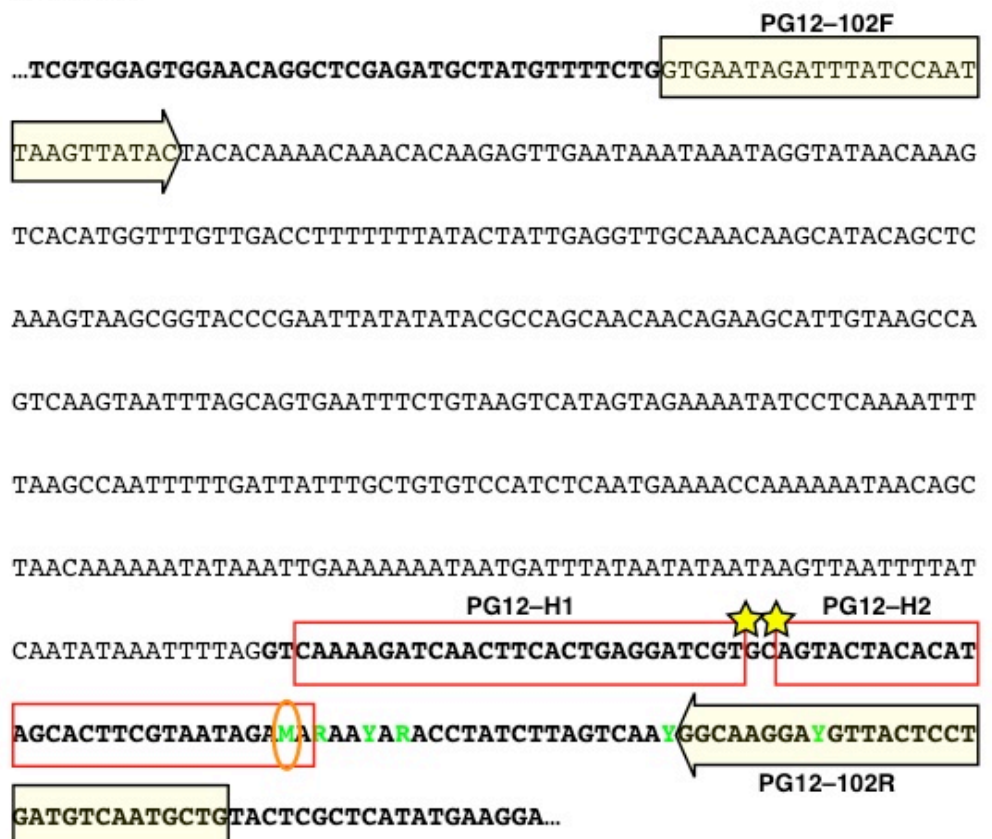


Kuva 11. PGI SNP3 –lokusten genotyypitys SimpleProbe-tekniikalla. Sulamiskäyrään on merkitty nuolella esimerkki näytteestä, joka tiedettiin heterotsygootiksi, mutta qPCR-menetelmä ei riittänyt tunnistamaan näytteestä luotettavasti kahta sulamispiikkiä.

Myöskään HybProbe-tekniikka ei toiminut hyvin PGI-geenin genotyypityksessä. Ongelmana ei ollut niinkään multipleks-määritys, koska tutkittujen kolmen eri lokuksen määritys samassa reaktiossa näytti toimivan lähes samalla tavalla kuin yksittäisetkin reaktiot, vaan yksittäisten koetinparien toimivuus oli heikkoa. Jo koettimien suunnitteluvaihe oli haasteellinen SNP-

lokusten lähellä sijaitsevien vaihtelevien emästen vuoksi. Erityisesti SNP lokus 2:en kohdalla sekvenssissä oli useampi vaihteleva emäs lähellä SNP-lokusta, jolloin optimaalisia hybridisaatiokoettimia oli mahdotonta suunnitella (kuva 12). Tämän vuoksi SNP-lokus jäi liian lähelle koettimen reunaa eikä alukkeiden sulamiskäyristä saatu riittävän selviä erottamaan genotyyppejä toisistaan.

#### Eksoni 2:



Kuva 12. PGI SNP2 –lokusta ympäröivä sekvenssi, PCR-alukset ja punaisella pohjaväriellä korostetut hybridisaatiokoettimet. SNP-lokuksen (ympyröity) lähellä sijaitsevat vaihtelevat nukleotidit on korostettu vihreällä värillä.

#### 6.4 Uusien SNP-lokusten karakterisointi: sekvenssivertailut ja PCR-monistus

Tässä opinnäytetyössä oli alkujaan mukana EST-sekvenssien perusteella 40 uutta SNP-markkereita sisältävää geeniä. Näistä geeneistä karsiutui sekvenssivertailujen perusteella suoraan 7 geeniä, joille ei löytynyt sopivia vertailugeenejä lähilajeilta tai eksoni-intronirakenteita ennustava Spidey -analyysi ei onnistunut. PCR-monistusvaiheessa karsiutui valtaosa genotyypityksestä pois jääneistä geeneistä, koska alukeparit eivät toimineet riittävän

hyvin tai ne monistivat vain osan näytteistä. Tässä työvaiheessa karsiutui pois 15 geeniä. Näin lopulliseen SNUPe-Megabace – genotyypitykseen jäi 17 geeniä eli 43 % alkuperäisestä geenilistasta, joista analysoitiin 18 SNP-lokusta. Jos sekvenssivertailuihin ja PCR-monistuksen optimointiin olisi käytänyt enemmän aikaa, olisi onnistumisfrekvenssi ollut korkeampi. Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli kuitenkin testata nopeaa jatkoanalyysiin sopivien SNP-lokusten seulontaa suuresta geenijoukosta.

Kaikki monistuneet geenipätkät osoittautuivat sekvenssoinnin perusteella oikeiksi monistustuotteiksi. Sekvensointi oli kuitenkin hyödyllistä, koska sen perusteella intronien raja-alueet oli helpompi paikantaa tarkasti, mikä taas helpotti MegaBace-alkukkeiden suunnittelua. Tällöin monistustuotteen sisältämistä SNP-lokuksista oli mahdollista valita genotyypitykseen eksonin keskivaiheilla sijainnut SNP-markkeri.

## 6.5 Uusien SNP-lokusten genotyypitys SNUPe-MegaBace –tekniikalla

Uusista SNP-lokuksista löytyi neljästätoista analysoidusta lokuksesta odotettua polymorfismia, tosin alleelien frekvenssi oli usein hiukan erilainen kuin alun perin SNP-lokusten etsinnän yhteydessä laskettu alleelien esiintymistiheys. Tämä alkuperäinen frekvenssi oli laskettu selvästi suuremmasta näyttemäärästä kuin tässä opinnäytetyössä saadut frekvenssit. Vaihtelua ei havaittu neljässä SNP-lokuksessa lainkaan. Ranskasta kerättyistä näytteistä tätä polymorfismia ei löytynyt yhtä monesta lokuksesta, mikä olikin odotettua koska Ranskalaiset verkkoperhoset kuuluvat eri evolutiiviseen haaraan eli kladiin kuin Ahvenanmaan verkkoperhoset. Ahvenanmaan näytteiden otoskoko oli suurempi (15 yksilöä) verrattuna Ranskasta kerättyihin näytteisiin (7 yksilöä). Kuitenkin jos vertailuun otetaan Ahvenanmaan näytteistä vain seitsemän ensimmäistä yksilöä kuten Ranskalaisistakin näytteistä, niin tulos on sama eli Ahvenanmaan näytteissä esiintyy näidenkin näytteiden kohdalla polymorfismia, joista Ranskasta kerättyissä näytteissä tämä vaihtelu puuttuu. Genotyypitystulokset on esitetty taulukossa 7, josta käy ilmi odotettu SNP-tyyppi ja vastaavasti MegaBace-analyysillä saatu tulos sekä alleelien frekvenssit kaikissa näytteissä yhteensä, frekvenssit vain Ahvenanmaalta kerättyissä näytteissä ja Ranskasta kerättyissä näytteissä. Tarkemmat MegaBace-ajon tulokset ovat liitteessä 5.

*Taulukko 7. SNP-genotyypitystulokset. Laskennallinen frekvenssi kertoo SNP-lokusten paikantamisen yhteydessä Ahvenanmaalta kerätyistä näytteistä löydetyn vaihtelun. Tällöin eri geenien kohdalla on ollut hiukan eri määrä sekvenssinäytteitä, joten tuloksen luotettavuus vaihtelee. Taulukossa on eritelty MegaBace-genotyypityksellä saatu kaikissa näytteissä esiintynyt vaihtelu (A+R) sekä pelkästään Ahvenanmaan näytteiden SNP-frekvenssit (A) ja Ranskasta kerättyjen toukkanäytteiden SNP-frekvenssit (R).*

Geenin numero	Geenin nimi (KO kuvaus)	SNP-tyyppi	Laskennallinen frekvenssi	Frekvenssi A+R	Frekvenssi A	Frekvenssi R
1	Glycerakdehyde 3-phosphate dehydrogenase	Neg. kontrolli: G	0.00	0.00	0.00	0.00
		CT	0.11	0.16	0.23	0.00
3	Alcohol dehydrogenase	Neg. kontrolli: T	0.00	0.00	0.00	0.00
		CT	0.17	0.00	0.00	0.00
5	Aldehyde dehydrogenase (NAD <sup>+</sup> )	Neg. kontrolli: A	0.00	0.00	0.00	0.00
6	Phosphoglycerate mutase	Neg. kontrolli: A	0.00	0.11	0.17	0.00
		GT	0.11	0.00	0.00	0.00
9	Aldose 1-epimerase	TC	0.25	0.00	0.00	0.00
10	6-phosphofruktokinase	CT	0.15	0.00	0.00	0.00
14	Ribulose-phosphate 3-epimerase	TC	0.29	0.39	0.47	0.21
15	Ribose 5-phosphate isomerase A	TC	0.50	0.39	0.55	0.14
16	Ribose-phosphate pyrophosphokinase	GA	0.25	0.39	0.10	1.00
18	Small subunit ribosomal protein S8e	TC	0.45	0.35	0.53	0.00
		TC	0.44	0.13	0.19	0.00
19	Large subunit ribosomal protein L11e	TC	0.13	0.20	0.30	0.00
24	Large subunit ribosomal protein L24e	GT	0.18	0.11	0.17	0.00
29	Small subunit ribosomal protein S8e	AG	0.26	0.67	0.73	0.50
32	Large subunit ribosomal protein L4	GA	0.43	0.18	0.20	0.14
34	Small subunit ribosomal protein S23e	CT	0.46	0.55	0.39	0.40
37	Large subunit ribosomal protein L27Ae	TC	0.50	0.73	0.80	0.57
39	Large subunit ribosomal protein L23e	CT	0.38	0.36	0.37	0.36
40	Small subunit ribosomal protein S27Ae	TC	0.40	0.43	0.53	0.21

Analyyssissä mukana olleista neljästä negatiivisesta kontrollilokuksesta kolme oli SNP-Profiler –ohjelman automaattisen analyysin mukaan negatiivisia eli niissä ei esiintynyt vaihtelua, vaan pelkästään sekvenssin perusteella odotettu emästyypin (taulukko 7). Kuitenkin yhden kontrollilokuksen yhteydessä ohjelma tulkitsi näytteissä esiintyvän myös vaihtelevaa emästyypin. Näissäkin tapauksissa tosin elektroferogrammin laatu oli heikko ja näytteissä esiintyi taustakohinaa. Tämän vuoksi ohjelma tulkitsi muutaman näytteen kohdalla genotyypiksi homotsygootin sijaan heterotsygootin. Tällaisen negatiivisen kontrollin mukana olo osoitti elektroferogrammien manuaalisen seulonnan tarpeelliseksi. Näin epäselvät tulokset oli havaittavissa ja niiden antamat tulokset voitiin varmistaa uusinta-analyysillä.

## 6.6 SNuPe-minisekvensointitekniikan ja qPCR-menetelmien vertailu

### 6.6.1 Menetelmän työmäärä

SnuPe-minisekvensointitekniikassa näytteen esikäsittely on monivaiheista. Tässä menetelmässä eristetystä genomisesta DNA:sta tehdään ensin erillinen PCR-monistus, jonka jälkeen monistustuote on puhdistettava ennen SnuPe-reaktiota. Tämän jälkeen on jälleen tehtävä tuotteen puhdistus ennen varsinaista MegaBace-ajoa. Näin näyte joudutaan käytännössä pipetoimaan ensin PCR-levylle, josta vain osa siirretään uudelle 96-levylle puhdistukseen. Edelleen tästä vain osa tarvitaan SnuPe-reaktioon uudelle levylle. Tämän jälkeinen puhdistusvaihe on mahdollista tehdä samalla levyllä ilman näytteen siirtoa. Viimeisessä vaiheessa joudutaan kuitenkin taas pipetoimaan uusi 96-levy reagenssiseokseen MegaBace-ajoon. Näin näyte joudutaan käytännössä siirtämään neljä kertaa eri 96-kuoppalevyille. Tämä on tietysti paitsi työlästä, niin myös väistämättä hidasta ja lisää virhemahdollisuuksia. qPCR-menetelmässä sen sijaan näyte voidaan pipetoida suoraan 384-kuoppalevyille ja näytteen PCR-monistus sekä tämän jälkeinen sulamiskäyräanalyysiin perustuva genotyypitys tapahtuvat yhdessä vaiheessa, ilman näytteen esikäsittelyä.

### 6.6.2 Tulosten luotettavuus

Tässä opinnäytetyössä ei saatu toimimaan qPCR-pohjaista genotyypitystä luotettavasti. Menetelmä selvästi vaatii huolellisen alukkeiden ja koettimien suunnittelun, yhdistettynä reaktio-olosuhteiden optimointiin. Näin ollen se ei aina sovellu paljon vaihtelua sisältävien sekvenssien analyysiin tai tapauksiin, joissa halutaan tutkia monen eri lokuksen genotyyppiä. Sen sijaan SnuPe-menetelmällä ainakaan vain yhden degeneratiivisen nukleotidin sisältävien koettimien ei ole havaittu heikentävän analyysituloksia (Batley & Hayes 2003). Muutenkaan SnuPe-menetelmän koettimien suunnittelu ei ole yhtä tarkkaa, koska koettimien GC-pitoisuudella, pituudella tai tarkalla sulamislämpötilalla ( $T_m$ ) ei ole havaittu analyysitulosta heikentävää vaikutusta. Toisaalta analyyseissä, joissa näytemäärä on suuri, mutta tutkittavia lokuksia on vähän, perusteelliseen qPCR-koettimien suunnitteluun ja menetelmän optimointiin käytetty aika voi helposti kulua MegaBace-ajoihin tarvittaviin näytteiden esikäsittelyvaiheisiin. Tässä opinnäytetyössä käytetyillä HybPro-



be ja SimpleProbe –tekniikoilla on kuitenkin muissa yhteyksissä saavutettu luotettavia genotyyppitytuloksia (Liew ym. 2006, Nielsen ym. 2006, Peeters ym. 2008). Esimerkiksi HybProbe-tekniikalla genotypitettiin 99 % näytteistä suoraan oikein ilman tarkistusmääriä (Liew ym. 2006). Uutta korkean erotuskyvyn sulamiskäyräanalyysiä, HRM (High-Resolution melting), olisi mielenkiintoista testata PGI SNP-lokusten genotyyppitykseen (Hoffmann ym. 2007). Tämä menetelmä ei vaadi erillisiä sekvenssispesifisiä koettimia vaan perustuu lyhyiden monistustuotteiden erilaisiin monistuskäyriin ja niiden tarkkaan lämpötila-analyysiin. Menetelmää voidaan käyttää myös SNP-lokusten tunnistamiseen. Toisaalta sen heikkoutena on, kun tulokset analysoidaan qPCR-laitteella ilman erillistä tarkkaan sulamiskäyrien analysointiin tarkoitettua laitetta, ettei menetelmä anna muuta informaatiota kuin että monistetuissa sekvensseissä on nukleotidiero (Graham ym. 2005). Tällöin esimerkiksi *PGI*-geenin tapauksessa monistustuotteet olisi saatava sellaiselle alueelle ja niin lyhyiksi, ettei SNP-lokuksen lisäksi muu sekvenssin vaihtelu sotke analyysiä.

MegaBace-pohjaisessa genotyyppityksessäkin tulokset eivät olleet yksiselitteisiä. Lähes kaikista lokuksista jouduttiin tekemään ainakin osasta näytteistä uusinta-analyysyjä. Etenkin tällöin oli vaarana näytteiden sekoittuminen, kun yksittäisiä huonon tuloksen antaneita näytteitä poimittiin uusiin esikäsittelyvaiheisiin. Usean näytteen kohdalla osoittautui myös, että SNP-profiler –ohjelman antama tulos ei suoraan ollut luotettava. Ohjelman automaattista genotyyppitystulosta joutui useassa tapauksessa muuttamaan epäselvän elektroferogrammin vuoksi ja uusinta-analyysissä tämä käsin muokattu tulos useimmiten osoittautui oikeaksi. Tulosten perusteella MegaBace-pohjainen genotyyppitys vaatii lähes aina useamman rinnakkaisen ajon luotettavien tulosten saamiseksi. Toisaalta on osoitettu, että SNUPe-menetelmä antaisi silti joissain tapauksissa selkeämmän tuloksen kuin alleeli-spesifiseen PCR-menetelmään perustuva analyysi (Barker ym. 2000, Batley & Hayes 2003). Tämän opinnäytetyön tuloksia on tosin voinut heikentää lyhyehköt monistustuotteet. Tällaisilla lyhyillä tuotteilla esiintyy SNP-Profiler analyysiohjeen mukaan helpommin taustapiikkejä. Lisäksi analyysissä ei suoritettu SNP-koettimien konsentraation optimointia. Liian korkeiden alukepitoisuuksien on havaittu haittaavan ddNTP-molekyylien liittämistä oikeaan kohtaan ja siten vääristävä analyysituloksia (Batley & Hayes 2003).

### 6.6.3 Kustannukset

MegaBace-pohjaisessa genotyypityksessä yhden reaktion reagenssikustannukseksi sadan näytteen erässä tulee noin 2,53 e ja tuhannen näytteen erässä 1,86 e. Laskelma on tehty listahintaisilla tuotteilla noudattaen valmistajan suosituksia, eikä sisällä tavallisten PCR-alukkeiden kustannuksia, koska ne ovat molemmissa analyysimenetelmissä samaa luokkaa. Vastaavasti qPCR-pohjaisessa genotyypityksessä SimpleProbe-tekniikalla kustannukseksi tulee vain 0,54 e ja HybProbe-tekniikalla 1,34 e SNP-lokus/näyte. Näiden menetelmien kohdalla kustannuksissa ei ole eroa sadan tai tuhannen näytteen erissä. On kuitenkin huomioitava, että qPCR-pohjaiset menetelmät kertovat vain onko kyseisen SNP-lokuksen genotyyppi sama kuin kyseisessä koettimessa vai jokin muu. Toisaalta HybProbe-tekniikalla useamman SNP-lokuksen analysointi multiplex-formaatilla vähentää kustannuksia edellä lasketusta merkittävästi.

## 6.7 Mikrosatelliittianalyysit

Mikrosatelliittien sekvenssivertailut ja siten UTR-alueiden sekä eksoni-intronirajojen paikannus oli vaikeaa. Sekvenssivertailuissa mukana olleista 40:stä mikrosatelliittilokuksesta vain seitsemän lokusta genotyypitettiin (taulukko 8). Suurin syy mikrosatelliittialueen hylkäämiseen oli lokuksen sijoittuminen koodaavaan eksoniin, jolloin kaikki muut paitsi triplettitoistojaksot hylättiin, koska tällaiset lokukset eivät luultavimmin ole todellisia polymorfisia mikrosatelliittimarkkereita.

Analysoiduissa mikrosatelliiteista vain kahdesta lokuksesta (geenit numero 1 ja 36) löytyi vaihtelua eri alapopulaatioiden välillä. Muita tutkittuja lokuksia ei siis voida hyödyntää geneettisinä markkereina tutkittaessa eri populaatioita. Näistäkin kahdesta vaihtelua sisältäneestä lokuksesta löytyi vain kahta eri alleelia, joten nekään eivät ole kovin informatiivisia geneettisiksi markkereiksi. Taulukossa 9 on esitetty mikrosatelliittilokuksista MegaBace-ajolla määritetyt alleelit. Tarkemmat tulokset, esimerkiksi monistustuotteiden pituudet, on esitetty liitteessä 6. Tämä vähän vaihtelua sisältänyt tulos ei ollut kuitenkaan yllättävä, koska polymorfisten mikrosatelliittialueita on löydetty perhosilta yleensä hyvin vähän (Ji & Zhang 2004 Zhang 2004 mukaan). Verkkoperhoselta tällaisia markkereita on tähän asti karakterisoitu vain viisi lokusta (Sarhan 2006).

**Taulukko 8. Sekvenssivertailuissa mukana olleet mikrosatelliittigeenit. Geenin nimenä on toisesta lajista tunnistetun homologin tunnus. Taulukossa on esitetty myös NCBI-numerot, mikrosatelliitin toistoyksiköt, sekvenssivertailujen pohjalta arvioidut lokusten sijainnit sekä kommentit siitä, onko lokus analysoitu tai syy sen hylkäämiselle jatkoanalyysistä..**

Nimi	NCBI-numero	Toistoyksikkö	Sijainti	Kommentit
VPS72_DROME	Q9VKM6	AAG	Eksoni	Analysoitu
Q7PX62_ANOGA	Q7PX62	AAG	Eksoni	PCR ei toiminut
Q9VKP5_DROME	Q9VKP5	AATAT	Eksoni	Hylätty skevenssivertailun perusteella
Q81Q03_DROME	Q81Q03	ACTGG	Eksoni	Hylätty skevenssivertailun perusteella
DKC1_DROME	044081	AAG	Eksoni-introni raja	Hylätty skevenssivertailun perusteella
Q17AF8_AEDAE	Q17AF8	AT	Eksoni	Hylätty skevenssivertailun perusteella
Q7QCH6_ANOGA	Q7QCH6	AAAC	5'UTR/Eksoni	Alukkeiden suunnittelu ei onnistunut sekvenssiin
Q4W4D2_ANTMY	Q4W4D2	AAAC		Sekvenssivertailu ei onnistunut.
Q1HQ87_BOMMO	Q1HQ87	ACT	Eksoni	PCR ei toiminut
Q17K38_AEDAE	Q17K38	AAAT	Eksoni	Hylätty skevenssivertailun perusteella
Q17L27_AEDAE	Q17L27	AAGAG	Eksoni	Analysoitu
Q17DA8_AEDAE	Q17DA8	AAG		Sekvenssivertailu ei onnistunut.
Q5TUL1_ANOGA	Q5TUL1	AAT	Eksoni-introni raja	Alukkeiden suunnittelu ei onnistunut sekvenssiin
Q5TUL1_ANOGA	Q5TUL1	AAT		Sekvenssivertailu ei onnistunut.
Q2F6A6_BOMMO	Q2F6A6	AGC		Sekvenssivertailu ei onnistunut.
Q8MZH7_DROME	Q8MZH7	AAC		Sekvenssivertailu ei onnistunut.
Q6XJ11_DROYA	Q6XJ11	CCG	Eksoni	Analysoitu
Q29NS9_DROPS	Q29NS9	AAAAT	Eksoni	Hylätty skevenssivertailun perusteella
Q16K18_AEDAE	Q16K18	AAG	Eksoni	Hylätty skevenssivertailun perusteella
Q17169_AEDAE	Q17169	ACTG	Eksoni	Hylätty skevenssivertailun perusteella
A0EM56_BOMMO	A0EM56	AAAT	Eksoni	Hylätty skevenssivertailun perusteella
Q5TN61_ANOGA	Q5TN61	AAATT	Eksoni	Hylätty skevenssivertailun perusteella
Q5FY24_BOMMO	Q5FY24	AAAT	Eksoni	Hylätty skevenssivertailun perusteella
Q296S7_DROPS	Q296S7	AAGC	Eksoni	Hylätty skevenssivertailun perusteella
Q1HQB1_BOMMO	Q1HQB1	AATGG	Eksoni	Hylätty skevenssivertailun perusteella
Q3HR35_BOMMO	Q3HR35	AATAT	Eksoni	Hylätty skevenssivertailun perusteella
Q1HQ12_BOMMO	Q1HQ12	AATAC	Eksoni-introni raja	PCR ei toiminut
Q1HQ12_BOMMO	Q1HQ12	AAACT	Eksoni-introni raja	PCR ei toiminut
Q2F6A1_BOMMO	Q2F6A1	AAATT	Eksoni	Hylätty skevenssivertailun perusteella
Q17K84_AEDAE	Q17K84	ATC	5'UTR/Eksoni	Alukkeiden suunnittelu ei onnistunut sekvenssiin
Q5ZLP9_CHICK	Q5ZLP9	AAATT		Sekvenssivertailu ei onnistunut.
Q5UAL8_BOMMO	Q5UAL8	AAG	Eksoni	Analysoitu
Q16UH6_AEDAE	Q16UH6	AAG	5'UTR/Eksoni	Analysoitu
Q2F6A0_BOMMO	Q2F6A0	AAAT		Sekvenssivertailu ei onnistunut.
Q5UAP4_BOMMO	Q5UAP4	AGC	Eksoni	PCR ei toiminut
Q1HQ22_BOMMO	Q1HQ22	AAC	Eksoni-introni raja	Analysoitu
Q5YJK1_MAMBR	Q5YJK1	AAG	Eksoni	Analysoitu
Q0IF15_AEDAE	Q0IF15	AAAT	Eksoni	Hylätty skevenssivertailun perusteella
Q66PK1_BOMMO	Q66PK1	AAT		Sekvenssivertailu ei onnistunut.
Q6PTY2_BOMMO	Q6PTY2	ACAT	Eksoni	Hylätty skevenssivertailun perusteella

**Taulukko 9. Mikrosatelliittilokuksista tunnistetut eri mittaiset alleelit. Ahvenanmaalta kerätyt näytteet on merkitty A-kirjaimella ja Ranskasta kerätyt R-kirjaimella.**

Näyte	MS1 AAG	MS11 AAGAG	MS17 CCG	MS32 AAG	MS33 AAG	MS36 AAC	MS37 AAG
A1	2	1	1	1	1	2	1
A2	2	1	1	1	1	2	1
A3	2	1	1	1	1	1 ja 2	1
A4	1 ja 2	1	1	1	1	2	1
A5	2	1	1	1	1	1 ja 2	1
A6	1 ja 2	1	1	1	1	1	1
A7	2	1	1	1	1	1 ja 2	1
A8	2	1	1	1	1	2	1
A9	2	1	1	1	1	x	1
A10	2	1	1	1	1	2	1
A11	2	1	1	1	1	1	1
A12	1 ja 2	1	1	1	1	2	1
A13	1	1	1	1	1	2	1
A14	2	1	1	1	1	1 ja 2	1
A15	1 ja 2	1	1	1	1	1 ja 2	1
A16	x	1	1	1	1	1	1
A17	1 ja 2	1	1	1	1	1	1
A18	2	1	1	1	1	1	1
A19	2	1	1	1	1	1 ja 2	1
A20	2	1	1	1	1	1 ja 2	1
A21	2	1	1	1	1	2	1
A22	x	1	1	1	1	x	1
A23	1 ja 2	1	1	1	1	2	1
A24	x	1	1	1	1	2	1
A25	1	1	1	1	1	1	1
A26	2	1	1	1	1	1 ja 2	1
A27	1 ja 2	1	1	1	1	2	1
A28	2	1	1	1	1	1 ja 2	1
A29	1	1	1	1	1	2	1
A30	1 ja 2	1	1	1	1	2	1
A31	2	1	1	1	1	2	1
A32	2	1	1	1	1	2	1
A33	2	1	1	1	1	1 ja 2	1
A34	2	1	1	1	1	1 ja 2	1
A35	1 ja 2	1	1	1	1	2	1
A36	2	1	1	1	1	1	1
A37	2	1	1	1	1	1	1
A38	2	1	1	1	1	1	1
A39	1 ja 2	1	1	1	1	1 ja 2	1
A40	x	1	1	1	1	2	1
R1	2	1	1	1	1	1	1
R2	2	1	1	1	1	1	1
R3	2	1	1	1	1	1	1
R4	2	1	1	1	1	1	1
R5	2	1	1	1	1	1	1
R6	2	1	1	1	1	1	1
R7	x	1	1	1	1	1	1

## 7 YHTEENVETO

Työssä vertailtiin SNUPe-minisekvensointiin ja qPCR-pohjaiseen sulamiskäyräanalyysiin perustuvia genotyypitysmenetelmiä verkkoperhosen SNP-genotyypitykseen. Molempien menetelmien heikkoutena oli tulosten luotettavuus. SnuPe-minisekvensointigenotyypitys antoi luotettavat tulokset vasta usean rinnakkaistoiston jälkeen. qPCR-pohjainen analyysi ei soveltunut paljon sekvenssivaihtelua sisältäneen *PGI*-geenin genotyypitykseen.

Työssä seulottiin neljäkymmenen verkkoperhosen geenin joukosta seitsemäntoista SNP-markkereita sisältävää geenialuetta. Nämä alueet valittiin sen mukaan oliko geneista mahdollista paikantaa eksoneiden ja introneiden raja-alueet sekvenssivertailujen perusteella, monistuivatko alueet hyvin PCR-reaktion avulla ja sijaitsivatko SNP-markkerit sopivassa kohdassa geeniä. Näistä geneista karakterisoitiin kahdeksantoista SNP-markkeria, joista neljässätoista esiintyi geenimarkkereille ominaista polymorfismia Ahvenanmaan verkkoperhospopulaatiossa.

Sopivalla geenialueella sijainneita ja hyvin monistuvia mikrosatelliittilokuksia tunnistettiin 40:n geenin joukosta seitsemän. Näistä lokuksista vain kahdessa esiintyi populaatioiden välistä vaihtelua. Löydetty polymorfismi oli tosin pientä, molempien geenien kohdalla tunnistettiin vain kaksi eri alleelia, joten nämäkään mikrosatelliittilokukset eivät ole kovin informatiivisia geneettisiksi markkereiksi.

## VIITELUETTELO

- Altshuler, D., Pollara, V.J., Cowles, C.R., Van Etten, W.J., Baldwin, J., Linton, L. & Lander, E.S. 2000: An SNP map of human genome generated by reduced representation shotgun sequencing. – *Nature* 407: 513-516.
- Batley, J. & Hayes, P.K. 2003: Development of high throughput single nucleotide polymorphism genotyping for the analysis of nodularia (cyanobacteria) population genetics. – *J Phycol* 39: 248-252.
- Barker, G.L., Handley, B.A., Vacharapiysophon, P. & Hayes, P.K. 2000: Allele-specific PCR shows that genetic exchange occurs among genetically diverse *Nodularia* (cyanobacteria) filaments in Baltic Sea. – *Microbiology* 146: 2865-2875.
- Beckmann, J.S. & Weber, J.L. 1992: Survey of human and rat microsatellites. – *Genomics* 12: 627-631.
- Berger, J., Suzuki, T., Senti, K.A., Stubbs, J., Schaffner, G. & Dickson, B.J. 2001: Genetic mapping with SNP markers in *Drosophila*. – *Nat Genet.* 29: 475-481.
- Brookes, A.J. 1999: The essence of SNPs. – *Gene* 234: 177-186.
- Bustin, S.A. 2000: Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. – *J. Mol. Endocrinol.* 25: 169-193.
- Collins, F.S., Brooks, L.D. & Chakravarti, A. 1998: A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genom Res* 8: 1229-1231.
- Dahlhoff, E.P. & Rank, N.E. 2000: Functional and physiological consequences of genetic variation at phosphoglucose isomerase: heat shock protein expression in related to enzyme genotype in a montane beetle. – *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 10056-10061.
- Dwight, H.O., Thompson, R.E., Griffin C.A. & Eshleman, J.R. 2000: Use of Single Nucleotide Polymorphism and Real-Time Polymerase Chain Reaction for Bone Marrow Engraftment Analysis. – *JMD* 2: 202-208.
- Ehrlich, P.R. & Hanski, I. 2004: Checkerspot research. Teoksessa: Ehrlich, P.R. & Hanski, I. (toim.) 2004: *On the Wings of Checkerspot – A Model System for Population Ecology*. Oxford University Press, Oxford. p. 3-16.
- Ginzinger, D.G. 2002: Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the main stream. – *Exp. Hematol.* 30: 503-512.
- Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallone, B., Bouillon, R. & Mathieu, C. 2001: An overview of real-time quantitative PCR: Applications to quantify Cytokine gene expression. – *Methods* 25: 386-401.

- Goldstein, D.B. & Schlötterer (toim.) 1999: *Microsatellites – Evolution and Applications*. New York: Oxford University Press, s. 1-9.
- Graham, R., Liew, M., Meadows, C., Lyon, E. & Wittwer, C.T. 2005: Distinguishing different DNA Heterozygotes by High-Resolution melting. – *Clin Chem* 51: 1295-1298.
- Griffin, T.J. & Smith, L.M. 2000: Single-nucleotide polymorphism analysis by MALDI-TOF mass spectrometry. – *Trends in Biotechnology* 18: 77-84.
- Gut, I.G. 2001: Automation in genotyping of single nucleotide polymorphisms. – *Human Mutation* 17: 475-492.
- Haag, C.R., Saastamoinen, M., Marden, J. & Hanski, I. 2005: A candidate locus for variation in dispersal rate in a butterfly metapopulation. *Proceedings of the Royal Society* 272: 2449-2456.
- Hanski, I., Kuussaari, M. & Niemi, M. 1994: Metapopulation structure and migration in the butterfly *Melitaea cinxia*. – *Ecology* 75: 747-762.
- Hanski, I., Pakkala, T., Kuussaari, M. & Guangchun, L. 1995: Metapopulation persistence of an endangered butterfly in a fragmented landscape. – *OIKOS* 72: 21-28.
- Hanski, I. & Gaggiotti, O.E. (toim.) 2004: *Ecology, Genetics and Evolution of Metapopulations*. Elsevier academic press, Amsterdam, s. 3-22.
- Hanski, I. & Saccheri, I. 2006: Molecular-level variation affects population growth in a butterfly metapopulations. *PLoS Biol* 4: e129.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. & Watson, R. 1993: Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. – *Biotechnology* 11: 1026-1030.
- Hoffmann, M., Hurlebaus, J & Weilke, C. 2007: Novel methods for High-Performance Melting Curve Analysis Using the LightCycler 480 System. – *Biochemica* 1: 17-19.
- Jakupciak, J.P. & Wells, R.D. 1999: Genetic instabilities in (CTG:CAG) repeats occur by recombination. – *J Biol Chem* 274: 23468-23479.
- Ji, Y.-J. & Zhang, D.X. 2004: Characteristics of microsatellite DNA in Lepidopteran genomes and implications for their isolation. – *Acta Zool Sinica* 50: 608-614.
- Jones, P.A. & Gonzalvo M.L. 1997: Altered DNA methylation and genome instability: A new pathway to cancer? – *PNAS* 18: 2103-2105.
- Katz, L.A. & Harrison, R.G. 1997: Balancing selection on electrophoretic variation of phosphoglucose isomerase in two species of field cricket: *Gryllus veletis* and *G. offsyvanicus*. *Genetics* 147: 609-621.
- Keyghobadi, N., Roland, J. & Strobeck, C. 1999: Influence of landscape on the population genetic structure of the alpine butterfly *Parnassius smintheus* (Papilionidae). – *Mol Ecol* 8: 1481-1495.

- Keyghobadi, N., Roland, J. & Strobeck, C. 2002: Brief report – Isolation of novel microsatellite loci in the Rocky Mountain Apollo butterfly, *Parnassius smintheus*. – *Hereditas* 136: 247-250.
- Kruglyak, L. 1997: The use of a genetic map of biallelic markers in linkage studies. – *Nat Genet* 17: 21-24.
- Kwok, P.-Y. 2000: High-throughput genotyping assay approaches. *Pharmacogenomics* 1: 95-100.
- Kwok, P.-Y. 2001: Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2: 235-258.
- Landegren, U., Nilsson, M. & Kwok, P.-Y. 1998: Reading Bits of Genetic Information: Methods for Single-Nucleotide Polymorphism Analysis.
- Levins, R. 1970: Ectinction. *Lect Notes Math.* 2: 75-107.
- Liew, M., Nelson, L., Margraf, R., Mitchell, S., Erali, M., Mao, R., Lyon, E. & Wittwer, L. 2006: Genotyping of Human Platelet Antigens 1 to 6 and 15 by High-Resolution Amplicon Melting and Conventional Hybridization Probes. – *J Mol Diagn* 8: 97-104.
- Mason, M.A., Provero, P., Vaira, A.M. & Acotto, G.P. 2002: Estimating the number of integrations in transformed plants by quantitative real-time PCR. – *BMC Biotech* 2:20.
- Megléc E., Petian, F., Danchin, E., D'Acier, A.C., Rasplus, J.-Y., Feure, E. 2004: High similarity between flanking regions of different microsatellites of two species of Lepidoptera: *Parnassius Apollo* and *Euphydryas aurinia*. – *Mol Ecol* 13: 1693-1700.
- Molenkamp, R., van der Ham, A., Schinkel, J. & Beld, M. 2007: Real-Time multiplex PCR of five different DNA targets using the LightCycler 480 system. – *Gene Exp.* 3: 15-17.
- Morin, A.P., Luikart, G., Wayne, R.K. & the SNP workshop group 2004: SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends Ecol Evol* 19: 208-216.
- Neve, G. & Méglecz, E. 2000: Microsatellite frequencies in different taxa. – *Trends in ecology and Evolution* 15: 376-377.
- Nielsen, K.A., Hansen, E.L. & Gille, S. 2007: Genotyping of the cytochrome P450 2D6 4469 C>T polymorphism using SimpleProbes. – *Scan J Clin and Lab In*
- Olney, R.C., Mougey, E.B., Wang, J., Shulman, D.I. & Sylvester, J.E. 2002: Using Real-Time, Quantitative PCR for the Rapid Genotyping of the Steroid 21-Hydroxylase Gene in North Florida Population. – *J Clin Endocrinol Metab* 87: 735-741.
- Orsini, L., Pajunen, M., Hanski, I. & Savilahti, H. 2007: SNP discovery by mismatch-targeting of Mu transposition. – *Nucl Acids Res* 35: e44.
- Patarnello, T. & Battaglia, B. 1992: Glucosephosphate isomerase and fitness: effects of temperature on genotype dependent mortality and enzyme

- activity in 2 species of the genus *Gammarus* (Crustacea, Amphipoda). – *Evolution* 46: 1568-1573.
- Peeters, A., Beckers, S., Verrijken, A., Roevens, P., Peeters, P., Gaal, L.V. & Hul, W.V. 2008: Variants in the FTO gene are associated with common obesity in the Belgian population. – *Mol Gen and Met* 93: 481-484.
- Pessa, H.K.J., Ruokolainen, A. & Frilander, M.J. 2006: The abundance of the spliceosomal snRNPs is not limiting the splicing of U12-type introns. – *RNA* 12: 1883-1892.
- Picoult-Newberg, L., Ideker, T.E., Pohl, M.G., Taylor, S.L., Donaldson, M.A., Nickerson, D.A. & Boyce-Jacino, M. 1999: Mining SNPs from EST databases. – *Genome Res* 9: 167-174.
- Reddy, P.S. & Housman, D.E. 1997: The complex pathology of trinucleotide repeats. – *Curr Opin Cell Biol* 9: 364-372.
- Richards, R.I. & Sutherland, G.R. 1992: Dynamic mutations: A new class of mutations causing human disease. *Cell* 70: 709-712.
- Ronaghi, M., Uhlen, M. & Nyren, P. 1998: A sequencing method based on real-time pyrophosphate. – *Science* 281: 363-365.
- Sarhan, A. 2006: Isolation and characterization of five microsatellite loci in the Glanville fritillary butterfly (*Melitaea cinxia*). – *Mol Ecol Notes* 6: 163-164.
- Sievers, S., Alemazkour, K., Zahn, S., Perlman, E.J., Gillis, A.J.M., Looijenga, L.H.J. & Schneider, D.T. 2005: IGF/H19 imprinting analysis of human germ cell tumors (GCTs) using the methylation-sensitive primer extension method reflects the origin of GCTs in different stages of primordial germ cell development. – *Genes, chromosomes & cancer* 44: 256-264.
- Stanssen, P., Zabeau, M., Meersseman, G., Remes, G., Gansemans, Y., Storm, N., Hartmer, R., Honisch, C., Rodi, C.P., Böcker, S. & Boom, D. 2004: High-Throughput MALDI-TOF discovery of genomic sequence polymorphisms. – *Genome Res* 14: 126-133.
- Suarez, R.K. 2000: Energy metabolism during insect flight: biochemical design and physiological performance. *Physiol Biochem Zool* 73: 765-771.
- Sunnucks, P. 2000: Efficient genetic markers for population biology. *TREE* 15: 199-203.
- Syvänen, A.C., Allto-Setälä, K., Harju, L., Kontula, K. & Söderlund, H. 1990: A primer-guided nucleotide incorporation assay in the genotyping of apolipoprotein E. – *Genomics* 8: 684-692.
- Thomas, C.D. & Hanski, I. 2004: Metapopulation dynamics in changing environments: butterfly responses to habitat and climate change. *Teoksessa: Hanski, I. & Gaggiotti, O.E. (toim.) 2004: Ecology, Genetics and Evolution of Metapopulations. Elsevier Academic Press, Amsterdam. s. 489-514.*
- Toth, G., Gáspári, Z. & Jurka, J. 2000: Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. – *Genome Res* 10: 967-981.



Tsilfidis, C., MacKenzie, A.E., Mettler, G., Barcelo, J. & Korneluk, R.G. 1992: Correlation between CTG trinucleotide repeat length and frequency of severe congenital myotonic dystrophy. – *Nat Genet* 1: 192-195

Tsuchihashi, Z. 2002: Progress in high throughput SNP genotyping methods. – *Pharmacogenomics* 2: 103-110.

Vera, J.C., Wheat, C.W., Fescemyer, H.W., Frilander, M.J., Crawford, D.L., Hanski, I. & Marden, J.H. 2008: Rapid transcriptome characterization for a nonmodel organism using 454 pyrosequencing. – *Mol Ecol* 17: 1636-1647.

Vignal, A., Milan, D., SanCristobal, M. & Eggen, A. 2002: A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. – *Genet Sel Evol* 34: 275-305.

Wang, D.G., Fan, J.-B., Siao, C.-J. *ym.*1998: Large-scale identification, mapping and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. – *Science* 15: 1077-1082.

Watt, W.B., Wheat, C.W., Meyer, E.H. & Martin J.-F. 2003: Adaptation at specific loci. VII. Natural selection, dispersal and the diversity of molecular-functional variation patterns among butterfly species complexes (*Colias*: Lepidoptera, Pieridae). *Mol. Ecol.* 12: 1265-1275.

Weber, J.L. & Myers, E.W. 1997: Human whole-genome shotgun sequencing. – *Genome Res* 7: 401-409.

Xia, Q., Zhou, Z., Lu, C *ym.* 2004: A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science* 306: 1937-1940.

Zhang, D.-X. 2004: Lepidopteran microsatellite DNA: redundant but promising. – *Trends in Ecol and Evol* 19: 507-509.

*PGI*-geenin sekvenssi ja SNP-lokukset

**GATTGCTTATCAACCTTGTTGATACGGCAGTTTCGGCATTCTTATACACCGTGTACTCGAA-  
 AACTTTATTTGAAAATGGAGCCTAAAGTGAATTTGAAACAAGACCCGGCTTATAAAAAAC-  
 TACAAGAATTCTACGATGTRAATGGTGAAAAATTAATATTCCACAACTATTTCAA-  
 CAW(SNP1:A/T)GATCCRGAAAGGTTTAATAAGTTCAGGTTTGTGCGATATTATTTAAAAATAAAAAATAAT  
 AACAAAAAACTTTTTTAAGATAATATTTATTTACAAAATAGATTTGGGTTTAATTTTT-  
 CATTTTCATATCACTTGCCTACTAAATTAATACTTTAAGGTCAACCGAAACAAAT-  
 GAATGTCATCTATTTAAAAATTAATGTAAAACCTTCGAAAGTTTAATATATATTGTAATGA-  
 GATTAATATTACTCTTTTTTCGTAATATTAATTGTAAAAATATTGATTAGTAAAAAA-  
 AAATATTTATTAATAATTCAAGTATACTACTTTAATGTACTCAAAACAAATTAGATTT-  
 TATTTAGTAATATGAACAACATTACAGTCATTTTCATCAGTAAAATATCTTAAACTCA-  
 CATGCCTATCAAAATATAGTTTTGATTTAATCTAAATTATGCATGTGCCATTAATATTTT-  
 CAATGTTTCTCTATTTGTCACAAGGCTGCAGCCTTGATTAATAATATTTAATAATAATAA-  
 AATAACTAACCACAAATAAAAAATGTAAAAATATAAATATGTTAATTAAAAACAAAACAA-  
 AATATATAAGATACAGATTAATATATTATTAGACTTATATGGAATATGGAGGCGCCTGCTC-  
 CACCATACGCAATTAGCAAGGAATTCATAAAACAACAAGGTGCACCTATCATGCCACCTAG-  
 CACTTAGTTGGATACTCACCTACCCTCATTGACCCCGTTACTAAAGTCATTCTGACCTGTA-  
 TAAAAAGACCGAAGAAACCATGCCTGAGGCAGTCTAGGCTTTGGCTTGGCACTGTGCA-  
 CATGTTGATTCTGCTAGTAGCTTAACCTAGACACTTTGGATAATCTATTTGTGCAAAC-  
 GAATTCATTGTTACATATTATATTATGATCTATAATTGTTAACTGTGT-  
 GACCTCCTTCCCCGTTGTGTGCATAATAATAAAAAATTTAACAATTTTTTTTTATTTA-  
 TAGTTTTRCGCATCCCYAYRCCAAATGATGGTGACATCCTTCTGGATTACTCTAAGAA-  
 CAGGRTAGATGCTGCTGCCTTGTCACTACTGCTGGAGCTGGCYAAGAGTCGTGGAGTGGAA-  
 CAGGCTCGAGATGCTATGTTTTCTGGTGAATAGATTTATCCAATTAAGTTATACTACACAA-  
 AACAAACACAAGAGTTGAATAAATAAATAGGTATAACAAAGTCACATGGTTTGTT-  
 GACCTTTTTTATACTATTGAGGTTGCAAAACAAGCATAACAGCTCAAAGTAAGCGGTACCC-  
 GAATTATATATACGCCAGCAACAACAGAAGCATTGTAAGCCAGTCAAGTAATTTAGCAGT-  
 GAATTTCTGTAAGTCATAGTAGAAAATATCCTCAAAATTTTAAGCCAATTTTTGAT-  
 TATTTGCTGTGTCCATCTCAATGAAAACAAAAATAACAGCTAACAAAAATATAAATT-  
 GAAAAAATAATGATTTATAATATAATAAGTTAATTTTATCAATATAAATTTTAGGTCAA-  
 AAGATCAACTTCACTGAGGATCGTGCAGTACTACACATAGCACTTCGTAATA-  
 GAMSNP2:A/C)ARAAYARACCTATCTTAGTCAAYGGCAAGGAYGTTACTCCTGATGTCAATGCTGTACT  
 CGCTCATATGAAGGAATTTTCAGAACAAGTTATCAGTGGCAAGTGGAAAGGGG-  
 TAAGCTTCTTTTTAAATTAATGAATCAGTCCGTCAAGTCTCCTGCAGGACAGAGGCAT-  
 GATTTTCTATGTAAAGAGTCGAGACTGCATCCACCACTATTCCACTAAGGGTTAAAGA-  
 TAATCTGGCTGGACGACTTCGCCAATGTCAAGTAGAAATAGATGAATACATTAATAAT-  
 TATGTATTTATAGGTACACAGGCAAGCAATAACAGATGTTATCAACATCGGCATCGGRG-  
 GYTCAGATCTCGGACCACTTATGGTCACCGAGGCGCTCAAACCCTACGCTAATCATCTAA-  
 AGGTATGAAAAACGTACATATTGTATAGCCTATATCCTACCTCTGGAAAGAGGC-  
 TATCCCGCACTAAAAATAATTTTTCAATATGAACTCCTGAGTTAAAGTCCTCACGTTTAA-  
 AATAACATAATTTTCCATCCGTATAATTTTTGTATAGATAAAGAAAAATCCACC-  
 CATTGGCTAGACTACTAGTCGTGACATTAGTCTACCAATTGTTCTAACAACAAATCGCCT-  
 GACATATCGAGCACTTAAGTTTTCTAAGTTTCAAATATAATCAGACTTCATTCAGAA-**

GAATTTTTTAAAGAAGTTTTATTTCCATTAATAAATAAACCATAAACATTTGCTGTAA-  
AATGTCATAAGTATAATTGTGTTTGAAGCAAACGAAAAGAAAACCGACTTCAATTATATC-  
GACAAGTAATACAACGGAGGCGAAGAAAAATAGTCAAGTAAATACGCATTATCAAAGAT-  
TACTCCAAAAATTGTAATCAAATCTCGATGAAATTTAAATGTGACCACACGATAA-  
ACATCGGCTTTTCGATTAATTAATAAATCAACAAAATCGGTACACCCAGTAAAAAGT-  
TATGCGGATTTTCGAGAGTTTTCCTCGATTTTTTGGGATCCCATCATCA-  
GATCCTGGTTTCCTTATTATGGTACCACACCACGGATATCTCCTTTCCAACAAAAAAAAA-  
AAAGAATTATCAAATCGGTTTCATAAACGACGAAATTATCCCCGAACATACCTATATTATA-  
TACGGTCGAATTGAGTAACCTCCTCCTTTTTTGAAGTCGGATAAAAATACCATATAACAA-  
AATTATTCCGCCACACACGATAAAAGTATGGCAACCCAACAATAGTTAAACCACAAGACAA-  
ATCTAGTCATTAATATATTCTAGGTACATTTTCGTATCCAACATCGACGGAACCCATC-  
**TAGCTGAAGTCCTGAAGAAATTGAACCCTGAGACAGCTCTCTTCATCATAGCGTCCAA-  
AACMTTACAACGCAAGAGACCATCACCAACGCGACYTCAGCCAAGAAGTGGTTCTTG-  
GATGTCGCYAAAAGACGTAAGTTTTATTTACTTTTTTTATCATCATCATCATCACTT-  
CAGCCTATCGCAGTCCACTGCTGGACATAGGCCTCCCCAAGTTCGCGCCAGA-  
CATCCCGGCTTTCGCAATCCTCATCCAGCCTACACCGGCAACCTTACGTA-  
GATCGTCGGTCCATCGTACTTTTTTATATCAACTTGAAATGACGTCTTATTAGTTTAA-  
TAAATAATAATAATGAATAAATGACTTATTACTTTGATAAAACTATAATAATAATGAA-  
TAAGTTAAAACAATTTTATCTTCGGGGGCTTAACACTTACGAAAAGTATGATCGGA-  
CAAGGCGAACGAAAGTTGAGAGTAAGAAAGTTTGACTTCAATCGTGTGGTCTAAAACA-  
CACTCGTTTTTTAACTAAGGTAAATTCGGTAAATTTAGATATCTTTATTTTTACCCCAG-  
CAGAGAATGTGTCCTGTTAAGTACTATGTAATAATAAATGAGCTTACATGTTTTTCT-  
TAGTTGTATTGTACGGAGATGGGGCTAGCGGGGCATTAAGCACAGCAAAACAACTGA-  
CATACATCTTCACAACTTCCGCATTTATAATATTATTAAGATATGCATAAATTTGCCAA-  
AAGATTTATTTTAATAAGGTAAGGCACAGCATAACCTTACTTTGAAAACATAACAACGCT-  
GATCTCAAGTAGGCAGTGTGGTTACGGCAGCAAGAATATAGC-  
CACCCCTCTCTTCCCGTGGGTATCGTAAGAGGCGAATAAGGGATAACACAGTTCCAC-  
TACCCCTTGGAACCTAAAAAGCCGACCGATGACGAGATAACCATCCAAGTCTGGTCTT-  
GAAATACACAGGCTGAAGATGAGCTGCAGCGTCTTCGGTGCACAAAGCCAGTACTGCGGT-  
CACCAACCCGCTGCCAGCGTGGTGACTATGGGTAACACACATGAGTTCAGG-  
CAATTTTTGGCGTGAACCTTGAGGAGACCTATGTCCAGCAGTGGACTTCGATAGGCTGAAGT-  
GATGATCTCAAGCAGTGTGTGTTCCGTGGCGAGTAAGGGACCGTCTCCACGAGCGAA-  
AGAATCGCGACGAGTCCGCGCTTCTATCGTTGGGTAATCACGAACGAGCGATTATCCGC-  
CAGCGTACCGTCACGAGTCGTAACGGACCTCGACGATGCGTTGTGCTTTTATTCATTGAA-  
AGAGATACTCGGGTAACTGAACATCGTAAATGGCAGGTCTCTCTTACTTCTAGTATAA-  
ACTTTTCAACGTCAAACATTGTCCTTGAATTGTTTTGTGATACGTAA-  
AGTCCTTGCTTGGCGAGTGGCAACAGTTGGTTCGACAGCAGTGGCGACATCGCCACACG-  
TACTCTCGCTCGTGGAGACGGCTAAGGTGGAGAGTAGACATGAGGCATATTTATCGTCAC-  
TAATATAAATACTCGTTATTTGAATGTCATAGTCGATCACTGTGACTGCCTTAAATAA-  
TAACCTGTGACTGTGATTATCTGTGCCGGGACTTAAATATCAATTGGCATTTCATCAC-  
GAGTATTGAAAATATTAGTCCTTTATTTGTTTGGAGACAAAAGTAATTTTTTAATATGT-  
GAATATACAGCGTCATCTAGTTTCAGTTCCTATACGGAAAGCTAGTTTTTAAAA-  
AATATCTCCATCTCGCTCGTGCTGTACGTGTACACTAAGAGGAGGTGAAATAAACGTAG-  
TATTTCTAGGATACCAATATTGAGTAGTCGAGAAGTTTGTATTTTGTAAACGGGTATGTGT-  
CACTGATGTTTTAAATCACATTTACTATTACAACCCTATGGAAAAAATCTCATAAGA-**

CATGGACAAATGCAGACCAAATTCTCATACAGGGTTATGAGAGTCTATGAGATCTGATA-  
 GATTCTTATAACTCGGTATGAGAATTTGGTCTGCATTTTTCCATGTTTTATGA-  
 GATTCTTTCCATAGGGAAGTAGTATTACCAAGTACCTCTTACGACACAACTGTTATA-  
 GAGCTCCTGGGGGAATGGGTGTGGGATCGACAATGGGTTGTCTATAGGTTAAGG-  
 TAACCGGCCACCATCAGACGGACCGTATGCTTGATTGCAAACCTAGTGGTATAAG-  
 TATTTGTTAGTCAATTAATCATTCAATTTATTAGTAACACGCCGTATAGTACCAATATTT-  
 TACGTAGTAAAAATGGCATGGACAACAGCCCGTGGATATATATATATATATATTTGAA-  
 AAAAAATAAAAAAATTGGTAAAGAGATATTTTTGTTTCAGCCGTCCGCAGTATCCAAG-  
**CACTTCGTAGCGCTGTCTACAAACGGGGAAAAGGTTTCCGCATTTCGGTATCGACCCAA-**  
**GAACATGTTTGGTTTCTGGGACTGGGTGGGAGGCAGGTGGGAAACAAAACCTATTGCTACT-**  
 TACTATTAGTAATATATTTATTATAATAGTAATGATACTTGACTGATTGACAATGGAG-  
 GATGTGTCTTCAATATTAACCGCTCCGGTGTAGTGGTGCAGTAGTCGCCTAAAAACAC-  
 CAACGGTATGCGGGTTCGAATCCCCTCGGGATGGATATTTGTATTTGTACAGA-  
 TATTCCTTGCTGTCTCGTGGGCTCTCAGTCAGCAGGTTAAGCCGTCGATCCCCTGGTGT-  
 TATCATAAATACCTGATAGCGATCATTACTCATAAAAGGAAACATAATTATATAGCTC-  
 CAATCCTTCTCTACGTGGTGAACGAAGCCAGCCAGCAGTGGGACGATACAAGCT-  
 GAATTCATAAAATCAATGTGATACTAAGTGAAAGTACAATTCCGTAACCCATTTATATTAG-  
 GACTGATATAATAAAAAATAATAATTAATTTAGTTTCTTATTAGCCATCACACTGTAATTA-  
 CAATTTAGCGAATTTGTAAACAAAAGATCTAAATTTATAATTTTTTAATAATTAAC-  
 TATTGTACCCCATCTTCTGATAACAACGTACAAGGGACTGATAGCTTTTATAAGAAGGG-  
 TAAAACTTAGAGCTATTTAATAAACTCTATTATGTTTTAGATACTCGCTCTGGTCTGC-  
**TATCGGTCTATCCATCTCTSTAYGTCGGCTTTGAGAAGCTTYGAGAAGCTTCTAGAAG-**  
**GAGCTAGCTTCATGGATARTCACTTTACAACGGCWCCGTTGGAGAAAAAYGTATGGTGA-**  
 TATTGAAATAAGTAATTATATTTTATTTGAAAACGATGCAAAACGAATCGCTTTATGAATA-  
 TAGGAACCGGGTTTTAGAAATGCTATTAGATTTTTTTTTGTGTGGTAACATTTTGTATGAA-  
 ATCAATATTCAAATTTTAAGTTGTTTGTAGTTACTAAGTTAGTAGATTACTGTAAAAT-  
 GAGTAAAATTTAAATAATTATAATCTCCTGAATATTTCTAATTTTCTGTGCAACATCCA-  
 TAATTTTTCAGTCAGTAAGACCTACATAGATAGTATAAGAATTTTTAAAAAATGATTATT-  
 GAAGTTATGGCGTGACCAAGGGACAGGAATTTATTTATAGATATATGATATAGATTACTTG-  
 TAATATTTTTGAGCCTTAAGGTCTAGTGTGCCACAACATAAAACCCGCGTTGCCATATA-  
 TATTTAGATGAATAATAAAATAATATTATCGTAGCGCCAGTWATCTTAGCGCTGTTAG-  
**GAGTGTGGTACAGYAAGTTCTACGGAGCGGAGACGCACGCTCTCCTTMMTACGACCAG-**  
**TACTTGCACAGGTAACGTTTATTTACTAGTRAATACTCTTTAATGTTTCGACATACACAC-**  
 TYCTCAAAGACATGTAACATAACAATAATAATATRACCATAATTGTGTTTGTTCGTAA-  
 ATRAAAAAACGAGTGTSCCTTAGACMWCACRWCTGAWGTAAAACCTTYTYGACAAAYAG-  
 GYSTRCYGTGTCTTAGWTATAYGWAWYGCAACTGATTATGAGRGAAGAGGGACAGAA-  
 AATGTGTGCTCGCACCTCTCTCTATTGCTCCGTTAACCTYGCCGATCACACTTTTVMMA-  
 AAAAYAGGCGMAATGAGAACCCTTTTTAAMRAATATTGCGCGGACGGAGCACAATGAA-  
 ATTTGCGACAYTTACAGATTATATCCATAAAAAATACATTAATCAATAAATAAATAAAA-  
 AATWAWTACAAAACCTACCWTGTATTTGACACACACACACATGCATAAT-  
 TAATCTTTTGTTTTTYTTTTTTTTATAATAGAAGTATAGTATTTGACAACAGARCCTTAA-  
 TARTRTTCAWACTTATAATTTAAATTAATTATGGTCGWATTTGWCACRYGGCGACCAC-  
 TARTTATTATWATAATTAGTTATATYTTTTCTAYTAGATTTCGCAGCGTACTTCCAACAAGGGCAGATG-  
**GAR(SNP3:A/G)AGCAACGGTAAATACGTCACACGTGGGGGGSAYGARGTGCRGTACAGYACGGGCC**

**CATCGTGTGGGGGAGCCGGGGACYAACGGGCAGCACGCCTTCTACCAGCTGATACAC-  
CAGGGGACCAGTACTTRTGAAAATRTTTTGAGCGTAATGTATTCTATCTCACTCTCG-  
CYATACGTTTATGTGCTTGTTTCTWTATYRTGACGATTTTTTGTTCATCGAGCTTCAAAT-  
CATAACGATTCTAAAGAAAATTATTCGAAAACGGRATATTTACCATGTTTTWT-  
TATKTTTCGCWTTKCGGAGCTCGATATTTGACATTGACTTCSAATGTCTTGATCACGA-  
GACTGACTGAAAAAAGATTCTAAAGAATTTTAAATTAACATGTTTATTTTCATTACTAA-  
AATTGTTTAAAATGGCATATTTACAATGTTTTTCGATATTTGACATTATCTAT-  
GATTGTCTTGTTACGAGACTGGAAGAGAATAATAAAACGAAGAAGRGAAGAAAAGAAAGA-  
GATATCGATAATTTCACTTTAAAATTTCTTTTCTTCTCATTCTTCTCCTTCTCCT-  
CATCCTCCTTCTTCTTCTTTTAAACAAATAATCTATTTACCTATTACCATATTGTACCA-  
TATTTGTTGTTAATAGCTAAAAAGCAAACCGTCTTGTTGGTTTTGATTTA-  
GAGTTTTGTTTTATAATTAATTATAGTTTTATCTATTTAATAGATCTATCTTAT-  
TAACCTTTTTAAGAACATCATATATAYACTATAATTGTTTTTGAAACGAAAAAACCC-  
GACTTCAATTACATTGRYAAGTAATACAACGTAAGTAGAGGAAAAAATTAACAAACGCAC-  
TAGTCGCTACTACGGTTTTGAGGGTTCCCTGGATTCTCTGGGATTCCATCATCA-  
GATCCTGGTTTACTTATCATGATACCACACTGGGATCTCCTTTCCAACAAAAAATAAT-  
TATCAAAATCTGTTTATAAACGACCATGTTATCCCCGACGATCGAATTGAG-  
TAACCTCCTCCTTTTTCGGTTATAAAATACATGACTGAGACACACATTATTT-  
CATTTCTTTATTATTATTTATTATTAATGACTTCCAGATTGATTCCCTGTGACTT-  
CATCGCACAGCACAGACCCACAACCCCATATCCGGAGGCGTACACCATAA-  
GATCCTRCTCGCCAACTTCTGGCACAGACCGAGGCTCTCATGAAAGGCAAACTGCAGAA-  
GAAGTTMGTTTATTTTCAAACCTACCMWCTMAAGTCTATGATAAAAAAATTTGACTACCTT-  
GAACTRTTTCGAATTTATTCGAGWTAATAATRWTTAWTAWAYATATCGATACACACA-  
CAMAYATARTWTATTATAYMTAYAGTTGATTGKTCTAAGRTAAGGTAAGTACTGAGTAC-  
TACTGTGTACGTAGAGTGAGTACTCTACGTACAGCAGGAAATGTGCTGCTCAAATMTA-  
RATTTKCCCGKAGTGCCTTCTTGACCTGTGTTGYTTCCTGTTGGTGACTAAGGTGACCA-  
GAGCTCCTGGGAGGGGGGATTGGRGGTAGGYGCAGGCCTCTATAAGCTACGG-  
TAATCGCTTACCATCAGGTGAACCGTACGCTTCTTGCCGYCTAGTTGTATAAAGAA-  
AWGGTGGRTAACTTAATGCTAGTGTTTTAGGTAMCARCCAKCTAATATA-  
GAYACATTTTTTGKATAAAATGTGCATAAAAATAATGYTTATKTAATAAATAATATA-  
CAYATGTATAGTAACTACACRTTAACMAWATTCGATTTAGTTATATATTGTTATTMY-  
AGGCCAAAGCAGAGTTAGAAAAGTCTGGTATGGCACCAGAAGCGATCGCTAA-  
GATCCTGCCCCACAAGGTGTTCAAGGGCAACCGACCAACTCTATCGTTGTCAAGAA-  
AGTAACGCCGTTCACTCTTGGRGCACTTATCGGTAAGACATTTTTGTTTTAACMGACTT-  
CAAAAAGGMGGAGGTAAGTACTGAGGTAGAGTACAGTAGGAAATGTGCTGCAGTATTCTG-  
GAGTRAATCGATTSGGGAAGTTMYTCTTCGACCTTACATAATATCACAGTAAGTAATA-  
TYGCTGGCCATAATAATATGTGTATGTGTATATATAAATTTGCGKTTACGATG-  
TATGTGGGCGATAAACTCCGAAAATACTGAACCAMTTTTTATCAAATTTTGTAAGCATCTG-  
TAATTTGGTCCAACCTTGKGAGATAGGRTAGTTTTTATCTCAATTGGAYCCGG-  
TAGGTGGCGCTGCTATCAGTATGTAAGCAATCAAAATTTGGTAGCTGTTTTCCGGGCARGA-  
CAAAGTCRCCGGTCCGCTAGTATATGTATATATATATTTTTATGTGCTCGCGGACT-  
TYGTCMTTGTTRAAMCGATTTTGATRATTATYCTTTGTTGGAAARGAGATATCCY-  
AAGRGTGKTACCGTGATAAGGAAAGCAGGATCTGATGATGRCATGCYAGAGAAATCGAGGG-  
GAACCTTTYAAAATCGTAGTGGCGACTAGTGCGTTTGWTAATTTTTTCKTCTAMCGTTG-  
TATTTGTATAKTKTCGATSTAATTGAAGTCGATCTGTTTTTTTTTTCGTTTRMTAGCAA-**

ACACWATTATMTTRWTTTTATTTTCATRTATTGTGTAGTATTTTAAATGTATTAATCGT-  
GATGTAWYAAACTYYAATTCCAAATGGACGAYGAATTTATGMAGTWSTCTCAGCRACCGGA-  
TATTRCGYCACAGRTCACAGATWGGATCCCTTCTTGTARCAAACATTTTATAGGCAATA-  
GATTTTCATCTGAACGTTTGTGTTTGTGTACCTATTATGTRTTYCCGTATCCACGWCACAG-  
GAGTCAAACCTAGTTAGGGCGTYGTCTGTGAGACGATTATTACCCGACTGCCAAG-  
GAAGGGTTATGTTTTTCGCGCGTATCTTGTATGTATGTATGTATGTTTGTATGTAA-  
TATTCTTTACTACCTCATATTTCCAGAACCACTGAACGGATTACATAATTGAGGTACCTT-  
TAGGTTTCGTCTTAGCTGCCAAGTGTCTTAGATAGGTGACATTAATAAAAAAATCAAACAA-  
AAGCGGCTGCGCGAAGCCATTGTAGTTAATGAAAAAAAAAATTTTTCTCGAATACTACAA-  
TATGGGTATCAAATTGAAGGGCACAATACAAGGATTTAAAAAGGTATATCATGATTAT-  
TATTACCGTAATACTAATAAAGAAATACAATATTAAGTTTAAAAAATGTG-  
GACTTTGCTCTTTCCACGCCTATGCCATGCCACATGTACATAACATGCAGTCGGAGA-  
CATGCACAAAGAGAGAATGATTTGACTTATCCTTCAATTTTATGCCTCCGATTGCATAT-  
TATCTACGACGTTGCATAAAGTTTCGAAGGACTACCGTATTAATATATTTTAAATGTACAG-  
CACAAAATGTTTGATATTGTTTCTATTTATTTTCGCTGACTTTGTGTGCATATTGAATTTT-  
TATCTTGTCCAGCTTTTTCAGTTGATTTTCTATTAGTTGTTCTTCACG-  
CAGGCGGGTTTTTTGTTTATTTTTAATTATTATTTATTTATAATTCWGCATRCAYATTW-  
TATTTTACGATTTCAAATCATGTTTATGATTAAATAAAAAATGCTTAGAATAGATCTT-  
TAATTGGCGATTATTAATGTGTGAATGTGGTTAAGGCAGTTCTTCGAAGAGAACCGCTC-  
GAATCCATTGTTGATGAATGATAGTTTGTCTAATTTAACACAAAAATTTATACACAGATTG-  
TAATGATTTTTAAAGAGATAATTTATGCTTTTATATTTAACGCAAATAATATATAATAA-  
ATTTTTAATTAATTAATTAAGGTTAGTTAATTTAATTTTAAATTTTTTATTATTATTAT-  
TATTATTTTATTATATTTAACGCATGGTTAGACACGATGCTGTGTGCGGCGGTTTATTGTTA-  
CACGCTTATCATGACTTATTATACTACGAATGAATTTAGTGGGACGTCATATAAACGA-  
GAAGCTATTAATTTGTGTGTGTATGGGTGTAATTATATAGAAAAAATAAATTTTAACTT-  
TAAAAACGTAATTTAAGATATTTAGTTTTTTTACATACTTTATATGTATTTACTGTACCAA-  
AAATGACATGAAAAATTTTTTTTAGCTATGTACGARCACAARATCTTCACCCAGGGTGT-  
GATCTGGGACATCAACTCATTTCGATCAGTGGGGAGTTGAGCTCGGCAAGCAACTCGC-  
TAAGGCCATAGAGCCAGAATTACAAGACTCCAAGCCGGTGGCTCTCAYGATGCMTCAC-  
GAACGGTCTCATCAATTTCTTGAAACAAAAATTTGCTTAGAATATTTTTTATTGAAT-  
TAATTTCTAACTCTAAATTTGACTAATAAAAAAGCAATAATTTTTGGATTTTATTA-  
GAACTTTTTTTAATGCTTATTTATATACTTATTCGAAAAAATAAAGTAATTTGTAGA-  
GAATACGTTTAGTATTGTACATTTAATATATGTCTGTACAATAAAATGTAATTATGAGAA-  
TAAAATTTATAAAGAAAAATACACGAAATCACATCACTATATAAATGGTMCAATTATTATT-  
GATGCGATGTTAAAAATAAACCCTTTTATATTATATATGTACTGGTTTTTGTGAATGC-  
GATCWGTTTAGTATTGATCTATATTGTCTATTACTTGTATTTAATACTTAAGTATGTAA-  
CATTTATTTATATATGTTTATGAATAGACTGTGCAATGTAATAAATTAATATAAAATTC

## qPCR-ohjelmat

## PGI SNP2 SimpleProbe ajo-ohjelma:

Program Name	Cycles	Analysis Mode
Pre-Incubation	1	None
Amplification	40	Quantification
Melting Curve	1	Melting Curves
Cooling	1	None

## Temperature Targets:

Target (°C)	Ac.Mode	Hold	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)
Pre-Incubation				
95	None	0:10:00	4.8	
Amplification				
95	None	0:00:10	4.8	
57	Single	0:00:20	2.5	
72	None	0:00:20		
Melting Curve				
95	None	0:01:00	4.8	
40	None	0:01:00	2.5	
75	Continuous			10
Cooling				
40	None		2.5	

## HybProbe ajo-ohjelma:

Program Name	Cycles	Analysis Mode
Pre-Incubation	1	None
Amplification	45	Quantification
Melting Curve	1	Melting Curves
Cooling	1	None

## Temperature Targets:

Target (°C)	Ac.Mode	Hold	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)
Pre-Incubation				
95	None	0:10:00	4.8	
Amplification				
95	None	0:00:10	4.8	
58	Single	0:00:20	2.5	
72	None	0:00:20		
Melting Curve				
95	None	0:01:00	4.8	
40	None	0:01:00	2.5	
75	Continuous			3
Cooling				
40	None		2.5	

## SNP-geenit

Numero	Nimi (KO kuvaus)	Blast kuvaus
1	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase [EC:1.2.1.12]	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.
2	phosphoglycerate kinase [EC:2.7.2.3]	Putative phosphoglycerate kinase.
3	alcohol dehydrogenase [EC:1.1.1.1]	Putative alcohol dehydrogenase.
4	fructose-bisphosphate aldolase, class I [EC:4.1.2.13]	Fructose 1,6-bisphosphate aldolase.
5	aldehyde dehydrogenase (NAD+) [EC:1.2.1.3]	Mitochondrial aldehyde dehydrogenase.
6	phosphoglycerate mutase [EC:5.4.2.1]	Phosphoglyceromutase.
7	alcohol dehydrogenase [EC:1.1.1.1]	Putative alcohol dehydrogenase.
8	aldehyde dehydrogenase (NAD(P)+) [EC:1.2.1.5]	Aldehyde dehydrogenase.
9	aldose 1-epimerase [EC:5.1.3.3]	Aldose-1-epimerase.
10	6-phosphofructokinase [EC:2.7.1.11]	Phosphofructokinase.
11	6-phosphogluconate dehydrogenase [EC:1.1.1.44]	6-phosphogluconate dehydrogenase.
12	transaldolase [EC:2.2.1.2]	Transaldolase.
13	6-phosphogluconolactonase [EC:3.1.1.31]	Hypothetical protein (Fragment).
14	ribulose-phosphate 3-epimerase [EC:5.1.3.1]	ENSANGP00000010041 (Fragment).
15	ribose 5-phosphate isomerase A [EC:5.3.1.6]	Ribose-5-phosphate isomerase.
16	ribose-phosphate pyrophosphokinase [EC:2.7.6.1]	Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase.
17	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase [EC:1.1.1.49]	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase.
18	small subunit ribosomal protein SAe	Ribosomal protein SA.
19	large subunit ribosomal protein L1e	Ribosomal protein L11.
20	large subunit ribosomal protein L3e	Ribosomal protein L3.
21	large subunit ribosomal protein L7Ae	Ribosomal protein L7A.
22	large subunit ribosomal protein L4e	Ribosomal protein 23.
23	large subunit ribosomal protein L6e	Ribosomal protein L6.
24	large subunit ribosomal protein L24e	Ribosomal protein L24.
25	large subunit ribosomal protein L40e	Ribosomal protein L40.
26	large subunit ribosomal protein L12e	Ribosomal protein L12.
27	large subunit ribosomal protein L15e	Ribosomal protein L15.
28	small subunit ribosomal protein S17e	Ribosomal protein S17.
29	small subunit ribosomal protein S8e	40S ribosomal protein S8.
30	large subunit ribosomal protein L22e	Ribosomal protein L22.
31	small subunit ribosomal protein S7e	Ribosomal protein S7e.
32	large subunit ribosomal protein L4	Ribosomal protein L4.
33	large subunit ribosomal protein L10Ae	60S ribosomal protein L10a.
34	small subunit ribosomal protein S23e	40S ribosomal protein S23.
35	large subunit ribosomal protein L14e	Ribosomal protein L14.
36	large subunit ribosomal protein L13Ae	60S ribosomal protein L13A.
37	large subunit ribosomal protein L27Ae	Ribosomal protein L27A2.
38	small subunit ribosomal protein S15e	Ribosomal protein S15.
39	large subunit ribosomal protein L23e	Ribosomal protein L23.
40	small subunit ribosomal protein S27Ae	Ubiquitin/ribosomal protein S27Ae fusion protein.



## Mikrosatelliittigeenit

Numero	Homologin nimi	NCBI-numero	Toistoyksikkö
1	VPS72_DROME	Q9VKM6	AAG
2	Q7PX62_ANOGA	Q7PX62	AAG
3	Q9VKP5_DROME	Q9VKP5	AATAT
4	Q8IQ03_DROME	Q8IQ03	ACTGG
5	DKC1_DROME	O44081	AAG
6	Q17AF8_AEDAE	Q17AF8	AT
7	Q7QCH6_ANOGA	Q7QCH6	AAAC
8	Q4W4D2_ANTMY	Q4W4D2	AAAC
9	Q1HQ87_BOMMO	Q1HQ87	ACT
10	Q17K38_AEDAE	Q17K38	AAAT
11	Q17L27_AEDAE	Q17L27	AAGAG
12	Q17DA8_AEDAE	Q17DA8	AAG
13	Q5TUL1_ANOGA	Q5TUL1	AAT
14	Q5TUL1_ANOGA	Q5TUL1	AAT
15	Q2F6A6_BOMMO	Q2F6A6	AGC
16	Q8MZH7_DROME	Q8MZH7	AAC
17	Q6XJ11_DROYA	Q6XJ11	CCG
18	Q29NS9_DROPS	Q29NS9	AAAAT
19	Q16K18_AEDAE	Q16K18	AAG
20	Q17I69_AEDAE	Q17I69	ACTG
21	A0EM56_BOMMO	A0EM56	AAAT
22	Q5TN61_ANOGA	Q5TN61	AAATT
23	Q5FYZ4_BOMMO	Q5FYZ4	AAAT
24	Q296S7_DROPS	Q296S7	AAGC
25	Q1HQB1_BOMMO	Q1HQB1	AATGG
26	Q3HR35_BOMMO	Q3HR35	AATAT
27	Q1HQ12_BOMMO	Q1HQ12	AATAC
28	Q1HQ12_BOMMO	Q1HQ12	AAACT
29	Q2F6A1_BOMMO	Q2F6A1	AAATT
30	Q17K84_AEDAE	Q17K84	ATC
31	Q5ZLP9_CHICK	Q5ZLP9	AAATT
32	Q5UAL8_BOMMO	Q5UAL8	AAG
33	Q16UH6_AEDAE	Q16UH6	AAG
34	Q2F6A0_BOMMO	Q2F6A0	AAAT
35	Q5UAP4_BOMMO	Q5UAP4	AGC
36	Q1HQ22_BOMMO	Q1HQ22	AAC
37	Q5YJK1_MAMBR	Q5YJK1	AAG
38	Q0IF15_AEDAE	Q0IF15	AAAT
39	Q66PK1_BOMMO	Q66PK1	AAT
40	Q6PTY2_BOMMO	Q6PTY2	ACAT

## SNP-lokusten MegaBace-tulokset

**1. Glyseraldehydi 3-fosfaatti dehydrogenaasi.**

Negatiivinen kontrolli: G =&gt; GA/AR (0.00)/A (0.00)/R (0.00)

Näyte	Alleeli 1	Alleeli 2	Piikki 1	Piikki 2	Laatu	Alleeli 1	Alleeli 2
A1	G	G	774.0	--	2.4	G	G
A2	G	G	733.0	--	9.8	G	G
A3	G	G	745.0	--	9.0	G	G
A4	G	G	737.0	--	9.5	G	G
A5	G	G	736.0	--	9.6	G	G
A6	G	G	737.0	--	9.5	G	G
A7	G	G	729.0	--	9.8	G	G
A8	G	G	740.0	--	9.3	G	G
A9	G	G	724.0	--	9.4	G	G
A10	G	G	746.0	--	9.0	G	G
A11	G	G	742.0	--	9.2	G	G
A12	G	G	742.0	--	9.2	G	G
A13	G	G	722.0	--	9.3	G	G
A14	G	G	729.0	--	9.8	G	G
A15	G	G	751.0	--	8.7	G	G
R1	G	G	724.0	--	9.4	G	G
R2	G	G	725.0	--	9.5	G	G
R3	G	G	709.0	--	8.5	G	G
R4	G	G	709.0	--	8.5	G	G
R5	G	G	713.0	--	8.8	G	G
R6	G	G	715.0	--	8.9	G	G
R7	G	G	691.0	--	3.6	G	G

**1. Glyseraldehydi 3-fosfaatti dehydrogenaasi.**

CT (0.11) =&gt; CT/AR (0.16)/A (0.23)/R (0.00)

Huom. Reverse-alue

Näyte	Alleeli 1	Alleeli 2	Piikki 1	Piikki 2	Laatu	Alleeli 1	Alleeli 2	Piikki	Piikki 2	Laatu	Alleeli 1	Alleeli 2
A1	A	G	631.0	631.0	7.8	G	G	--	717.0	9.7	G	G
A2	A	A	596.0	--	2.2	A	A	713.0	--	9.5	A	A
A3	A	G	619.0	624.0	8.5	G	G	--	725.0	3.3	A	G
A4	A	G	615.0	634.0	8.3	A	G	714.0	725.0	9.2	A	G
A5	A	G	589.0	602.0	9.4	G	G	--	729.0	9.0	G	G
A6	A	G	612.0	635.0	8.3	A	G	720.0	734.0	8.7	A	G
A7	A	G	633.0	638.0	7.7	G	G	--	738.0	6.9	G	G
A8	A	G	596.0	605.0	9.7	G	G	--	735.0	2.5	G	G
A9	A	G	593.0	611.0	9.7	G	G	--	658.0	6.8	G	G
A10	G	G	601.0	601.0	3.1	G	G	--	690.0	2.8	G	G
A11	A	G	605.0	614.0	9.3	G	G	--	679.0	7.8	G	G
A12	A	G	603.0	612.0	9.4	G	G	--	719.0	9.6	G	G
A13	A	G	584.0	602.0	9.1	A	G	707.0	721.0	9.4	A	G
A14	A	G	567.0	581.0	8.2	G	G	--	711.0	9.7	G	G
A15	A	G	566.0	584.0	8.1	A	G	674.0	684.0	7.9	A	G
R1	A	G	620.0	629.0	8.4	G	G	--	720.0	9.5	G	G
R2	G	G	--	589.0	8.7	G	G	--	716.0	9.8	G	G
R3	G	G	--	618.0	9.3	G	G	--	720.0	9.5	G	G
R4	G	G	--	627.0	0.4	G	G	--	718.0	9.6	G	G
R5	G	G	--	555.0	4.3	G	G	--	728.0	9.0	G	G
R6	G	G	--	607.0	9.8	G	G	--	740.0	0.3	G	G
R7	A	G	561.0	583.0	7.8	G	G	--	714.0	6.4	G	G

## 3. Alkoholidehydrogenaasi

CT(0.17) =&gt; CT/AR (0.00)/A (0.00)/R (0.00)

Näyte	Alleeli 1	Alleeli 2	Piikki 1	Piikki 2	Laatu	Alleeli 1	Alleeli 2	Piikki 1	Piikki 2	Laatu	Alleeli 1	Alleeli 2	Piikki 1	Piikki 2	Laatu	Alleeli 1	Alleeli 2
A1	C	C	357.0	-	6.1	-	-	-	-	10.0	-	-	-	-	-	C	C
A2	C	C	355.0	-	9.7	-	-	-	-	10.0	C	C	393.0	-	7.5	C	C
A3	C	C	353.0	-	9.8	-	-	-	-	10.0	C	C	398.0	-	6.6	C	C
A4	C	C	354.0	-	9.7	-	-	-	-	10.0	C	C	373.0	-	7.6	C	C
A5	C	C	348.0	-	9.7	-	-	-	-	10.0	C	C	386.0	-	8.4	C	C
A6	C	C	348.0	-	9.7	-	-	-	-	10.0	C	C	387.0	-	8.5	C	C
A7	C	C	344.0	-	9.4	-	-	-	-	10.0	C	C	385.0	-	7.9	C	C
A8	C	C	351.0	-	9.9	-	-	-	-	10.0	C	C	387.0	-	1.5	C	C
A9	-	-	-	-	0.0	C	C	340.0	-	4.4	C	C	379.0	-	7.0	C	C
A10	C	C	343.0	-	9.4	C	C	349.0	-	3.4	C	C	376.0	-	7.0	C	C
A11	C	C	339.0	-	5.2	C	C	352.0	-	3.4	C	C	391.0	-	7.7	C	C
A12	C	C	348.0	-	9.7	-	-	-	-	10.0	C	C	377.0	-	9.5	C	C
A13	C	C	353.0	-	9.8	-	-	-	-	10.0	C	C	376.0	-	7.0	C	C
A14	C	C	359.0	-	9.4	-	-	-	-	10.0	C	C	392.0	-	9.3	C	C
A15	C	C	353.0	-	9.8	-	-	-	-	10.0	C	C	395.0	-	6.8	C	C
R1	C	C	353.0	-	9.8	C	C	345.0	-	8.6	C	C	392.0	-	9.3	C	C
R2	C	C	350.0	-	9.8	C	C	349.0	-	8.8	C	C	373.0	-	9.3	C	C
R3	C	C	345.0	-	9.5	C	C	348.0	-	8.8	C	C	377.0	-	9.5	C	C
R4	C	C	367.0	-	8.9	C	C	335.0	-	8.1	C	C	364.0	-	8.7	C	C
R5	C	C	348.0	-	9.7	-	-	-	-	10.0	C	C	373.0	-	9.3	C	C
R6	C	C	365.0	-	9.0	-	-	-	-	10.0	C	C	370.0	-	9.1	C	C
R7	C	C	346.0	-	9.6	-	-	-	-	10.0	C	C	374.0	-	9.3	C	C

## 3. Alkoholidehydrogenaasi

Negatiivinen kontrolli: T =&gt; TC/AR (0.00)/A (0.00)/R (0.00)

Näyte	Alleeli 1	Alleeli 2	Piikki 1	Piikki 2	Laatu	Alleeli 1	Alleeli 2
A1	T	T	614.0	-	8.9	T	T
A2	T	T	598.0	-	9.9	T	T
A3	T	T	595.0	-	2.7	T	T
A4	T	T	600.0	-	9.8	T	T
A5	T	T	583.0	-	9.0	T	T
A6	T	T	590.0	-	9.4	T	T
A7	T	T	579.0	-	8.7	T	T
A8	T	T	589.0	-	9.3	T	T
A9	T	T	591.0	-	8.6	T	T
A10	T	T	601.0	-	9.7	T	T
A11	T	T	595.0	-	9.7	T	T
A12	T	T	593.0	-	7.7	T	T
A13	T	T	587.0	-	9.2	T	T
A14	T	T	584.0	-	9.0	T	T
A15	T	T	596.0	-	9.8	T	T
R1	T	T	596.0	-	9.8	T	T
R2	T	T	612.0	-	9.0	T	T
R3	T	T	601.0	-	9.7	T	T
R4	T	T	613.0	-	8.9	T	T
R5	T	T	611.0	-	9.1	T	T
R6	T	T	615.0	-	4.1	T	T
R7	T	T	607.0	-	9.3	T	T

**5. Aldehydidehydrogenaasi**

Negatiivinen kontrolli: A=&gt; AG/AR (0.00)/A (0.00)/R (0.00)

Näyte	Alleeli 1	Alleeli 2	Piikki 1	Piikki 2	Laatu	Alleeli 1	Alleeli 2
A1	A	A	--	462.0	9.7	A	A
A2	A	A	--	474.0	9.3	A	A
A3	A	A	--	460.0	9.6	A	A
A4	A	A	--	467.0	9.8	A	A
A5	A	A	--	482.0	8.9	A	A
A6	A	A	--	468.0	9.7	A	A
A7	A	A	--	473.0	9.4	A	A
A8	A	A	--	478.0	9.1	A	A
A9	A	A	--	466.0	9.9	A	A
A10	A	A	--	469.0	9.7	A	A
A11	A	A	--	452.0	9.1	A	A
A12	A	A	--	461.0	9.6	A	A
A13	A	A	--	464.0	9.8	A	A
A14	A	A	--	495.0	8.1	A	A
A15	A	A	--	451.0	9.0	A	A
R1	A	A	--	440.0	6.5	A	A
R2	A	A	--	447.0	8.8	A	A
R3	A	A	--	405.0	6.6	A	A
R4	A	A	--	444.0	4.1	A	A
R5	A	A	--	457.0	2.9	A	A
R6	-	-	--	--	0.0	-	-
R7	A	A	--	449.0	5.7	A	A

**6. Fosfoglyseraattimutaasi**

Negatiivinen kontrolli: A=&gt; AC/AR (0.11)/A (0.17)/R (0.00)

Näyte	Alleeli 1	Alleeli 2	Piikki 1	Piikki 2	Laatu	Alleeli 1	Alleeli 2
A1	A	A	545.0	--	1.4	A	A
A2	A	C	524.0	336.0	0.9	A	C
A3	A	A	529.0	--	9.8	A	A
A4	A	A	537.0	--	9.3	A	A
A5	A	A	530.0	--	9.8	A	A
A6	A	C	517.0	322.0	0.3	A	C
A7	A	C	517.0	330.0	1.5	A	C
A8	A	C	532.0	345.0	5.3	A	C
A9	A	A	513.0	--	9.0	A	A
A10	A	C	545.0	347.0	0.6	A	C
A11	A	A	526.0	--	1.4	A	A
A12	A	A	537.0	--	9.3	A	A
A13	A	A	541.0	--	9.1	A	A
A14	A	A	512.0	--	8.9	A	A
A15	A	A	541.0	--	9.1	A	A
R1	A	A	518.0	--	9.3	A	A
R2	A	A	529.0	--	9.8	A	A
R3	A	A	517.0	--	9.2	A	A
R4	A	A	524.0	--	9.6	A	A
R5	A	A	528.0	--	9.9	A	A
R6	A	A	529.0	--	9.8	A	A
R7	A	A	537.0	--	8.7	A	A

**6. Fosfoglyseraattimutaasi****GT (0.11) => GT/AR (0.00)/A (0.00)/R (0.00)**

Huom. Reverse-alkue

Näyte	Alleeli 1	Alleeli 2	Piikki 1	Piikki 2	Laatu	Alleeli 1	Alleeli 2	Piikki	Piikki 2	Laatu	Alleeli 1	Alleeli 2
A1	C	C	419.0	--	9.3						C	C
A2	C	C	417.0	--	7.4						C	C
A3	C	A	398.0	423.0	3.1	C	C	513.0	--	9.6	C	C
A4	C	C	418.0	--	7.0						C	C
A5	C	C	406.0	--	8.6						C	C
A6	C	C	413.0	--	9.0						C	C
A7	C	C	403.0	--	8.4						C	C
A8	C	A	393.0	419.0	6.7	C	C	519.0	--	9.3	C	C
A9	C	C	384.0	--	3.7						C	C
A10	C	C	418.0	--	9.3						C	C
A11	C	C	424.0	--	9.7						C	C
A12	C	C	414.0	--	5.7	C	C	500.0	--	9.3	C	C
A13	C	C	406.0	--	8.6						C	C
A14	C	C	405.0	--	8.5						C	C
A15	C	C	422.0	--	4.9	C	C	505.0	--	9.6	C	C
R1	C	C	463.0	--	4.7						C	C
R2	C	C	456.0	--	4.3						C	C
R3	C	C	463.0	--	7.8						C	C
R4	C	C	456.0	--	8.2						C	C
R5	C	C	458.0	--	5.1						C	C
R6	C	C	473.0	--	7.3						C	C
R7	C	C	457.0	--	8.1						C	C

**9. Aldoosi-1-epimeraasi****TC (0.25) => TC/AR (0.00)/A (0.00)/R (0.00)**

Näyte	Alleeli 1	Alleeli 2	Piikki 1	Piikki 2	Laatu	Alleeli 1	Alleeli 2	Piikki	Piikki 2	Laatu	Alleeli 1	Alleeli 2
A1	T	T	518.0	--	9.6	T	T	509.0	--	7.9	T	T
A2	T	T	524.0	--	8.6	T	T	548.0	--	9.5	T	T
A3	T	T	515.0	--	8.1	T	T	541.0	--	9.8	T	T
A4	T	T	520.0	--	2.7	T	T	551.0	--	9.4	T	T
A5	T	T	529.0	--	4.8	T	T	552.0	--	9.3	T	T
A6	T	T	517.0	--	9.5	T	T	541.0	--	7.8	T	T
A7	T	T	508.0	--	8.7	T	T	553.0	--	7.1	T	T
A8	T	T	490.0	--	3.5	T	T	564.0	--	8.6	T	T
A9	T	T	514.0	--	9.3	-	-	--	--	0.0	T	T
A10	T	T	516.0	--	9.4	T	T	552.0	--	9.3	T	T
A11	T	T	519.0	--	9.6	T	T	532.0	--	6.6	T	T
A12	T	T	522.0	--	9.8	T	T	549.0	--	9.5	T	T
A13	T	T	531.0	--	9.4	T	T	526.0	--	8.6	T	T
A14	T	T	534.0	--	9.2	T	T	537.0	--	9.5	T	T
A15	T	T	534.0	--	9.2	T	T	532.0	--	7.3	T	T
R1	T	T	529.0	--	9.5	T	T	554.0	--	8.4	T	T
R2	T	T	531.0	--	4.1	T	T	550.0	--	9.4	T	T
R3	T	T	512.0	--	9.2	T	T	556.0	--	9.0	T	T
R4	T	T	551.0	--	4.9	T	T	552.0	--	9.3	T	T
R5	-	-	515.0	435.0	0.5	T	T	540.0	--	1.0	T	T
R6	T	T	519.0	--	9.6	T	T	550.0	--	9.4	T	T
R7	T	T	426.0	--	0.5	-	-	--	--	0.0	T	T

## 10. 6-Fosfofruktokinaasi

CT (0.15) =&gt; CT/AR (0.00)/A (0.00)/R (0.00)

Näyte	Alleeli 1	Alleeli 2	Piikki 1	Piikki 2	Laatu	Alleeli 1	Alleeli 2	Piikki	Piikki 2	Laatu	Alleeli 1	Alleeli 2	Piikki 1	Piikki 2	Laatu	Alleeli 1	Alleeli 2
A1	C	C	364.0		2.8	C	C	376.0		3.0						C	C
A2	C	T	363.0	558.0	1.1	C	C	381.0		10.0	C	C	425.0		1.6	C	C
A3	C	T	367.0	528.0	0.7	C	C	387.0		0.2	C	C	437.0		0.7	C	C
A4	C	T	379.0	573.0	0.9	C	C	378.0		3.8	C	C	418.0		9.9	C	C
A5	C	C	373.0		1.9	C	C	388.0		2.6	C	C	410.0		0.6	C	C
A6	C	C	373.0		1.4	C	C	382.0		2.3	C	C	455.0		1.5	C	C
A7	C	C	365.0		1.6	C	C	401.0		2.7						C	C
A8	C	C	360.0		1.5	C	C	376.0		5.5						C	C
A9	C	T	360.0	563.0	0.5	-	-			0.0	-	-			0.0	C	C
A10	C	C	371.0		2.1	C	C	394.0		1.9	C	C	434.0		1.8	C	C
A11	C	C	378.0		1.5	C	C	398.0		1.1						C	C
A12	C	C	378.0		1.4	C	C	400.0		0.4						C	C
A13	C	C	355.0		1.0	C	C	361.0		1.3	C	C	420.0		8.0	C	C
A14	C	C	364.0		2.1	C	C	408.0		1.3	C	C	417.0		3.6	C	C
A15	C	C	372.0		2.3	C	C	396.0		2.7						C	C
R1	C	C	360.0		3.0	C	C	386.0		8.9						C	C
R2	C	C	373.0		4.1	C	C	395.0		5.5						C	C
R3	C	T	369.0	569.0	1.3	C	C	365.0		4.4	C	C	386.0		8.0	C	C
R4	C	C	371.0		4.4	C	C	389.0		3.0						C	C
R5	C	C	370.0		4.6	C	C	377.0		5.1						C	C
R6	C	C	378.0		3.4	C	C	384.0		6.7						C	C
R7	C	C	370.0		4.7	C	C	386.0		6.8						C	C

## 14. Ribuloosifosfaatti-3-epimeraasi

TC (0.29) =&gt; TC/AR (0.39)/A (0.47)/R (0.21)

Näyte	Alleeli 1	Alleeli 2	Piikki 1	Piikki 2	Laatu	Alleeli 1	Alleeli 2	Piikki	Piikki 2	Laatu	Alleeli 1	Alleeli 2
A1	T	C	453.0	402.0	9.1						T	C
A2	T	T	451.0		9.4						T	T
A3	T	T	457.0		7.2						T	T
A4	C	C		394.0	1.2						C	C
A5	T	C	579.0	397.0	1.5						T	C
A6	T	T	467.0		9.3						T	T
A7	T	C	446.0	386.0	6.2						T	C
A8	T	T	447.0		9.2						T	T
A9	C	C		786.0	0.1						C	C
A10	T	C	421.0	289.0	0.1						T	C
A11	T	C	375.0	252.0	0.2						T	C
A12	T	C	372.0	245.0	0.1						T	C
A13	C	C		255.0	0.2						C	C
A14	T	C	421.0	295.0	0.1						T	C
A15	T	C	439.0	158.0	0.1						T	C
R1	T	C	456.0	399.0	9.3						T	C
R2	T	T	451.0		9.4						T	T
R3	T	T	614.0		0.3						T	T
R4	T	T	456.0		9.8						T	T
R5	T	T	458.0		4.8	T	T	462.0		8.5	T	T
R6	T	C	456.0	398.0	9.3						T	C
R7	T	C	445.0	391.0	7.4						T	C



**15. Ribooi-5-fosfaatti isomeraasi A****TC (0.50) => TC/AR (0.39)/A (0.55)/R (0.14)**

Huom. Reverse-alue

Näyte	Alleeli 1	Alleeli 2	Piikki 1	Piikki 2	Laatu	Alleeli 1	Alleeli 2	Piikki 1	Piikki 2	Laatu	Alleeli 1	Alleeli 2
A1	A	G	589.0	561.0	9.5	A	G	631.0	611.0	9.0	A	G
A2	A	A	597.0	--	9.2						A	A
A3	A	G	523.0	561.0	0.4	G	G	--	618.0	6.3	G	G
A4	G	G	--	573.0	3.6	G	G	--	615.0	6.4	G	G
A5	G	G	--	567.0	10.0	G	G	--	616.0	3.7	G	G
A6	G	G	--	583.0	10.0	G	G	--	615.0	7.4	G	G
A7	A	A	594.0	--	4.8	A	A	653.0	--	9.4	A	A
A8	A	G	562.0	547.0	8.5	A	G	658.0	637.0	8.7	A	G
A9	-	-	--	--	0.0	-	-	--	--	0.0	-	-
A10	-	-	--	--	0.0	-	-	--	--	0.0	-	-
A11	-	-	--	--	10.0	-	-	--	--	10.0	-	-
A12	-	-	--	--	10.0	-	-	--	--	10.0	-	-
A13	A	G	590.0	590.0	1.4	-	-	--	--	10.0	A	G
A14	A	G	610.0	600.0	0.2	-	-	--	--	10.0	A	G
A15	A	A	594.0	--	6.9	-	-	--	--	10.0	A	A
R1	A	A	606.0	--	8.6						A	A
R2	A	G	589.0	570.0	9.7						A	G
R3	A	A	547.0	--	7.6						A	A
R4	A	G	586.0	562.0	9.5						A	G
R5	A	A	584.0	--	9.8						A	A
R6	A	A	594.0	--	9.4						A	A
R7	A	A	599.0	--	9.1						A	A

**16. Ribosifosfaatti pyrofosfokinaasi****GA (0.25) => GA/AR (0.39)/A (0.10)/R (1.00)**

Huom. Reverse-alue

Näyte	Alleeli 1	Alleeli 2	Piikki 1	Piikki 2	Laatu	Alleeli 1	Alleeli 2
A1	C	C	398.0	--	9.7	C	C
A2	C	C	394.0	--	9.8	C	C
A3	C	C	391.0	--	3.6	C	C
A4	C	C	390.0	--	9.6	C	C
A5	C	T	389.0	425.0	6.3	C	T
A6	C	C	405.0	--	6.3	C	C
A7	C	C	414.0	--	6.6	C	C
A8	C	C	388.0	--	9.4	C	C
A9	C	C	402.0	--	9.5	C	C
A10	C	C	391.0	--	9.6	C	C
A11	C	C	387.0	--	9.4	C	C
A12	C	T	395.0	432.0	9.7	C	T
A13	C	T	396.0	781.0	0.4	C	T
A14	C	C	390.0	--	6.8	C	C
A15	C	C	405.0	--	9.3	C	C
R1	T	T	--	428.0	9.4	T	T
R2	T	T	--	427.0	9.4	T	T
R3	T	T	--	423.0	9.1	T	T
R4	T	T	--	422.0	9.1	T	T
R5	T	T	--	406.0	8.2	T	T
R6	T	T	--	438.0	9.7	T	T
R7	T	T	--	425.0	9.3	T	T

**18. Ribosomaalinen proteiini Sae, pieni alayksikkö.****TC (0.45) => TC/AR (0.35)/A (0.53)/R (0.00)**

Huom. Reverse-alue

Näyte	Alleeli 1	Alleeli 2	Piikki 1	Piikki 2	Laatu	Alleeli 1	Alleeli 2	Piikki	Piikki 2	Laatu	Alleeli 1	Alleeli 2
A1	A	G	563.0	558.0	8.8	A	G	611.0	602.0	9.6	A	G
A2	A	G	569.0	563.0	8.5	A	G	590.0	580.0	8.4	A	G
A3	A	G	578.0	521.0	1.9	G	G	-	582.0	8.7	G	G
A4	A	G	564.0	555.0	9.0						A	G
A5	A	G	549.0	540.0	9.5						A	G
A6	A	G	549.0	549.0	9.4	A	G	590.0	580.0	8.4	A	G
A7	A	A	552.0	-	9.7						A	A
A8	G	G	-	542.0	2.1						G	G
A9	A	A	563.0	-	9.4						A	A
A10	A	G	536.0	530.0	2.2	A	G	585.0	580.0	8.1	A	G
A11	A	G	545.0	540.0	2.6	A	G	634.0	624.0	8.6	A	G
A12	A	G	546.0	536.0	3.0	A	G	639.0	628.0	8.3	A	G
A13	A	G	534.0	521.0	2.6	A	G	636.0	630.0	8.2	A	G
A14	A	G	605.0	531.0	0.8	G	G	-	627.0	3.4	G	G
A15	A	G	558.0	540.0	2.3						A	G
R1	A	A	563.0	-	9.4	A	A	604.0	-	9.2	A	A
R2	A	A	568.0	-	9.1	A	A	623.0	-	9.4	A	A
R3	A	A	566.0	-	9.2	A	A	597.0	-	8.8	A	A
R4	A	A	561.0	-	9.5	A	A	635.0	-	8.7	A	A
R5	A	A	566.0	-	9.2	A	A	612.0	-	9.7	A	A
R6	A	A	580.0	-	8.4	A	A	628.0	-	9.1	A	A
R7	A	A	210.0	-	0.3	A	A	610.0	-	9.6	A	A

**18. Ribosomaalinen proteiini Sae, pieni alayksikkö.****TC (0.44) => TC/AR (0.13)/A (0.19)/R (0.00)**

Huom. Reverse-alue

Näyte	Alleeli 1	Alleeli 2	Piikki 1	Piikki 2	Laatu	Alleeli 1	Alleeli 2	Piikki	Piikki 2	Laatu	Alleeli 1	Alleeli 2
A1	A	G	687.0	706.0	5.1	A	G	725.0	736.0	8.7	A	G
A2	A	G	702.0	711.0	5.2	A	G	722.0	733.0	7.3	A	G
A3	A	A	660.0	-	9.7						A	A
A4	A	A	652.0	-	6.6						A	A
A5	A	A	657.0	-	8.0						A	A
A6	A	A	700.0	-	10.0	A	A	729.0	-	9.9	A	A
A7	-	-	-	-	10.0	-	-	-	-	10.0	-	-
A8	-	-	-	-	10.0	-	-	-	-	-	-	-
A9	A	G	660.0	664.0	7.0	A	G	730.0	741.0	3.0	A	G
A10	G	G	-	414.0	0.3	-	-	-	-	10.0	G	G
A11	A	A	648.0	-	4.1	-	-	-	-	0.0	A	A
A12	A	A	654.0	-	6.9	-	-	-	-	0.0	A	A
A13	A	A	646.0	-	9.2						A	A
A14	A	A	656.0	-	9.9						A	A
A15	A	A	653.0	-	9.7						A	A
R1	A	A	650.0	-	9.5						A	A
R2	A	A	645.0	-	9.2						A	A
R3	A	A	650.0	-	9.5						A	A
R4	A	A	652.0	-	9.6						A	A
R5	A	A	646.0	-	9.2						A	A
R6	A	A	646.0	-	9.2						A	A
R7	A	A	671.0	-	9.0						A	A



**19. Ribosomaalinen proteiini L11e, suuri alayksikkö.**

TC (0.44) =&gt; TC/AR (0.13)/A (0.19)/R (0.00)

Huom. Reverse-alue

Näyte	Alleeli 1	Alleeli 2	Piikki 1	Piikki 2	Laatu	Alleeli 1	Alleeli 2
A1	A	G	550.0	507.0	9.5	A	G
A2	A	G	548.0	511.0	9.3	A	G
A3	A	G	548.0	506.0	9.6	A	G
A4	A	A	563.0	–	4.1	A	A
A5	A	G	558.0	517.0	8.9	A	G
A6	A	A	534.0	–	4.7	A	A
A7	A	A	545.0	–	4.5	A	A
A8	A	A	555.0	–	4.3	A	A
A9	A	G	559.0	518.0	8.9	A	G
A10	A	A	549.0	–	6.0	A	A
A11	A	A	533.0	–	4.7	A	A
A12	A	G	558.0	512.0	9.1	A	G
A13	A	G	534.0	493.0	9.2	A	G
A14	A	G	549.0	507.0	9.5	A	G
A15	A	G	547.0	506.0	9.6	A	G
R1	A	A	533.0	–	5.7	A	A
R2	A	A	550.0	–	4.4	A	A
R3	A	A	530.0	–	4.9	A	A
R4	A	A	542.0	–	3.3	A	A
R5	A	A	550.0	–	3.2	A	A
R6	A	A	538.0	–	3.1	A	A
R7	A	A	545.0	–	5.8	A	A

**24. Ribosomaalinen proteiini L24e, suuri alayksikkö.**

GT (0.18) =&gt; GT/AR (0.11)/A (0.17)/R (0.00)

Huom. Reverse-alue

Näyte	Alleeli 1	Alleeli 2	Piikki 1	Piikki 2	Laatu	Alleeli 1	Alleeli 2
A1	C	C	391.0	–	10.0	C	C
A2	C	C	395.0	–	9.9	C	C
A3	C	C	390.0	–	9.6	C	C
A4	C	C	383.0	–	9.2	C	C
A5	C	C	401.0	–	4.1	C	C
A6	C	A	390.0	448.0	7.1	C	A
A7	C	C	386.0	–	10.0	C	C
A8	C	A	387.0	451.0	7.3	C	A
A9	C	C	409.0	–	9.0	C	C
A10	C	C	404.0	–	9.3	C	C
A11	C	C	396.0	–	9.8	C	C
A12	C	A	401.0	469.0	8.2	C	A
A13	C	A	381.0	440.0	6.7	C	A
A14	C	A	399.0	460.0	7.7	C	A
A15	C	C	398.0	–	9.7	C	C
R1	C	C	402.0	–	9.4	C	C
R2	C	C	403.0	–	9.3	C	C
R3	C	C	376.0	–	8.8	C	C
R4	C	C	402.0	–	9.4	C	C
R5	C	C	386.0	–	9.4	C	C
R6	C	C	395.0	–	9.9	C	C
R7	C	C	384.0	–	9.2	C	C

**29. Ribosomaalinen proteiini S8c, pieni alayksikkö.****AG (0.26) => AG/AR (0.67)/A (0.73)/R (0.50)**

Näyte	Alleeli 1	Alleeli 2	Piikki 1	Piikki 2	Laatu	Alleeli 1	Alleeli 2	Piikki	Piikki 2	Laatu	Alleeli 1	Alleeli 2
A1	G	G	-	481.0	8.5						G	G
A2	G	G	-	481.0	4.4						G	G
A3	G	G	-	498.0	9.5						G	G
A4	G	G	-	485.0	8.8						G	G
A5	A	G	544.0	471.0	7.3	A	G	616.0	529.0	9.6	A	G
A6	A	A	552.0	-	7.7						A	A
A7	G	G	-	491.0	9.1						G	G
A8	A	G	427.0	472.0	3.4	G	G	-	534.0	9.9	G	G
A9	A	A	602.0	-	9.1						A	A
A10	A	G	595.0	513.0	9.3						A	G
A11	G	G	-	512.0	5.1						G	G
A12	G	G	-	512.0	6.6						G	G
A13	A	G	616.0	531.0	8.2						A	G
A14	A	G	615.0	531.0	8.2						A	G
A15	G	G	-	513.0	4.2	G	G	-	542.0	9.4	G	G
R1	A	G	602.0	525.0	8.6	A	G	598.0	513.0	8.6	A	G
R2	A	A	579.0	-	9.2	A	G	615.0	534.0	9.6	A	G
R3	-	-	-	-	0.0	A	G	617.0	531.0	9.7	-	-
R4	A	A	581.0	-	9.4	A	G	610.0	526.0	9.3	A	G
R5	A	A	583.0	-	9.5	A	G	625.0	539.0	9.5	A	G
R6	A	G	583.0	504.0	9.5	A	G	630.0	542.0	9.2	A	G
R7	A	G	600.0	512.0	9.2	A	G	640.0	557.0	6.6	A	G

**32. Ribosomaalinen proteiini L4, suuri alayksikkö.****GA (0.43) => AG/AR (0.18)/A (0.20)/R (0.14)**

Näyte	Alleeli 1	Alleeli 2	Piikki 1	Piikki 2	Laatu	Alleeli 1	Alleeli 2	Piikki	Piikki 2	Laatu	Alleeli 1	Alleeli 2
A1	G	G	631.0	-	1.0	G	G	651.0	-	8.4	G	G
A2	G	G	645.0	-	1.2	G	G	675.0	-	4.7	G	G
A3	G	A	625.0	702.0	9.0	G	A	685.0	762.0	8.7	G	A
A4	G	G	657.0	-	2.0	G	G	687.0	-	4.4	G	G
A5	G	G	647.0	-	10.0	G	G	660.0	-	5.2	G	G
A6	G	G	651.0	-	0.5	G	G	689.0	-	4.4	G	G
A7	G	G	667.0	-	0.6	G	G	680.0	-	4.8	G	G
A8	G	G	647.0	-	9.4	G	G	684.0	-	3.4	G	G
A9	G	G	641.0	-	1.4	G	G	684.0	-	4.5	G	G
A10	G	A	616.0	691.0	8.5	G	A	652.0	733.0	8.5	G	A
A11	G	G	640.0	-	1.4	G	G	662.0	-	4.5	G	G
A12	A	A	-	707.0	9.9	A	A	-	724.0	8.7	A	A
A13	G	G	628.0	-	3.6	G	G	656.0	-	4.5	G	G
A14	G	A	629.0	710.0	9.2	G	G	661.0	-	4.2	G	A
A15	G	A	656.0	734.0	8.3	G	G	656.0	-	4.3	G	A
R1	G	A	636.0	718.0	9.2	G	G	699.0	-	3.5	G	A
R2	G	G	634.0	-	4.6	G	G	697.0	-	4.4	G	G
R3	G	G	620.0	-	2.5	G	G	686.0	-	4.9	G	G
R4	G	G	651.0	-	9.2	G	G	694.0	-	1.8	G	G
R5	G	A	638.0	721.0	9.1	G	A	685.0	763.0	3.7	G	A
R6	G	G	635.0	-	1.6	G	G	678.0	-	3.8	G	G
R7	G	G	632.0	-	0.5	G	G	691.0	-	2.8	G	G

**34. Ribosomaalinen proteiini S23e, pieni alayksikkö.**

CT (0.46) =&gt; AG/AR (0.55)/A (0.39)/R (0.40)

Näyte	Alleeli 1	Alleeli 2	Piikki 1	Piikki 2	Laatu	Alleeli 1	Alleeli 2	Piikki	Piikki 2	Laatu	Alleeli 1	Alleeli 2
A1	C	C	461.0	-	9.9						C	C
A2	C	C	454.0	-	9.5						C	C
A3	T	T	-	485.0	5.6						T	T
A4	-	-	-	-	10.0	-	-	-	-	10.0	-	-
A5	T	T	-	479.0	9.3						T	T
A6	T	T	-	487.0	9.8						T	T
A7	C	T	450.0	487.0	9.2						C	T
A8	T	T	-	468.0	4.5	T	T	-	515.0	7.3	T	T
A9	T	T	-	492.0	9.7						T	T
A10	T	T	-	507.0	8.8						T	T
A11	T	T	-	499.0	9.2						T	T
A12	C	C	457.0	-	9.6						C	C
A13	T	T	-	499.0	9.2	T	T	-	545.0	8.9	T	T
A14	C	C	458.0	-	9.7						C	C
A15	C	C	473.0	-	9.1						C	C
R1	C	T	446.0	482.0	9.0						C	T
R2	C	T	450.0	489.0	9.2						C	T
R3	-	-	-	-	10.0	-	-	-	-	10.0	-	-
R4	-	-	-	-	10.0	-	-	-	-	10.0	-	-
R5	C	T	451.0	491.0	9.3						C	T
R6	C	T	431.0	467.0	8.1	C	T	486.0	523.0	9.5	C	T
R7	C	C	428.0	-	7.9	C	C	472.0	-	6.3	C	C

**37. Ribosomaalinen proteiini L27Ae, suuri alayksikkö.**

TC (0.50) =&gt; AG/AR (0.73)/A (0.80)/R (0.57)

Näyte	Alleeli 1	Alleeli 2	Piikki 1	Piikki 2	Laatu	Alleeli 1	Alleeli 2
A1	T	C	542.0	517.0	9.6	T	C
A2	T	C	526.0	498.0	8.9	T	C
A3	C	C	-	505.0	9.4	C	C
A4	C	C	-	510.0	9.7	C	C
A5	C	C	-	487.0	8.4	C	C
A6	T	C	541.0	517.0	9.6	T	C
A7	C	C	-	502.0	9.2	C	C
A8	C	C	-	505.0	7.8	C	C
A9	C	C	-	502.0	9.2	C	C
A10	C	C	-	509.0	7.5	C	C
A11	C	C	-	494.0	6.9	C	C
A12	T	C	531.0	507.0	9.2	T	C
A13	T	C	520.0	499.0	8.5	T	C
A14	C	C	-	504.0	9.4	C	C
A15	T	C	519.0	494.0	8.5	T	C
R1	C	C	-	534.0	8.6	C	C
R2	T	C	567.0	538.0	8.3	T	C
R3	T	C	579.0	547.0	7.7	T	C
R4	T	T	548.0	-	9.5	T	T
R5	C	C	-	526.0	9.0	C	C
R6	T	C	553.0	525.0	9.1	T	C
R7	T	C	563.0	540.0	8.2	T	C

**39. Ribosomaalinen proteiini L23e, suuri alayksikkö.****CT (0.38) => CT/AR (0.36)/A (0.37)/R (0.36)**

Huom. Reverse-alue

Näyte	Alleeli 1	Alleeli 2	Piikki 1	Piikki 2	Laatu	Alleeli 1	Alleeli 2	Piikki	Piikki 2	Laatu	Alleeli 1	Alleeli 2
A1	G	A	542.0	666.0	8.6	G	G	615.0	--	9.5	G	G
A2	G	A	523.0	660.0	8.9	G	G	619.0	--	9.7	G	G
A3	G	A	532.0	843.0	2.6	G	G	640.0	--	8.8	G	G
A4	G	A	520.0	611.0	7.9	G	A	618.0	725.0	6.2	G	A
A5	G	A	531.0	673.0	8.2	G	G	630.0	--	9.4	G	A
A6	-	-	--	--	10.0	G	A	612.0	715.0	6.6	G	A
A7	G	A	532.0	677.0	8.0	G	G	617.0	--	9.6	G	A
A8	-	-	--	--	10.0	G	A	634.0	739.0	5.6	G	A
A9	G	G	536.0	--	9.2	G	A	575.0	827.0	3.1	G	G
A10	G	A	520.0	660.0	8.9	G	G	617.0	--	0.3	G	A
A11	A	A	--	612.0	3.6	A	A	--	712.0	4.5	A	A
A12	G	A	515.0	599.0	7.3	G	A	605.0	708.0	6.9	G	A
A13	G	G	534.0	--	9.3	G	G	630.0	--	9.4	G	G
A14	G	A	521.0	602.0	7.5	G	A	627.0	728.0	6.1	G	A
A15	G	A	517.0	657.0	9.1	G	G	637.0	--	8.9	G	A
R1	G	A	499.0	628.0	8.3	G	A	640.0	718.0	0.6	G	A
R2	-	-	--	--	10.0	G	G	635.0	--	7.5	G	G
R3	G	G	508.0	--	1.2	G	G	645.0	--	8.5	G	G
R4	G	A	508.0	639.0	8.8	G	A	636.0	267.0	0.7	G	A
R5	G	A	529.0	--	10.0	G	A	606.0	218.0	0.4	G	A
R6	-	-	--	--	10.0	G	A	644.0	235.0	0.6	G	A
R7	-	-	--	--	10.0	G	A	603.0	227.0	0.6	G	A

**40. Ribosomaalinen proteiini S27Ae, pieni alayksikkö.****TC (0.40) => CT/AR (0.43)/A (0.53)/R (0.21)**

Näyte	Alleeli 1	Alleeli 2	Piikki 1	Piikki 2	Laatu	Alleeli 1	Alleeli 2	Piikki	Piikki 2	Laatu	Alleeli 1	Alleeli 2
A1	T	C	356.0	288.0	9.5						T	C
A2	C	C	--	265.0	7.1						C	C
A3	T	T	352.0	--	0.8	T	T	500.0	--	0.4	T	T
A4	T	C	340.0	270.0	8.9						T	C
A5	T	T	347.0	--	3.2						T	T
A6	C	C	--	280.0	9.5						C	C
A7	C	C	--	278.0	8.2						C	C
A8	C	C	--	261.0	5.7						C	C
A9	T	C	357.0	285.0	9.5						T	C
A10	T	C	353.0	279.0	9.5						T	C
A11	C	C	--	279.0	9.5						C	C
A12	T	C	359.0	290.0	9.4	T	C	402.0	333.0	7.6	T	C
A13	T	C	356.0	361.0	6.0	T	C	418.0	424.0	5.1	T	C
A14	T	C	353.0	362.0	6.0	T	T	433.0	--	3.8	T	T
A15	T	T	345.0	--	5.8						T	T
R1	T	C	358.0	284.0	9.4						T	C
R2	T	C	347.0	272.0	9.0						T	C
R3	C	C	--	649.0	0.9	T	C	436.0	346.0	9.0	T	C
R4	-	-	--	--	10.0	T	T	432.0	--	9.3	T	T
R5	T	T	339.0	--	9.2						T	T
R6	C	C	--	677.0	0.7	T	T	413.0	--	8.2	T	T
R7	T	T	363.0	--	7.5						T	T

## Mikrosatelliittilokusten MegaBace-tulokset

Ajo 1.

Näyte	MS1 AAG	MS11 AAGAG	MS17 CCG	MS32 AAG	MS33 AAG	MS36 AAC	MS37 AAG
A1	529,7	174,9	183,0	358,2	221,4	<b>380,1</b>	304,3
A2	529,6	174,7	182,8	358,0	221,2	381,0	304,1
A3	530,6	174,7	182,9	358,1	221,3	377,0 / 381,1	304,2
A4	<b>526,5 / 529,4</b>	174,7	182,9	358,1	221,3	381,0	304,0
A5	530,4	174,8	182,9	358,1	221,3	376,9 / 380,6	304,1
A6	526,3 / 530,7	174,8	183,0	358,1	221,3	377	304,1
A7	529,8	174,8	183,0	358,2	221,3	377 / 381,1	304,1
A8	530,7	174,8	183,1	358,2	221,3	380,8	304,2
A9	529,5	174,9	182,9	358,2	221,4	<b>377,1</b>	304,2
A10	529,7	174,8	183,0	358,1	221,3	381,1	304,1
A11	529,6	174,8	183,0	358,1	221,3	377,0	304,1
A12	<b>526,2 / 529,6</b>	174,7	182,9	358,1	221,3	381,1	304,3
A13	<b>528,6 / 531,5</b>	174,7	182,9	358,2	221,3	380,7	304,0
A14	530,4	174,7	182,9	358,2	221,3	376,9 / 381,0	304,1
A15	<b>526,3 / 529,3</b>	174,8	182,9	358,1	221,3	376,9 / 380,1	304,2
A16	527,6	174,9	183,0	358,1	221,3	377,1	304,2
A17	<b>526,5 / 530,6</b>	174,8	183,0	358,2	221,3	377	304,0
A18	<b>529,7</b>	174,7	182,9	358,0	221,2	377	304,1
A19	<b>530,7</b>	174,7	183,0	358,1	221,2	376,9 / 381,0	304,0
A20	529,5	174,7	183,0	358,1	221,3	376,9 / 381,0	304,1
A21	530,5	174,7	182,8	358,2	221,3	380,7	304,0
A22	X	174,7	182,9	358,1	221,2	381,1	304,1
A23	<b>526,1</b>	174,7	182,9	358,1	221,2	381,0	304,1
A24	X	174,8	182,9	358,1	221,2	381,0	304,1
A25	<b>526,5</b>	174,7	183,0	358,1	221,2	377	304,0
A26	529,7	174,8	182,9	358,2	221,3	377,0 / 380,7	304,2
A27	<b>530,6</b>	174,7	182,9	358,0	221,1	380,7	304,0
A28	<b>530,7</b>	174,8	182,9	358,2	221,2	376,9 / 380,7	304,1
A29	X	174,7	182,9	358,0	221,2	380,8	304,1
A30	X	174,8	182,9	358,2	221,3	381,0	304,1
A31	529,5	174,8	183,0	358,2	221,3	380,8	304,0
A32	530,8	174,8	183,0	358,2	221,3	380,8	304,4
A33	529,6	174,8	182,9	358,1	221,4	377,0 / 381,1	304,2
A34	529,5	174,8	182,9	358,1	221,3	377,0 / 379,3	303,9
A35	<b>528,5 / 531,6</b>	174,7	182,9	358,1	221,3	379,3	304,1
A36	530,5	174,7	182,9	358,2	221,3	376,9	304,2
A37	530,6	174,8	182,9	358,1	221,1	376,8	304,0
A38	<b>530,7</b>	174,7	182,9	358,1	221,2	377,0	304,0
A39	<b>527,7 / 530,8</b>	174,8	182,9	358,1	221,2	377,1 / 380,3	304,1
A40	X	174,7	182,9	358,1	221,3	380,2	304,2
R1	530,2	174,8	183,0	358,1	221,4	377	304,1
R2	<b>528,8</b>	174,7	182,9	358,0	221,3	376,9	304,1
R3	<b>528,5</b>	174,8	182,9	358,1	221,3	376,9	304,1
R4	529,0	174,8	182,9	358,1	221,3	376,9	304,1
R5	530,0	174,8	182,9	358,1	221,3	376,9	304,0
R6	528,9	174,9	182,9	358,1	221,4	376,9	304,1
R7	X	174,9	183,0	358,1	221,4	377,1	304,2



Ajo 2.

Näyte	MS1	MS11	MS17	MS32	MS33	MS36	MS37
	AAG	AAGAG	CCG	AAG	AAG	AAC	AAG
A1	529,4	174,6	182,9	358	221,1	381,0	304,2
A2	529,5	174,6	182,8	358,1	221,2	380,9	304,1
A3	<b>531</b>	174,7	183,1	358,1	221	377,4 / 381,5	304,6
A4	<b>528,4</b>	174,7	182,8	358,1	221,1	380,9	303,9
A5	520,83	174,6	182,9	358	221	376,8 / 380,7	304,1
A6	527,1 / 530,3	174,6	182,9	358,1	221,1	x	304,0
A7	<b>528,4 / 531,4</b>	174,6	182,9	358,1	221,1	376,8 / 381	304,0
A8	530,6	174,6	183	358,1	221,1	380,6	304,1
A9	529,4	174,7	182,8	358,1	221,2	x	303,9
A10	529,2	174,7	182,8	358,1	221,1	380,9	303,9
A11	529,5	174,6	182,9	358,1	221,1	376,9	304,1
A12	526,2 / 529,4	174,7	182,8	358,1	221,1	380,9	303,9
A13	529,5	174,7	182,9	358,2	221,2	380,6	304,0
A14	530,6	174,7	182,9	358,1	221,1	377,0 / 381,0	304,1
A15	<b>526,2 / 529,3</b>	174,7	182,9	358,1	221,1	376,9 / 380,1	304,1
A16	527,6	174,8	182,9	358,1	221,2	377	304,1
A17	526,1 / 530,4	174,7	182,9	358,1	221,1	376,9	304,0
A18	529,4	174,7	182,9	358	221,1	378,7	303,9
A19	<b>530,3</b>	174,7	182,9	358,1	221,1	376,8 / 380,9	303,8
A20	529,3	175	182,8	<b>359,5</b>	221,5	376,8 / 380,8	303,9
A21	530,3	174,6	182,8	358,1	221,1	380,5	304,0
A22	X	174,7	182,8	358,1	221,1	379,1	304,0
A23	<b>529,3</b>	X	182,8	X	X	380,9	303,9
A24	X	174,7	182,9	358,1	221,1	380,1	304,2
A25	<b>526,1</b>	174,7	182,8	358,1	221,1	378,8	304,0
A26	529,5	174,7	182,9	358	221,2	376,9 / 380,6	304,0
A27	<b>526,4</b>	174,7	182,8	358,1	221,1	380,5	303,9
A28	530,5	174,7	182,9	358,2	221,2	376,9 / 380,6	304,1
A29	526,1	174,7	182,8	358,1	221,2	380,6	303,9
A30	<b>528,0 / 531,3</b>	174,6	182,8	358,1	221,1	380,9	303,9
A31	529,4	174,8	182,9	358,2	221,2	380,8	303,9
A32	530,9	174,7	182,9	358,2	221,1	380,7	304,2
A33	<b>528,6</b>	174,8	182,8	358,2	221,3	376,9 / 380,9	304,1
A34	529,2	174,7	182,8	358	221,2	376,8 / 379,1	303,8
A35	<b>528,4 / 531,4</b>	174,7	182,8	358,2	221,1	379,1	304,0
A36	530,4	174,6	182,8	358,2	221,1	376,9	304,0
A37	530,3	174,7	182,8	358,1	221,1	376,8	304,0
A38	530,5	174,6	182,8	358,1	221,1	376,9	303,9
A39	<b>526,1 / 530,3</b>	174,8	182,9	358,2	221,1	376,8 / 380,0	303,9
A40	X	174,7	182,9	358,1	221,1	380,1	304,2
R1	530,0	174,7	183	358,1	221,2	376,9	304,0
R2	<b>505,2 / 527,6</b>	174,8	182,9	358	221,3	376,9	304,0
R3	X	174,7	182,9	358,1	221,2	376,9	304,0
R4	<b>505,2 / 527,7</b>	174,7	182,9	358	221,2	376,9	304,0
R5	529,9	174,7	182,8	358,1	221,2	376,8	303,9
R6	529,8	174,7	182,9	358	221,2	376,8	304,0
R7	X	174,7	182,9	358	221,2	376,8	304,0