

COMPAS-PCR fremgangsmåte og fremgangsmåter for påvisning, identifisering eller overvåking av laksearter og /eller kjønn

5 OPPFINNELSENS OMRÅDE

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en asymmetrisk PCR-metode; COMplementary-Primer-Asymmetric (COMPAS)-PCR, og spesifikke metoder for å detektere, identifisere eller overvåke arter og / eller kjønn hos laksefisk. Den foreliggende oppfinnelsen omfatter

- 10 oligonukleotidprimere tilsvarende artsspesifikke sekvenser. Bruken av metodene og primerne er også et aspekt av den foreliggende oppfinnelse sammen med sett («kit») som omfatter nevnte primere.

BAKGRUNN FOR OPPFINNELSEN

- 15 Siden Polymerase Chain Reaction (PCR) ble oppfunnet av Kary Mullis på midten av 80-tallet [1], har nukleinsyre (NA) amplifiseringsteknikker hatt en enestående påvirkning når det gjelder utviklingen av molekylærbiologiske anvendelser. En medvirkende faktor til denne suksessen er dens fleksibilitet i forhold til endringer, dette utvider de tekniske mulighetene til PCR. Det er
- 20 utviklet flere metoder spesielt for påvisning av punktmutasjoner som «Amplification Refractory Mutation System» (ARMS) [2] og varianter som PCR«Amplification of Specific Allels» (PASA) [3, 4], toveis - Pasa [5] eller Mismatch Amplifiserings mutasjonstest (MAMA) [6], Taq - MAMA [7] og Melt - MAMA [8]. Punktmutasjoner også kalt enkel nukleotid polymorfisme (SNP), utgjør differensierende genetisk informasjon som kan være relevant i ulike sammenhenger som
- 25 f.eks medisinsk bruk for sykdomsdiagnostikk, populasjonsgenetikk og artsidentifisering. Ettersom mengden av PCR applikasjoner øker kan begrensningene som ligger i DNAets kjemi bli mer utfordrende. For eksempel kan primer komplementaritet som fører til "primer-dimers" dannelse være en begrensende faktor for utformingen av generisk PCR.

- 30 Det antas at den asymmetriske PCR-metoden vil utbedre begrensningene som ligger i PCR metoden som følge av primer komplementaritets-inkompatibilitet. Nevnte metode ble ytterligere anvendt i utviklingen av en PCR-analyse for direkte repeterte sekvenser.
- NA-teknologien kan karakteriseres som ikke-invasiv, da svært lite materiale er nødvendig for å skaffe tilstrekkelig NA for analyse. Oppdrettsnæringen har behov for slike ikke-invasive
- 35 fremgangsmåter for identifisering av art og kjønn hos laksefisk og særlig *Salmo salar* (atlantisk laks) og *Salmo trutta* (ørret) og deres hybrider. Metoder for bestemmelse av arter og inter-art hybridisering mellom ulike laksefiskearter er et viktig verktøy i økologiske studier, og ved vurdering av virkningen som rømlinger fra oppdrettsanlegg har på populasjonen av vill laksefisk. Økologiske studier har vist at inter-art hybridisering kan ha sterk påvirkning på populasjonens

størrelse og levedyktighet.

Morfologisk diskriminering mellom hybrider og foreldrearter er i mange tilfeller vanskelig (f.eks. *S. salar* X *S. trutta*), adferden til hybridene også kan være forskjellig fra adferden til foreldreartene [9].

Genetisk kjønnsbestemmelse uten terminal prøvetaking (dvs. ved å drepe fisken) er et verdifullt verktøy i økologiske studier som benytter telemetri. Forskjell i kjønnsatferd hos fisk er ofte en oversett parameter ved vurdering av populasjonens sårbarhet i forhold til miljøforstyrrelser, dvs. i anadrom ørret (*Salmo trutta*), er det en markert kjønnskjevhet i "anadromity", som gjør hunnene (dvs. den økologisk relevante reproduktive delen av populasjonen) mer utsatt for marine miljøfaktorer enn hannene.

Det er også et stort kommersielt potensial for genetisk kjønnsbestemmelse i akvakultur næringen. De avlsselskap som leverer rogn fra utvalgte stammer er i dag avhengige av ultralyd-kjønnsbestemmelse når fisken er 1-2 kg. Denne fremgangsmåten er arbeidskrevende og kostbar. Genetisk kjønnsbestemmelse på et tidlig stadium vil gjøre det mulig for selskapene å redusere produksjonskostnadene for hunner ved tidlig eliminering av hanner, og dermed eliminere den medfølgende kostnaden.

Identifisering av fiskearter ved PCR, er tidligere undersøkt og flere løsninger har vært foreslått. Ved valg av tilgjengelige metoder for identifisering av laks og ørret som f.eks. i Referansene [10-14], fremgangsmåten publisert av AM Pendas et al. (Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5 S rDNA Cytogenet Cell genet 67:31-36 (1994)) [14] synes å gi det beste resultatet blant de testede metodene. Overraskende oppdaget oppfinneren at fremgangsmåten ikke var egnet for det ovennevnte formål for identifikasjon av artene *Salmo salar* og *Salmo trutta*, da artene ikke differensierte seg fra hverandre på en tilfredsstillende måte ved bruk av PCR metoden og primere som er beskrevet i [14]. Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer en robust og enkel PCR-metode som er i stand til spesifikt å identifisere *Salmo salar* og aller helst å skille mellom *Salmo Salar*, *Salmo trutta* og deres hybrider.

Oppfinneren testet Salmo-A & B PCR metoden utviklet av AM Pendas et al.; primerne var opprinnelig designet basert på 5S rDNA sekvens av regnbueørret (*Salmo gairdnerii*, omdøpt *Oncorhynchus mykiss*) [15] og brukt på *Salmo trutta* og *Salmo salar* i tillegg til andre fiskearter [16]. Disse primere amplifiserer 118bp av 120bp kodede sekvensen for 5S rDNA sammen med den tilknyttede variable ikke-kodede sekvensen. Det amplifiserte produktet(ene) varierte i lengde, og ble brukt å skille nære arter. To "loci" ble opprinnelig funnet å være amplifisert for

Salmo salar, ett stor produkt på om lag 255bp og et mindre produkt på rundt 525bp. Disse resultater er bekreftet av de 2 publiserte sekvensene for *Salmo salar* gb S73107.1 & gb S73106.1. Tilsvarende viste også *Salmo trutta* et dobbel-båndmønster, men med lengre produkter både for store og små "loci" [14].

5

Hybrider fra *Salmo salar* og *Salmo trutta* ble funnet å produsere begge produkttyper for store "loci" på rundt 255bp og henholdsvis lenger [16]. Ingen forskjeller i produkter(ene) mellom *Salmo salar* og for *Salmo trutta* ble detektert ved hjelp av fremgangsmåten utviklet av AM Pendas et al., da denne metoden ble testet av oppfinneren for å differensiere *Salmo salar* fra *Salmo trutta* og deres hybrider. Det genetiske målet for nevnte PCR metode, 5S - rDNA, ble brukt til å utvikle en ny og innovativ fremgangsmåte samt spesifikke oligonukleotid-primere for den foreliggende oppfinnelsen.

10

Det meste av arbeidet som er utført for å identifisere kjønnsassosierte genetiske markører hos laksefisk har brukt regnbueørret eller Chinook laks som modellorganismer [17-25]. Flere av disse målene ble testet av oppfinneren på *Salmo salar* i et forsøk på å skille hunner fra hanner ved PCR, men uten å lykkes.

15

I august 2012, publiserte Yano et al., "Master Sex-Determining" gen sdY i regnbueørret [26]. Primerne beskrevet av Yano et al. ble deretter anvendt av oppfinneren for å videreutvikle en spesiell PCR-metode som var i stand til å identifisere kjønn hos *Salmo salar* og *Salmo trutta*. Det antas at fremgangsmåten i den foreliggende oppfinnelsen vil være en mer pålitelig test for identifisering av kjønn hos laksefisk, fortrinnsvis i *Salmo salar* og *Salmo trutta*. Det er videre antatt at både identifikasjon av kjønn og identifisering av art slik det er beskrevet ovenfor vil være mulig å oppnå i en enkelt test.

25

SAMMENFATNING AV OPPFINNELSEN

Foreliggende oppfinnelse omfatter i et første aspekt en fremgangsmåte for asymmetrisk PCR som omfatter å:

30

- tilveiebringe en nukleinsyreprøve som anvendes som en måltemplat ;
- identifisere måltemplatene(e)
- utføre en polymerase kjedereaksjon, ved å utnytte svært komplementære primere der enten fremover- eller revers primerkonsentrasjonen reduseres for å oppheve blokkeringen av PCR-reaksjonen ved først å fremme lineær amplifisering som gradvis vil skifte mot eksponensiell amplifisering ved COMplementary-Primer-ASymmetric (COMPAS)-PCR;
- identifisere den amplifiserte nukleotid-målsekvensen(er);

35

Et annet aspekt av den foreliggende oppfinnelsen omfatter en

fremgangsmåte for påvisning, identifisering eller overvåking av laksearter som omfatter å:

- tilveiebringe en nukleinsyreprøve fra laksefisk til bruk som mål-templat(er);
- utføre en polymerase kjedereaksjon (PCR) COMplementary-Primer-ASymmetric (COMPAS)-PCR i følge oppfinnelsen, for å amplifisere en nukleinsyre-målsekvens i templat(en), ved å benytte et sett eller flere sett av svært komplementære primer-par i stand til å prime nevnte mål;
- identifisere den amplifiserte nukleotid-målsekvensen(er);
- bestemme arten.

10 I et tredje aspekt av den foreliggende oppfinnelse tilveiebringes oligonukleotidprimere, valgt fra oligonukleotidene fra Tabell 1 eller 2, eller en hvilken som helst kombinasjon derav, eller oligonukleotider med komplementære sekvenser eller funksjonelle tilsvarende sekvenser.

15 I et fjerde aspekt omfatter foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for å bestemme kjønn hos laksefisk som omfatter å:

- tilveiebringe en nukleinsyreprøve fra laksefisk for å anvendes som (en) mål templat(er);
- utføre en to-trinns tosidig sanntid polymerase kjedereaksjon (qPCR), for å amplifisere en nukleinsyre målsekvens av templat(en), ved å benytte et sett eller flere sett av primerpar valgt fra Tabell 3,
- identifisere den amplifiserte nukleotid-målsekvensen(e);
- bestemme kjønn ved en smeltekurveanalyse av PCR-produktet.

I et femte aspekt ved den foreliggende oppfinnelse omfattes en fremgangsmåte for påvisning og identifisering av laksearter og/eller kjønn som omfatter
 25 fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1-17, og "High Resolution Melt analysis", der primersettene er valgt fra Tabellene 1, 2 og/eller 3, eller komplementære sekvenser derav, i en hvilken som helst kombinasjon

Videre er det tilveiebrakt i et sjette aspekt et sett for deteksjon og identifisering av laksearter, som omfatter en samling oligonukleotidprimere valgt fra Tabellene 1 og 2 hvilke som helst
 30 kombinasjoner eller komplementære sekvenser derav, som er i stand til å detektere laksearter ved fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse.

Et syvende aspekt ved den foreliggende oppfinnelse omfatter et sett for påvisning og
 35 identifikasjon av laksearter og/eller kjønn som består av en samling av primere valgt fra Tabellene 1, 2 og/eller 3, eller komplementære sekvenser derav, i en hvilken som helst kombinasjon som er i stand til å detektere laksearter og/eller kjønn ved fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse

I videre aspekter omfatter foreliggende oppfinnelse anvendelse av fremgangsmåtene ifølge foreliggende oppfinnelse, eller oligonukleotidprimerne ifølge foreliggende oppfinnelse, eller anvendelsen av settene tilveiebrakt fra den foreliggende oppfinnelsen.

5

Foretrukne utførelsesformer er angitt i patentkravene og i den detaljerte beskrivelse av oppfinnelsen.

BESKRIVELSE AV FIGURENE

10

Figur 1. Illustrerer COMPAS - PCR optimaliseringseksempel for *Salmo salar* og *Salmo trutta* med varierende konsentrasjoner av fremover primer 5SNTS - 23F 0,6 til 0,05 μ M mens en benytter en konstant konsentrasjon på 0,6 μ M for den revers primeren 5SNTS - 22R+2.

15

Figur 2. Illustrerer et forenklet diagram av den direkte gjentatte sekvens COMPAS -PCR og spesielt anvendt ved metoden for identifisering av arter.

20

Figur 3. Illustrerer et detaljert diagram av metoden for identifisering av arter. Alle testede primere er vist med piler. "*Salmo salar* spesifikk" viser den bestemte reverse primeren med tre nukleotider "overheng" i NTS-delen.

25

Figur 4. Illustrerer spesifikk amplifiseringsdifferensiering mellom *Salmo salar* og *Salmo trutta*, ved bruk av en revers primer med en ekstra nukleotid i 3 ' sammenlignet med Fig. 3: 5SNTS-23R+3. Fremover og reverse primerkonsentrasjoner er som beskrevet i figur 3.

30

Figur 5. Illustrerer amplifiseringskurver for tosidig qPCR utført på *S. salar*, *S. trutta* og hybrider for å skille hanner fra hunner basert på SDY deteksjon. 18S brukes som en positiv kontroll.

35

Figur 6. Illustrerer smeltekurveanalyse for "duplex" qPCR utført på *S. salar*, *S. trutta* og hybrider, for å skille menn fra kvinner basert på SDY deteksjon. 18S brukes som en positiv kontroll.

Figur 7. Illustrerer identifisering av arter metodeprimere. Primerpar 5SNTS23F +

35

5SNTS23R+3 er indikert med pilene. Merk: Alle reverse primere er vist som sine reverse komplement.

Figur 8. Illustrerer resultatene for identifisering av arten med fremgangsmåten som beskrevet i eksempel 2.

5 DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

Det er et mål for foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe en asymmetrisk PCR-metode og ikke-invasive metoder for identifisering av arter og/eller kjønn blant laksefisk, fortrinnsvis *Salmo salar* og *Salmo trutta* og deres hybrider ved å bruke nesten komplementære primere rettet mot direkte tandem repetisjoner. Foreliggende oppfinnelse omfatter også oligonukleotid primere som tilsvarer artsspesifikke sekvenser eller Singel Nukleotid Polymorfisme (SNP). Anvnedelsen av fremgangsmåten og primerne er også et aspekt av foreliggende oppfinnelse, sammen med et sett omfattende nevnte primere. For å frigjøre komplementære primere fra hverandre for amplifikasjon av målproduktet, ble asymmetrisk PCR metoden utviklet ved å minske enten fremover eller revers primer konsentrasjon inntil optimal PCR amplifikasjon er nådd. Som vist i figur 1, har denne progressivt generert sterk og lik amplifisering (ikke spesifikke) for både *S. salar* og *S. trutta* siden fremover primer konsentrasjonen ble redusert. Asymmetriske PCR- er tidligere beskrevet for å øke probebasert deteksjon hvor PCR vil skifte fra eksponentielt til lineær amplifisering for å favorisere probehybridisering til sin enkelt trådet sekvens, en metode som kalles "Linear-After-The-Exponential" (LATE)-PCR [27, 28]. I den foreliggende oppfinnelsen hvor primerne som brukes er svært komplementære vil den asymmetriske PCR ha et motsatt mønster skiftende fra lineær til eksponentiell amplifisering som effektivt fjerner amplifiseringshemming som ellers observeres med komplementære primere (se Fig. 1).

I løpet av de første amplifiseringsrundene vil den konsentrasjonsbegrensede primeren hovedsakelig bli blokkert av den overskytende primeren slik at lineær amplifisering finner sted. Lineært produkt akkumuleres, målsekvenskonsentrasjonen for de begrensede primerne øker, konsentrasjonen av de blokkerende komplementære primerne synker, derfor styrkes målpriming og påfølgende eksponentiell amplifisering. Vi betegner denne PCR-metoden som COMplementary-Primer-ASymmetric (COMPAS)-PCR. De angitte laksefisk eksemplene (eksemplene 2 og 4) bruker komplementær primere som også har den samme målsekvensen, men det er forutsatt at fremgangsmåten kan anvendes på dels komplementære primere som har distinkte målsekvenser.

For å identifisere nukleotidsekvenser som er egnet som et mål for å skille mellom artene gjorde oppfinneren en strukturell studie av 5S-rDNA tandem direkte repetisjoner og la merke til at enhver del av tandem direkte repetisjon som dekker en lengde typisk for primerne (dvs. 20bp)

ville være hensiktsmessig for å utforme komplementære primere som strukturelt dekker ett eller flere produkter avhengig av antall tandem direkte repetisjoner (se Fig. 2). Det er allment kjent innen fagfeltet at når primerne er designet med hensyn på ikke tandem direkte repetert DNA, vil komplementære primere amplifisere i motsatt retning, og unnlate å definere og amplifisere et produkt. I tillegg vil komplementære primerpar binde til hverandre og konkurrere med målbindingen og derfor sterkt hemme målampifisering.

For å favorisere priming av mål DNA kontra priming til revers primer økte oppfinneren fremover 3' primerenden med to nukleotider som tilfeldigvis var GG (sterk priming). Tilsvarende ble 3' enden av den reverse primeren forlenget for å favorisere priming til målet kontra priming til den revers primeren.

Tilstedeværelsen av genetiske variasjoner og dets utnyttelse er nøkkelen til å utvikle en spesifikk test. Siden de publiserte sekvensene ikke ga hensiktsmessig informasjon om genetisk variasjon for *S. salar* og *S. trutta*, testet oppfinneren systematisk ut reverse primere ved å trinnvis øke med 1 nukleotid ved 3'ende. Dermed kunne oppfinneren utforske muligheten én etter én for SNP. Som grunnlag for testingen ble den reverse primeren valgt, da denne primeren forlenget i den ikke transkriberte sekvensen (NTS), hvor det er mer utsatt for variasjoner enn i den kodende sekvensen der fremover-sekvensen ble utvidet (Fig. 2 og 3). Etter denne modus operandi observerte oppfinneren at ved å utvide den reverse primeren i 3' ende med 3 nukleotider inn i NTS, produserte analysen markert spesifisitet med sterk *S. salar* amplifisering og meget svak *S. trutta* amplifisering (se fig. 4). Denne spesifisitet ble bevart når 5' enden ble forkortet eller forlenget og ved og holde det spesifikke 3' "ankeret" uforandret (Fig. 3). Den observerte rest amplifisering for *S. trutta* ble ytterligere eliminert ved å øke PCR stringens (høyere "annealing" temperatur, kortere amplifisering tid og to trinns i stedet for tre trinns PCR). Ved å bruke denne fremgangsmåten har oppfinneren utviklet en robust metode og løst problemet med å skille mellom laksearter, fortrinnsvis *Salmo salar* og *Salmo trutta* og deres hybrider, ved hjelp av den asymmetrisk PCR-metoden i henhold til den foreliggende oppfinnelsen, og ved bruk av nesten komplementære primere som målsøker 5S rDNA tandem direkte repetisjoner. Oppfinneren har ved hjelp av komplementære primere også overvunnet en teknisk fordom innen teknikkens stand (Referanse: [29, 30]), da det vist ved foreliggende oppfinnelse at komplementære primere kan anvendes som et verdifullt verktøy ved anvendelse av COMPAS-PCR-metoden i henhold til den foreliggende oppfinnelse.

Metoden er ikke begrenset til identifisering av fiskearter. Å bruke nesten fullt komplementære primere rettet mot samme sekvensen kan også være aktuelt for en hvilken som helst organisme med direkte repeterte tandem DNA motiver av interesse som målsekvenser. For eksempel finnes 5S r-DNA tandem direkte repetisjonene i hovedsak i alle eukaryote celler [31, 32], og kan

derfor ytterligere brukes til å utvikle konkrete komplementære - primer analyser for andre "taxon" og arter enn laksefisk. Videre vil metoden være nyttig for å utvikle analyser som bruker primere rettet mot forskjellige sekvenser, men som genererer primer - dimer grunnet delkomplementaritet.

5

En metode for identifisering av kjønn i laksefisk er tilveiebrakt av den foreliggende oppfinnelse ved å bruke en kjønns "duplex" qPCR på prøver fra laksefisk fortrinnsvis på *Salmo salar* og *Salmo trutta* og hybrider og primere beskrevet i Yano, A. et al [26].

10 Metoden til Yano, A. et al. [26] anvendte en vanlig PCR -metode og resultatet ble vist på en gel. Metoden ble utviklet og testet på regnbueørret, *oncorhynchus mykiss*. Det er imidlertid også behov for kjønnsdifferensiering for andre laksefiskearter som for *S. salar* og *S. trutta*, så vel som for utvikling av en raskere, enklere og mer pålitelig test.

Oppfinneren har med hell utviklet en metode for genetisk kjønnsbestemmelse av *Salmo*

15 *salar* og *Salmo trutta*.

Videre har oppfinneren forbedret metoden ved å anvende sanntid PCR med en smeltekurveanalyse ved hjelp av parametre mer stringente enn det som vanligvis benyttes (dvs. 0,2 °C trinn i stedet for 0,5 °C for smeltekurven). Fremgangsmåten ifølge den foreliggende oppfinnelsen gjør det mulig å vise og klart skille de to toppene (som indikerer to produkter, dvs. hankjønn- og hunkjønnprofiler, se figur 6). Når 0,5 °C intervaller brukes er det ikke mulig å se de to toppene, og kjønn kan ikke identifiseres direkte av qPCR. Fremgangsmåten ved Yano, A. et al. [26], benytter en "annealing" temperatur på 60 °C med en 3 trinns-amplifikasjonsprotokoll med varighet på totalt 90s (30 + 30 +30). "Annealing" temperaturen ifølge den foreliggende oppfinnelse kan være i området fra 60 °C til 65 °C, og kan være 62 °C, mer foretrukket 63 °C, mest foretrukket 64 °C, og amplifisering kan være en 2- trinns amplifisering protokoll som fortrinnsvis varer i 20s totalt (5 + 15). Tidsspenn på 10, 15, 25 og 30 sekunder kan også anvendes. Dette gjør det mulig å kjøre amplifiseringen og smeltekurven i omtrent 1 time og vil gi resultater uten å kreve noen ekstra arbeid dvs kjøre en gel.

30

Følgelig vil et første aspekt av foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte for asymmetrisk PCR som omfatter å:

- tilveiebringe en nukleinsyreprøve som anvendes som en måltemplat;
- identifisere måltemplatene(e)

35

- utføre en polymerase kjedereaksjon, ved å utnytte svært komplementære primere der enten fremover- eller revers primerkonsentrasjonen reduseres for å oppheve blokkeringen av PCR-reaksjonen ved først å fremme lineær amplifisering som gradvis vil skifte mot eksponensiell

amplifisering ved COMplementary-Primer-ASymmetric (COMPAS)-PCR;

- identifiserer den amplifiserte nukleotid-målsekvensen(er);

I en utførelsesform av dette nukleinsyre-målsekvens-aspektet kan omfatte direkte tandem repetisjoner. I ytterligere utførelsesformer kan den svært komplementære primeren ha en felles overlappende DNA-mål-sekvens eller det direkte tandemrepetisjonsmålet kan være i 5S-rDNA regionen. Andre regioner kan imidlertid også være et alternativ.

Som benyttet her refererer komplementære primere seg til primere som er komplementære med hverandre og vil under tidligere kjente betingelser binde seg til hverandre for å danne primer-dimer.

Et annet aspekt ved foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte for påvisning, identifisering eller overvåking av laksearter omfattende å:

- tilveiebringe en nukleinsyreprøve fra laksefisk til bruk som mål-templat(er);
- utføre en polymerase kjedereaksjon (PCR) COMplementary-Primer-ASymmetric (COMPAS)-PCR i følge oppfinnelsen, for å amplifisere en nukleinsyre-målsekvens i templat(en), ved å benytte et sett eller flere sett av svært komplementære primer-par i stand til å prime nevnte mål;
- identifisere den amplifiserte nukleotid-målsekvensen(er);
- bestemme arten.

Som benyttet her referer laksefisk ("salmonid") seg til en familie av strålefinnede-fisk («ray-finned fish»), som inkluderer laks, ørret, røye, hvite ferskvannsfisk og harr. Den atlantiske laksen og ørreten av slekten *Salmo* gir navn til familien og ordenen.

I en ytterligere utførelsesform kan bestemmelsen av arten utføres av en smeltekurveanalyse av PCR- produktet, eller ved hjelp av elektroforese-analyse. Andre metoder for bestemmelse av PCR-produktet kan også brukes.

I én eller flere utførelsesformer kan den fremre primeren forlenges i 3'-ende for å favorisere priming til målet og ikke til den reverse primeren, den reverse primeren kan forlenges i 3'-enden for å favorisere priming til målet og ikke til den fremre primeren. Den reverse eller den fremre primeren kan ha en SNP i sin 3' ende. Nevnte primer kan også gli ut til "høyre" i den 5S - rDNA kodede sekvens, ut av det komplementære området med den reverse primeren. Videre kan den reverse primeren forlenges i 5' ende. 3' fremover primer kan forlenges med 4, fortrinnsvis med 3, mer foretrukket med 2 nukleotider.

I en ytterligere utførelsesform er primerne i primerparet (ene) oligonukleotider som hver har en lengde på omtrent 12 til omtrent 30, fortrinnsvis omtrent 20 bp.

- 5 I en ytterligere utførelsesform kan det komplementære settet av primere som blir valgt fra et sett av primer par(ene), der den fremre primeren kan velges fra Tabell 1, eller en komplementær sekvens derav og den reverse primeren kan velges fra Tabell 2, eller en komplementær sekvens derav, eller en hvilken som helst kombinasjon derav.
- 10 Den revers primeren kan låses i sin 3' ende ved «+3» i den ikke-kodende sekvensen, ute av det komplementære fremre primer-området, på grunn av at spesifisiteten ligger i nøyaktig posisjonering av denne SNP. I den andre enden, i 5' ende, kan den reverse primeren være kortere eller lengre (avhengig av den fremre primeren).
- 15 I en utførelsesform av den foreliggende fremgangsmåten kan laksefisken være av arten *Salmo trutta*, *Salmo salar* og hybrider av disse. Fremgangsmåten kan imidlertid anvendes på andre laksefiske-arter, andre fiskearter eller en hvilken som helst organisme med tandem repeterte DNA motiver.
- 20 I et tredje aspekt av den foreliggende oppfinnelsen omfattes oligonukleotid-primere som kan velges fra oligonukleotidene i Tabell 1 eller 2, eller en hvilken som helst kombinasjon av disse, eller oligonukleotider med komplementære sekvenser eller funksjonelle tilsvarende sekvenser. Bruken av oligonukleotidene i et produkt, f.eks. et sett («kit») er ytterligere aspekter av den foreliggende oppfinnelse.
- 25 I et fjerde aspekt av den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringes en fremgangsmåte for å bestemme kjønn hos laksefisk som omfatter å:
 - tilveiebringe en nukleinsyreprøve fra laksefisk for å anvendes som (en) mål templat(er);
 - utføre en to-trinns tosidig sanntid polymerase kjedereaksjon (qPCR), for å amplifisere en
- 30 nukleinsyre målsekvens av templat(en), ved å benytte et sett eller flere sett av primerpar valgt fra Tabell 3,
 - identifisere den amplifiserte nukleotid-målsekvensen(e);
 - bestemme kjønn ved en smeltekurveanalyse av PCR-produktet.
- 35 I en ytterligere utførelsesform av dette aspektet kan trinnene på smeltekurveanalyse være i område på 0,1 °C til 0,6 °C, og kan være 0,4 °C, fortrinnsvis 0,3 °C, mer foretrukket 0,2 °C.

En ytterligere utførelsesform kan "annealing" temperaturen være i området fra 60 °C til 65 °C og

kan være 62 °C, mer foretrukket 63 °C, mest foretrukket 64 °C. Den to-trinns amplifisering kan vare i 30 sek., fortrinnsvis 25 sek., mer foretrukket 20 sek.

I et femte aspekt omfatter den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for påvisning og identifisering av laksearter og/eller kjønn, som omfatter fremgangsmåten ifølge den foreliggende oppfinnelsen og "High Resolution Melt analysis", der primersettene kan velges fra Tabellene 1, 2 og/eller 3, eller komplementære sekvenser derav, i en hvilken som helst kombinasjon.

I en sjette aspekt av den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringes et sett for påvisning og identifisering av laksearter som omfatter en samling av oligonukleotid-primere valgt fra Tabell 1 og 2, i en hvilken som helst kombinasjon, eller komplementære sekvenser derav i stand til å detektere laksearter ved hvilken som helst av fremgangsmåtene ifølge foreliggende oppfinnelse.

I et syvende aspekt ved den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringes et sett for påvisning og identifisering av laksearter og/eller kjønn som omfatter en samling av primere valgt fra Tabell 1, 2 og/eller 3, i en hvilken som helst kombinasjon, eller komplementære sekvenser derav, i stand til å detektere laksearter og/eller kjønn ved hvilken som helst av fremgangsmåtene ifølge foreliggende oppfinnelse.

I videre aspekter omfatter foreliggende oppfinnelse bruk av fremgangsmåtene ifølge foreliggende oppfinnelse, eller oligonukleotid-primere ifølge foreliggende oppfinnelse eller bruk av settene tilveibrakt i følge foreliggende oppfinnelse.

Den foreliggende oppfinnelsen er nå fullstendig beskrevet i detalj ved hjelp av illustrasjoner og eksempel med det formål å skape forståelse, det vil være åpenbart for en fagmann at oppfinnelsen kan utføres ved å modifisere eller endre oppfinnelsen ved hjelp av et bredt og ekvivalent spekter av tilstander og andre parametere, og at slike modifikasjoner eller endringer er ment å omfattes av omfanget av de vedlagte kravene.

EKSEMPLER

Eksempel 1

COMPAS – PCR

Biter av finner ble samlet inn fra *S. trutta* og *S. salar* individer for analyse.

Prøvene ble oppbevart i 98 % EtOH før DNA-ekstraksjon ble utført ved hjelp av mekaniske eller

kjemiske metoder for å frigi DNA for PCR. Etterfølgende DNA måling ble utført ved hjelp av et Nanodrop instrument (Thermo Scientific) og alle prøvene ble fortynnet i vann for å oppnå en sluttkonsentrasjon på 4 ng / μ l. Prøver (2.5 μ l) ble amplifisert i 25 μ l endelige reaksjonsblandinger ved bruk av en ABI 7500 qPCR maskin (Life technologies, Applied Biosystems). Blandingen inneholdt 12,5 μ l MESA Blue qPCR MasterMix (Eurogentec), 0,6 μ M revers primer 5SNTS-23R+3, fremover primer 5SNTS-23F konsentrasjon ble suksessivt testet med: 0.6, 0.4, 0.2, 0.1 og 0.05 μ M, reaksjonen ble utført med destillert vann, med et sluttvolum på 25 μ l. Tre-trinns PCR-betingelsene besto av 5 min aktivering ved 95 °C etterfulgt av 30 sykluser til 95 °C i 20 s, 62 °C i 30 s og 72 °C i 60 sek. Sanntidsamplifiserings-kurvene er vist i Fig1.

Eksempel 2

Identifisering av arter

Biter av finner ble samlet inn fra fire *S. trutta* og fire *S. salar* individer for analyse.

Prøvene ble oppbevart i 98 % EtOH før DNA-ekstraksjon ble utført ved hjelp av mekaniske eller kjemiske metoder for å frigi DNA for PCR. Etterfølgende DNA måling ble utført ved hjelp av en Nanodrop instrumentet (Thermo Scientific) og alle prøvene ble fortynnet i vann for å oppnå en sluttkonsentrasjon på 4 ng/ μ l. Prøver (2,5 μ l) ble amplifisert i 25 μ l endelige reaksjonsblandinger ved bruk av en ABI 7500 qPCR maskin (Life technologies, Applied Biosystems). Blandingen inneholdt 12,5 μ l MESA Blue qPCR MasterMix (Eurogentec), 0.01 μ M fremover primer 5SNTS-23F, 0.6 μ M revers primer 5SNTS-23R+3 ferdigstilt med destillert vann. Den to-trinns PCR betingelsene besto av 5 min aktivering ved 95 °C etterfulgt av 30 sykluser av 95 °C i 20 sek og 72 °C i 30 sek. Produktene ble visualisert på 1.2 % agarose gel (Fermentas) farget med SybrGreen (Se Figur 8).

Eksempel 3

Identifisering av kjønn

S. salar fiskeprøver ble samlet inn og behandlet med DNA-ekstraksjon og

måling som beskrevet i Eksempel 1. DNA-prøver (2.5 μ l) ble amplifisert i 12.5 μ l sluttreaksjonsblandinger ved hjelp av en CFX - 96 qPCR maskin (Bio - Rad, Hercules , CA, USA). Blandingen inneholdt 7.5 μ l SsoFast EvaGreen Supermix (Bio - Rad, Hercules , CA , USA) , 0.2 μ M fremover primer sdYF , 0,2 μ M revers primer sdYR2 , 0.05 μ M fremover primer 18SF og 0,05 μ M revers primer 18SR ferdigstilt med destillert vann. Den to-trinns tosidige PCR betingelsene besto av 2 min aktivering ved 98 °C etterfulgt av 40 sykluser med 98 °C i 5 sek og 65 °C i 15 sek. Smeltekurveanalysen utført etter amplifisering ble gjennomført ved å øke temperaturen trinnvis med 0.2 °C fra 65 °C

til 95 °C. Amplifisering kurver og smeltetopp resultatene er vist i Figur 5 og 6.

Eksempel 4

Identifisering av arter og kjønn

5

S. salar fiskeprøver ble samlet inn og behandlet med DNA-ekstraksjon og måling som beskrevet i Eksempel 1. DNA-prøver (2.5 µl) ble amplifisert som beskrevet i Eksempel 2, ved å benytte primere som er beskrevet i Eksempel 1 og 2, i alt 3 primerpar. Triplex PCR amplifiserte produkter ble videre analysert ved smelteanalyse som beskrevet i Eksempel 2, ved hjelp av

10 "High Resolution Melt analysis", eller alternativt ved gel elektroforese.

REFERANSER

1. Mullis, K., et al., *Specific Enzymatic Amplification of DNA In vitro - the Polymerase Chain-Reaction*. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 1986. **51**: p. 263-273.
2. Newton, C.R., et al., *Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS)*. Nucleic Acids Res, 1989. **17**(7): p. 2503-16.
3. Bottema, C.D. and S.S. Sommer, *PCR amplification of specific alleles: rapid detection of known mutations and polymorphisms*. Mutat Res, 1993. **288**(1): p. 93-102.
4. Sommer, S.S., et al., *A novel method for detecting point mutations or polymorphisms and its application to population screening for carriers of phenylketonuria*. Mayo Clin Proc, 1989. **64**(11): p. 1361-72.
5. Liu, Q., et al., *Overlapping PCR for Bidirectional PCR Amplification of Specific Alleles: A Rapid One-Tube Method for Simultaneously Differentiating Homozygotes and Heterozygotes*. Genome Research, 1997. **7**(4): p. 389-398.
6. Cha, R.S., et al., *Mismatch amplification mutation assay (MAMA): application to the c-H-ras gene*. PCR Methods Appl, 1992. **2**(1): p. 14-20.
7. Glaab, W.E. and T.R. Skopek, *A novel assay for allelic discrimination that combines the fluorogenic 5' nuclease polymerase chain reaction (TaqMan) and mismatch amplification mutation assay*. Mutat Res, 1999. **430**(1): p. 1-12.
8. Birdsell, D.N., et al., *Melt analysis of mismatch amplification mutation assays (Melt-MAMA): a functional study of a cost-effective SNP genotyping assay in bacterial models*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e32866.
9. Urke, H., et al., *Seawater tolerance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., brown trout, *Salmo trutta* L., and *S. salar* × *S. trutta* hybrids smolt*. Fish Physiology and Biochemistry, 2010. **36**(4): p. 845-853.

10. Carrera, E., et al., *Identification of smoked Atlantic salmon (Salmo salar) and rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) using PCR-restriction fragment length polymorphism of the p53 gene*. Journal of Aoac International, 2000. **83**(2): p. 341-346.
11. Kusser, W.C., R.L. Parker, and X.L. Miao, *Polymerase Chain-Reaction and DNA₃₀ Sequence of Rainbow-Trout Tumor-Suppressor Gene-P53 Exon-5, Exon-6 and Exon-7 to Exon-9*. Aquatic Living Resources, 1994. **7**(1): p. 11-16.
12. Dalvin, S., et al., *Forensic identification of severely degraded Atlantic salmon (Salmo salar) and rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) tissues*. Investigative Genetics, 2010. **1**(1): p. 12.
- 10 13.³⁵ Rasmussen, R.S., M.T. Morrissey, and J. Walsh, *Application of a PCR-RFLP Method to Identify Salmon Species in US Commercial Products*. Journal of Aquatic Food Product Technology, 2010. **19**(1): p. 3-15.
- Pendas, A.M., et al., *Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5S rDNA*. Cytogenetic and Genome Research, 1994. **67**(1):
- 15 p. 31-36.
15. Komiya, H., et al., *Determination of nucleotide sequence of 5S ribosomal RNA from rainbow trout liver by high performance liquid chromatography*. Nucl. Acids Res., 1978. **1**(suppl_2): p. s467-472.
16. Pendas, A.M., et al., *APPLICATIONS OF 5S-RDNA IN ATLANTIC SALMON, BROWN TROUT, AND IN ATLANTIC SALMON X BROWN TROUT HYBRID IDENTIFICATION*. Molecular Ecology, 1995. **4**(2): p. 275-276.
- 20 17.¹⁰ Brunelli, J.P. and G.H. Thorgaard, *A new Y-chromosome-specific marker for Pacific salmon*. Transactions of the American Fisheries Society, 2004. **133**(5): p. 1247-1253.
18. Brunelli, J.P., et al., *Y-specific sequences and polymorphisms in rainbow trout and Chinook salmon*. Genome, 2008. **51**(9): p. 739-748.
- 25 19. Devlin, R.H., *SEQUENCE OF SOCKEYE-SALMON TYPE-1 AND TYPE-2 GROWTH₁₅ HORMONE GENES AND THE RELATIONSHIP OF RAINBOW-TROUT WITH ATLANTIC AND PACIFIC SALMON*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1993. **50**(8): p. 1738-1748.
- 30 20. Devlin, R.H., et al., *Variation of Y-chromosome DNA markers in Chinook salmon (Oncorhynchus tshawytscha) populations*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic
- 20 Sciences, 2005. **62**(6): p. 1386-1399.
21. Du, S.J., R.H. Devlin, and C.L. Hew, *GENOMIC STRUCTURE OF GROWTHHORMONE GENES IN CHINOOK SALMON (ONCORHYNCHUS-TSHAWYTSCHA) - PRESENCE OF 2 FUNCTIONAL GENES, GH-I AND GH-II, AND A MALE-SPECIFIC*
- 35

PSEUDOGENE, GH-PSI. DNA and Cell Biology, 1993. **12**(8): p. 739-751.

22.²⁵ Li, J., et al., *Identification of the Sex Chromosomes of Brown Trout (Salmo trutta) and Their Comparison with the Corresponding Chromosomes in Atlantic Salmon (Salmo salar) and Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss)*. Cytogenetic and Genome Research, 2011. **133**(1): p. 25-33.

23. Veldhoen, N., et al., *Gene expression profiling and environmental contaminant assessment of migrating Pacific salmon in the Fraser River watershed of British Columbia*. Aquatic Toxicology, 2010. **97**(3): p. 212-225.

24. Devlin, R.H., C.A. Biagi, and D.E. Smailus, *Genetic mapping of Y-chromosomal DNA markers in Pacific salmon*. Genetica, 2001. **111**(1-3): p. 43-58.

25. Devlin, R.H., et al., *A rapid PCR-based test for Y-chromosomal DNA allows simple production of all-female strains of chinook salmon*. Aquaculture, 1994. **128**(3-4): p. 211-220.

Yano, A., et al., *An Immune-Related Gene Evolved into the Master Sex-Determining Gene in Rainbow Trout, Oncorhynchus mykiss*. Current Biology, 2012. **22**(15): p. 1423-1428.

27. Wangh, L.J., et al., *LATE PCR*, WIPO, Editor. 2003, BRANDEIS UNIVERSITY (415 South Street Waltham, MA, 02454-9110, US); Wangh, Lawrence J. (20 Duffield Road Auburndale, MA, 02466, US); Pierce, Kenneth (52 Walnut Street Natick, MA, 01760, US); Hartshorn, Cristina (1560 Great Plain Avenue Needham, MA, 02492, US); Rice, John (268 Common Street Quincy, MA, 02169, US); Sanchez, Aquiles J. (14 Foster Drive Framingham, MA, 01701, US).

28.¹⁰ Sanchez, J.A., et al., *Linear-After-The-Exponential (LATE)-PCR: An advanced method of asymmetric PCR and its uses in quantitative real-time analysis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(7): p. 1933-1938.

29. Dieffenbach, C.W., T.M.J. Lowe, and G.S. Dveksler, *General Concepts for Pcr Primer Design*. Pcr-Methods and Applications, 1993. **3**(3): p. S30-S37.

30. Degen, H.J., et al., *PCR Applications Manual*. 3d ed. 2006: Roche Diagnostics. 337.

31. Barciszewska, M.Z., et al., *Structure and functions of 5S rRNA*. Acta Biochimica Polonica, 2001. **48**(1): p. 191-198.

32. Richard, G.-F., A. Kerrest, and B. Dujon, *Comparative Genomics and Molecular Dynamics of DNA Repeats in Eukaryotes*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2008. **72**(4): p. 686-727.