

10012
10010
10005

Utvikling av metode for påvisning av *Lepeophtheirus salmonis* nauplier (lakseluslarver) i vannprøver med bruk av real-time PCR (qPCR)

Bacheloroppgave i Bioteknologi

Veileder: Ann-Kristin Tveten

Mai 2021

Kandidatnummer:

10012

10010

10005

**Utvikling av metode for påvisning av
Lepeophtheirus salmonis nauplier
(lakseluslarver) i vannprøver med bruk
av real-time PCR (qPCR)**

Bacheloroppgave i Bioteknologi

Veileder: Ann-Kristin Tveten

Mai 2021

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet

Fakultet for naturvitenskap

Institutt for biologiske fag Ålesund



Kunnskap for en bedre verden

Forord

Denne bacheloroppgaven er skrevet og utført av tre studenter ved NTNU Ålesund. Det er en oppgave som markerer slutten på tre minnerike år og vi vil takke alle lærere og medstudenter som har bidratt til oppgaven og det gode miljøet gjennom disse årene. Oppgaven har vært meget lærerik, interessant og vil kunne gi et bidrag til videre utvikling av norsk fiskerinæring som i dag (2021) er Norges nest største eksportnæring (1).

Oppgaven har til tider blitt påvirket av koronapandemien. Med gjentatte nedstengninger og gjenåpninger har hverdagen vært svært usikker til tider, både med tanke på selve utførelsen av forsøkene, men også hvordan planlegging og samarbeid har foregått underveis. Vi som gruppe måtte tenke annerledes, være fleksible og være forberedt på utfordringer relatert til pandemien som blant annet innebar begrenset fysisk oppmøte.

NTNU Ålesund har på en god måte lagt til rette for oss gjennom blant annet økonomisk støtte, tilgjengeliggjøring av laboratorier, utstyr og instrumenter, dyktig faglig veiledning og ikke minst tatt vare på vår sikkerhet under pandemien. Vi vil spesielt takke vår veileder Ann-Kristin Tveten som gjennom sin solide kunnskap har gitt verdifulle innspill gjennom hele oppgaven til tross for en hektisk hverdag. Hun har besvart spørsmål, gitt gode råd og tilbakemeldinger, og ikke minst stått på for at vi skal kunne få tilgang til laboratoriet så lenge som mulig.

Alle som har bidratt fortjener en stor takk fra oss etter seks semestre avsluttet med denne betydningsfulle oppgaven. Den har gitt oss solid kunnskap og verdifull erfaring som vi kan ta med oss videre, hvor enn veien går herfra.

Sammendrag

Oppgaven var å utvikle en ny qPCR-metode for deteksjon av lakseluslarver i vannprøver som inneholder plankton. Det ble designet egne primere til spesifikke målgen for lakseluslarven. Dette ble oppnådd ved hjelp av RefSeq-databasen og «Primer-BLAST»-verktøyet til NCBI før laboratorieforskningene startet. Det ble bestilt inn totalt fire primerpar der målet var å finne den beste kandidaten blant disse. I tillegg var primerpar 2 lokalisert innenfor primerpar 1 for å åpne muligheten for nested PCR.

Det ble utført flere optimaliseringer av oppsettet. Templat-DNA-volum ble testet med volumer på 1, 2 og 3 µL. Volum på 2 µL viste seg å være det mest stabile alternativet og viste best smeltepunktsskurve. Det var planlagt å kjøre en temperaturoptimalisering, men da volumoptimaliseringen ble kjørt med 58 °C og resultatene ble gode, ble det besluttet å ikke gjøre flere temperaturoptimaliseringer. Basert på resultatene, ble primerpar 1 og 4 fjernet som aktuelle kandidater da ingen av disse ga tilstrekkelige resultater. Muligheten for nested PCR var ikke lenger til stede, da både primerpar 1 og 2 ville vært nødvendig for denne typen analyse.

Det ble utført optimalisering av konsentrasjon med primerpar 2 og 3. Det ble konkludert at 500 nM var det mest optimale for både forward og reverse primer for primerpar 2. For primerpar 3 var 500 nM forward og 600 nM reverse mest optimalt. Etter primeroptimalisering ble det satt opp en standardkurve og deteksjonsgrensen ble bestemt. Dette konkluderte med at primerpar 2 fikk deteksjonsgrense rundt $5 \cdot 10^{-5}$ µg/µL, med slope-verdi på 3,9180, effektivitet på 80 % og R^2 -verdi på 0,98. Primerpar 3 fikk deteksjonsgrense rundt $5 \cdot 10^{-5}$ µg/µL, med slope-verdi på 3,8817, effektivitet på 81 % og R^2 -verdi på 0,9954.

I denne oppgaven ble det benyttet et Qubit-fluorometer for å måle konsentrasjon av DNA i prøvene som en ekstra kvalitetskontroll. Det ble utført DNA-isolering av både *Lepeophtheirus salmonis* nauplier (lakseluslarver) og alger av artene *Isochrysis galbana* og *Tetraselmis subcordiformis*.

Det ble utført to forsøk med det optimaliserte og endelige oppsettet for å teste metoden. Det ble utført forsøk med både høy og lav konsentrasjon av alger. Basert på resultatene fra disse forsøkene kan det antas at de optimaliserte verdiene er gode nok til en vellykket påvisning av lakseluslarver i en vannprøve som inneholder plankton.

Abstract

The thesis's purpose was to develop a method to detect salmon lice larvae in a water sample containing plankton. Selected primers were designed for specific target genes in the salmon lice's genome. This was achieved using the RefSeq database and NCBI's "Primer-BLAST" tool before laboratorial experiments commenced. A total of four primer pairs were ordered with the goal of finding the best candidate among these. In addition, one of these primer pairs were located within another which was intended to allow for the use of nested PCR.

Multiple optimizations of the setup were performed. The template DNA was tested with volumes of 1, 2 and 3 μL . A volume of 2 μL proved to be the most stable alternative and showed the best melting curve. A temperature optimization was planned, but as the volume optimization was performed with a temperature of 58°C and the results were optimal, the decision was made to not perform any further temperature optimization. Based on these results, primer pairs 1 and 4 were removed as potential candidates, since none of these provided optimal results. The option to use nested PCR was also no longer present as it relied upon the usage of both primer pair 1 and 2.

An optimization of the concentrations for primer pairs 2 and 3 were performed. A concentration of 500 nM was concluded to be the most optimal for both the forward and reverse primer in primer pair 2. Meanwhile, 500 nM forward and 600 nM reverse were the most optimal concentrations for primer pair 3.

After the primer optimization, a standard curve was created and limit of detection was determined. This concluded that primer pair 2 had detection limit $5 \cdot 10^{-5} \mu\text{g}/\mu\text{L}$, slope value of 3.9180, efficiency of 80% and R^2 value of 0.98. Primer pair 3 had detection limit $5 \cdot 10^{-6} \mu\text{g}/\mu\text{L}$, slope value of 3.8817, efficiency of 81% and R^2 value of 0.9954.

In this thesis a Qubit fluorometer was used to measure the concentrations of DNA in the samples as a quality control. DNA isolation was performed on both *Lepeophtheirus salmonis* larvae and algae of the *Isochrysis galbana* and *Tetraselmis subcordiformis* species.

Two analyses were performed with the final optimized setup to test the assay. An analysis with a high concentration of algae and one with a low concentration of algae were performed. Based on the results of these analyses it can be assumed that the optimized values are good enough for a successful detection of salmon lice larvae in a water sample containing plankton.

Innholdsfortegnelse

Forord.....	1
Sammendrag.....	2
Abstract.....	3
Figurliste.....	6
Tabelliste.....	7
Ordliste og forkortelser.....	9
1. Innledning.....	10
1.1 Bakgrunn for valg av tema.....	10
1.2 Bakgrunn for problemstillingen.....	10
1.3 Problemstilling.....	11
2. Teori.....	12
2.1 <i>Lepeophtheirus salmonis</i> - Lakselus.....	12
2.2 Real-time PCR (qPCR).....	13
2.3 Fargestoff.....	16
2.3.1 SYBR Green.....	16
2.4 Primerdesign og optimalisering.....	17
2.4.1 Primerdesign.....	17
2.4.2 Metodeoptimalisering.....	18
2.4.3 Standardkurve og deteksjonsgrense.....	19
2.5 DNA-isolering og Qubit.....	20
3. Materialer og metoder.....	21
3.1 qPCR.....	21
3.1.1 Primerdesign.....	21
3.1.2 Metodeoptimalisering.....	22
3.1.3 Standardkurve og deteksjonsgrense.....	23
3.1.4 Analysere lakselusprøver.....	23
3.2 Prøvemateriale.....	23
3.2.1 Telling av lakseluslarver:.....	23
3.2.2 Telling av alger:.....	24
3.2.3 DNA-isolering.....	24
3.2.4 Qubit.....	24
4. Resultater.....	25
4.1 Primerdesign og optimalisering.....	25
4.1.1 Primerdesign.....	25
4.1.2 Optimalisering av templatvolum og annealingtemperatur.....	26

4.1.3 Optimalisering av primerkonsentrasjon.....	27
4.1.4 Standardkurve og deteksjonsgrense.....	29
4.2 Analyse av prøver.....	31
4.2.1 Analyse 1.....	31
4.2.2 Analyse 2.....	33
4.3 DNA-isolering og Qubit.....	35
5 Diskusjon.....	36
5.1 Primerdesign og optimalisering.....	36
5.1.1 Primerdesign.....	36
5.1.2 Metodeoptimalisering.....	37
5.1.3 Optimalisering av volum og annealingtemperatur	37
5.1.4 Optimalisering av primerkonsentrasjon.....	38
5.1.5 Standardkurve og deteksjonsgrense.....	39
5.2 Analyse av prøver.....	41
5.2.1 Analyse 1.....	42
5.2.2 Analyse 2.....	43
5.3 DNA-isolering og Qubit.....	43
5.4 Praktisk informasjon.....	45
5.5 Videre arbeid	46
6 Konklusjon	47
7. Litteraturliste	48
Vedlegg 1: Reagensliste	1
Vedlegg 2: Forsøkets forløp	2
Vedlegg 3: Primerdesign	3
Vedlegg 4: Resultater	6
Vedlegg 5: Prosedyre for telling av alger med mikroskop.....	15
Vedlegg 6: Prosedyre for DNA-isolering.....	20
Vedlegg 7: Prosedyre for DNA-konsentrasjonsmåling med Qubit.....	25
Vedlegg 8: Prosedyre for optimalisering av volum- og temperatur for qPCR.....	28
Vedlegg 9: Prosedyre for optimalisering av primerkonsentrasjon for qPCR.....	34
Vedlegg 10: Prosedyre for deteksjonsgrense og standardkurve med qPCR.....	40
Vedlegg 11: Teste ferdig optimalisert prosedyre for deteksjon av <i>Lepeophtheirus salmonis</i> nauplier (lakseluslarver) i vannprøver med bruk av real-time PCR (qPCR).....	46
Vedlegg 12: Prosedyre for deteksjon av <i>Lepeophtheirus salmonis</i> nauplier (lakseluslarver) i vannprøver med bruk av real-time PCR (qPCR).....	52

Figurliste

Figur 1: Oversikt over lakselusens åtte livsstadier ().	13
Figur 2: Oppsummering prinsippet bak qPCR. 1a viser innledende denaturering. 1b viser denaturering. 2 viser annealing. 3 viser elongering.	14
Figur 3: Oversikt over analysedata fra første qPCR-analyse. Optimalisering av templatvolum og annealingtemperatur.	26
Figur 4: Amplifikasjonsplott og smeltepunktsskurve for primerpar 2 med konsentrasjon 500 nM for både FWD- og RWD-primer.	27
Figur 5: Amplifikasjonsplott og smeltepunktsskurve for primerpar 3 med konsentrasjon 500 nM for FWD-primer og 600 nM for RWD-primer.	28
Figur 6: Amplifikasjonsplott og smeltepunktsskurve for fortynningsrekke med primerpar 2. Fargekoder: Rød: uforynnet prøve, Oransje: fortynning 1, Gul: Fortynning 2, Grønn: fortynning 3, Blå: fortynning 4 og Fiolet: fortynning 5.	29
Figur 7: Amplifikasjonsplott og smeltepunktsskurve for fortynningsrekke med primerpar 3. Fargekoder: Rød: uforynnet prøve, Oransje: fortynning 1, Gul: Fortynning 2, Grønn: fortynning 3, Blå: fortynning 4 og Fiolet: fortynning 5.	29
Figur 8: Amplifikasjonsplott og smeltepunktsskurve for analyse 1. Primerpar 2 er markert i rødt og primerpar 3 i blått.	32
Figur 9: Amplifikasjonsplott og smeltepunktsskurve for analyse 2. Primerpar 2 er rød, og primerpar 3 er blå.	34
Figur 10: oversikt over Bürker tellekammer. (5).	16
Figur 11: Plateoppsett for optimalisering av volum.	32
Figur 12: Plateoppsett for optimalisering av primerkonsentrasjon.	38
Figur 13: Plateoppsett for standardkurve.	44
Figur 14: Plateoppsett for test av optimalisert prosedyre.	50
Figur 15: Plateoppsett for ferdig prosedyre.	56

Tabelliste

Tabell 1: Oversikt over taksonomien til lakselus ().....	12
Tabell 2: Oversikt over avgrensningskriterier som ble endret fra standardverdiene i primer-BLAST søk. Verdiene i parentes er standardverdiene som primer-BLAST oppgir (37).....	22
Tabell 3: Oversikt over primerpar benyttet i forsøket.	25
Tabell 4: Oversikt over fortynningsnumre, fortynningsfaktorer, utregnede DNA-konsentrasjoner av lakselus og antall lakselus i fortynningsrekken. Utregningene er gjort med Qubit-resultatene hentet fra tabell 8 under avsnitt 4.3.	30
Tabell 5: Oversikt over antall lus og antall alger som ble tilsatt eppendorfrørene i analyse 1.....	31
Tabell 6: Oversikt over antall lus og antall alger som ble tilsatt eppendorfrørene i analyse 2.....	33
Tabell 7: Konsentrasjoner av DNA-prøver fra lakselus ved første DNA-isolasjon. I første runde av DNA-isolasjon ble det kjørt isolering i 3 ulike prøverør.....	35
Tabell 8: Konsentrasjoner av DNA og fortynninger fra standardkurve. Prøverør 1 og 2 fra første måling ble blandet sammen, og markert med 2.....	35
Tabell 9: Konsentrasjoner av DNA fra alger. I denne runden av DNA-isolasjon ble det kjørt isolering i 7 ulike prøverør.	35
Tabell 10: Oppsummering av optimaliserte parametere.....	47
Tabell 11: Oversikt over benyttede reagenser	1
Tabell 12: Oversikt over forsøksforløp	2
Tabell 13: Oversikt over målgener benyttet i forsøket, med designede primersekvenser.	3
Tabell 14: Oversikt over teoretiske parametere til ferdigdesignede primere.	4
Tabell 15: volum og temperaturoptimalisering	6
Tabell 16: Oversikt over optimalisering av primerkonsentrasjoner for primerpar 2.....	8
Tabell 17: Oversikt over optimalisering av primerkonsentrasjoner for primerpar 3.....	9
Tabell 18: Oversikt over standardkurve (P = Primerpar, F = Fortynning)	10
Tabell 19: Prøveoversikt over analyse 1, primerpar 2.....	11
Tabell 20: Prøveoversikt over analyse 1, primerpar 3.....	12
Tabell 21: Prøveoversikt over analyse 2, primerpar 2.....	13
Tabell 22: Prøveoversikt over analyse 2, primerpar 3.....	14
Tabell 23: Oversikt over reagenser og volumer til pipettering for volumoptimalisering.....	31
Tabell 24: Oversikt over analyseprogram for volumoptimalisering.....	32
Tabell 25: Oppskrift på fortynning av primere.....	36
Tabell 26: Oppskrift på mastermiks for primeroptimalisering	37
Tabell 27: Oversikt over reagenser og volumer til pipettering for primeroptimalisering	37
Tabell 28: Oversikt over analyseprogram for primeroptimalisering	37
Tabell 29: Oppskrift på mastermiks for standardkurve og deteksjonsgrense.....	43

Tabell 30: Oversikt over analyseprogram for standardkurve og deteksjonsgrense	44
Tabell 31: Oversikt over x antall lus og x antall alger som tilsettes i de ulike eppendorfrørene. Testing av optimalisert prosedyre.	49
Tabell 32: Oppskrift på mastermiks for test av optimalisert prosedyre.....	49
Tabell 33: Oversikt over analyseprogram for test av optimalisert prosedyre.....	50
Tabell 34: Oppskrift på mastermiks for ferdig prosedyre.	55
Tabell 35: Oversikt over analyseprogram for ferdig prosedyre.	56

Ordliste og forkortelser

Amplikon: DNA-segment mellom 2 primere. PCR-produktet som blir kopiert.

Amplifikasjon: Produksjon av flere templatkopier

DNA-isolering: Ekstrahering av DNA fra prøvemateriale. DNA-et skilles fra andre komponenter som også ekstraheres under lysering.

DNA-polymerase: Enzym som katalyserer DNA-syntese.

Eluering: Ekstraksjon av et materiale ved hjelp av vasking med et løsemiddel

Hybridiseringshastighet: Tiden det tar for primere å feste seg til DNA.

Lysering: Nedbrytning av cellemembran som fører til celledød

Mastermiks: Flere reagenser blandet sammen til en løsning for lettere pipettering.

Primer: Kort oligonukleotidsekvens som fester seg til en tilsvarende sekvens på enkelttrådet DNA

Primer-dimer: Primere som bindes til hverandre.

Self-annealing: Primer som bindes til seg selv.

Smeltetemperatur: Temperaturen som skal til for at dobbeltrådet DNA dissosierer til enkelttrådet DNA.

Templat: DNA-et som brukes som utgangspunkt for produksjon av kopisekvenser.

AE: Acid Elution buffer

AL: Acid Lysis buffer

ATL: Acid Tissue Lysis buffer

AW: Acid Wash buffer

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

Cq: Quantification cycle

dNTP: Deoksyribosenukleosidtrifosfat

dsDNA: Double Stranded Deoxyribonucleic Acid - Dobbelttrådet DNA

GC: Guanin-Cytosin basepar

mtDNA: Mitokondrielt DNA

NTC: No Template Control - Prøver som inneholder bare vann, uten DNA

qPCR: Quantitative Polymerase Chain Reaction

ssDNA: Single Stranded Deoxyribonucleic Acid - Enkelttrådet DNA

T_m: Smeltetemperatur

1. Innledning

1.1 Bakgrunn for valg av tema

I løpet av de tre årene fra studiet i bioteknologi har kunnskapen, viktigheten og variasjonen i laboratoriekursene gitt en erfaring som har tilegnet oss kunnskaper om ulike analyseteknikker og metoder. Et av forsøkene omhandlet DNA-isolering og analyse av DNA sekvenser ved bruk av Ion Torrent teknologi, en forholdsvis ny og spennende metode innenfor nestegenerasjonssekvensering (NGS). Vi ble også introdusert til real-time PCR (qPCR), som ga en god introduksjon til mulighetene DNA-analyse gir.

InnoSEA ved NTNU Ålesund er en forskningsgruppe som har fokus på akvatisk helse og velvære (2). InnoSEA kom med et ønske om en metode for deteksjon av lakseluslarver i fiskeoppdrettsnæringen. Fiskeoppdrettsnæringen har i lang tid slitt med lakselusproblematikk. Spesifikt har det å kunne påvise lakselus i tidlig stadium vært utfordrende. Med dagens tilgjengelige mikroskopmetode er det vanskelig å skille lakselus fra andre dyreplankton tidlig nok, noe som gir utfordringer med bekjempelse av problemet. For å skille artene fra hverandre er det nærliggende å bruke DNA-analyse og derfor er bruk av qPCR et naturlig teknikkvalg.

1.2 Bakgrunn for problemstillingen

Lakselusparasitten, *Lepeophtheirus salmonis*, er et stort problem for dagens oppdrettsnæring. Parasitten har utviklet seg til å bli et problem for villbestander, særlig i nærheten av områder med mye lakseoppdrett. Mengden oppdrettslaks er unaturlig stor i forhold til villaksbestanden. Med flere verter tilgjengelig har lakselus større muligheter til formering og overlevelse (3).

Den store spredningen av lakselus skyldes oppdrettsnæringen og derfor har Mattilsynet satt inn en maksimumsgrense for lakselus i oppdrettsanlegg. Fisken i oppdrettsanlegg må behandles mot lakselus, dersom den øvre grensen nås. Lakselus kan bekjempes med legemidler, kjemikalier eller mekaniske metoder. Metodene bekjemper voksne, utviklede lus som har festet seg på fisken og gjort skade. Det er ønskelig å stoppe spredningen av lakselusen mens de er frittlevende og i vannmassene allerede på naupliusstadiet (larvestadiet). Ved å skjerme fisken mot larvene ved hjelp av strømskjørt, begrenses spredningen til en viss grad (4).

Ved mikroskopering av en eventuell vannprøve er lakseluslarvens fysiske utseende svært lik andre krepsdyr, og det er vanskelig å skille de fra hverandre (5). Dette gjør at deteksjon av lakselus gjøres når den allerede har festet seg på fisken og gjort skade. Derfor er det ønskelig å utvikle en metode for deteksjon av lakselus på et så tidlig stadium som mulig i utviklingen, og på denne måten kunne begrense spredning før larvene blir fullvoksne.

1.3 Problemstilling

Hovedmålet med oppgaven er å etablere en real-time PCR (qPCR) metode for deteksjon av *Lepeophtheirus salmonis*.

Delmål:

- Primerdesign og metodeoptimalisering
- Utprøving av qPCR-assay for DNA-prøver ekstrahert fra *Lepeophtheirus salmonis* nauplier
- Utprøving av qPCR-assay med DNA ekstrahert fra en prøve bestående av både *Lepeophtheirus salmonis* og ulike konsentrasjoner av algene; *Isochrysis galbana* og *Tetraselmis subcordiformis*.

2. Teori

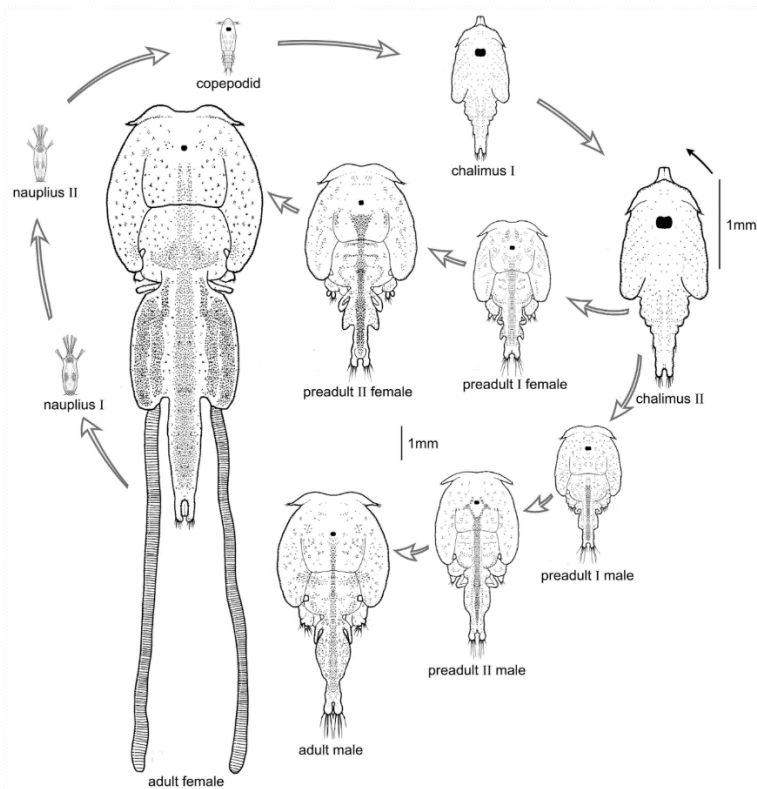
2.1 *Lepeophtheirus salmonis* - Lakselus

Lakselus er en marin parasitt som lever blant annet av slim, hud og blod på hovedsakelig laksefamilien. Lakselusen er et krepsdyr som har en livssyklus med åtte ulike stadier fra lakseluslarver til voksen lakselus (6).

Tabell 1: Oversikt over taksonomien til lakselus (7).

Vitenskapelig navn:	<i>Lepeophtheirus salmonis</i>
Taksonomi	Eukaryota, Metazoa, Ecdysozoa, Arthropoda, Crustacea, Multicrustacea, Hexanauplia, Copepoda, Siphonostomatoida, Caligidae; <i>Lepeophtheirus</i> .

Ved de to første stadiene i livssyklusen kalles de for «naupliuslarver», og disse har en størrelse på under 1 mm. Naupliuslarver er frittlevende til de eventuelt støter på en vert og fester seg. Her forekommer de seks siste stadiene i livssyklusen inkludert videre formering (6). Figur 1 viser en oversikt over livssyklusen. En voksen hunn kan gi opphav til mellom 150 og 400 lakseluslarver under optimale forhold. Denne reproduksjonen skjer hver tiende dag (8).



Figur 1: Oversikt over lakselusens åtte livsstadier (9).

Hvor lang tid livssyklusen tar, er avhengig av blant annet saltinnhold og temperatur i vannet. Lakselusen trives i kaldt vann ved temperaturer mellom 0 og 20 °C (10). Den optimale temperaturen for lakseluslarvene er nærmere 20 °C, ettersom utviklingen og levetiden er raskere ved disse temperaturene (6). I naupliusstadiet lever larvene fritt i vannet fra 2 til 14 dager, avhengig av temperatur. I løpet av denne tiden sprer larvene seg over store områder, ved hjelp av strømninger i vannet (11).

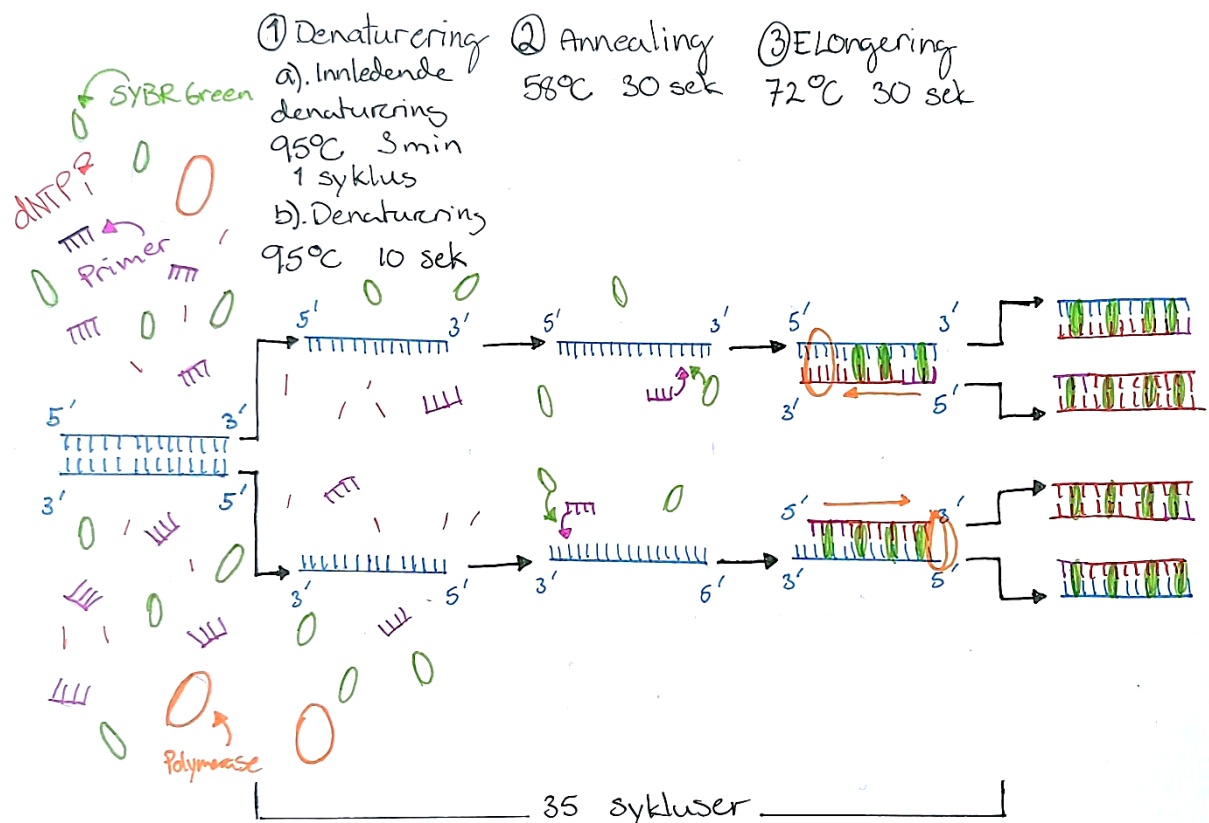
Lakseluslarvene befinner seg i et enormt nettverk av akvatiske organismer. Ettersom mangfoldet i vandige miljø er stort, er det naturlige likheter mellom lakseluslarvene og andre krepsdyr på larvestadium. På grunn av lakselusens fysiske utseende, blir det naturlig å identifisere larvene på genetisk nivå (5).

2.2 Real-time PCR (qPCR)

Definisjonen på Real-time PCR (qPCR) er den kontinuerlige samlingen av fluorescerende signal fra en eller flere polymerasekjedereaksjoner over en rekke sykluser (12). qPCR er blant annet benyttet for å amplifisere, detektere, karakterisere og kvantifisere nukleotider i flere prøver samtidig. qPCR baserer seg på samme utgangspunkt som tradisjonell PCR med en

tretrinnsyklus. Til forskjell fra tradisjonell PCR benytter qPCR seg av fluorescerende signaler til å samle inn data i sanntid. I stedet for at deteksjonen kun blir utført på sluttproduktet, gir qPCR mulighet for å detektere produktet etter hver syklus (13).

Det første steget i en qPCR-analyse er innledende denaturering (ref. figur 2 - 1a) av DNA-et. Den innledende denatureringen sørger for at alt DNA, også komplekse DNA-strukturer, separeres til enkelttrådet DNA (ssDNA). Etter den innledende denatureringen starter selve amplifiseringen. Dette er som regel en tretrinnsyklus som gjentas 30 til 40 ganger, hvor DNA-et, i teorien, dobles i mengde for hver syklus (ref. figur 2). Det første trinnet er denaturering (ref. figur 2 - 1b) hvor DNA-trådene separeres til ssDNA. Det neste trinnet i syklusen er annealing (ref. figur 2 - 2), hvor primerne bindes til komplementære sekvenser. Det siste trinnet i amplifiseringssyklusen er elongeringen (ref. figur 2 - 3) hvor det foregår syntese av nytt DNA. I dette trinnet vil polymerasen feste seg på DNA ved hjelp av primere (14).



Figur 2: Oppsummering prinsippet bak qPCR. 1a viser innledende denaturering. 1b viser denaturering. 2 viser annealing. 3 viser elongering.

Det er en rekke reaksjonskomponenter som trengs for at man skal kunne oppnå en optimal qPCR. Det trengs små mengder templat-DNA, som er det DNA-et som er ønskelig å analysere. Nukleotidene adenin, cytosin, guanin og tymin danner byggesteinene til nytt DNA, og er derfor viktig å tilsette. En viktig komponent i PCR-reaksjonen er termostabil DNA-polymerase. DNA-polymerasens oppgave er å katalysere dannelsen av dsDNA. For at DNA-polymerasen skal kunne binde seg til templatet krever den et festepunkt. Derfor tilsettes primere i reaksjonsmiksen. Primere er kjente DNA-sekvenser som initierer polymeriseringen. Det er to primere som hybridiserer på hver sin side av DNA, som definerer målgenet på DNA-templatet som skal amplifiseres. Til slutt er det viktig at reaksjonsblandingen har en buffer som stabiliserer reaksjonen. Ved innkjøp av slike buffere tilsettes Mg^{2+} ioner, Taq polymerase, dNTP og andre nødvendige komponenter i optimale forhold for analysen (14).

Ved selve polymerasereaksjonen er det fire faser som tydelig kommer fram på PCR-kurven. Dette er baselinjen, eksponentiell fase, lineær fase og platåfasen. Baselinjen inneholder amplifikasjon under deteksjonsgrensen til instrumentet. C_q-verdi er en verdi som beskriver når fluorescenssignalet passerer baselinjen. Når dette skjer vil det detekteres et signal som kan måles (15). Det er her den eksponentielle fasen starter med en maksimal eksponentiell amplifikasjon i kurven. Hvor lang den eksponentielle fasen er, avhenger av templatkonsentrasjon og kvaliteten på analysen. Den lineære fasen (platåfase) starter når effektiviteten til amplifiseringen i reaksjonen synker. Da vil stigningen til kurven bli flatere (12, s. 9-10).

Gjennom dette arbeidet har det blitt benyttet 3 ulike typer kontroller. NTC, positiv kontroll og negativ kontroll. NTC er en prøve som ikke inneholder DNA. Er det DNA-forurensninger eller bakgrunnsstøy kan dette avsløres ved hjelp av NTC. Positive kontroller inneholder DNA fra ønsket art, og benyttes for å sikre at qPCR-analysen har fungert som den skal. De benyttes også for å bestemme om det har forekommet falske negative resultater og for å sikre at primere har festet seg til målgenene. Har positive kontroller negative verdier må forsøket gjentas. Negativ kontroll sikrer at det egendesignede primerparet fungerer på ønsket gen og art. Derfor inneholder denne prøven DNA, men ikke fra ønsket art. Er negative resultater positive, bør forsøket gjentas for å undersøke forurensning. Skjer det samme igjen, kan det vurderes å designe nye primere (16).

2.3 Fargestoff

Ved hjelp av fargestoff kan informasjon fra syklusene hentes mens qPCR-instrumentet analyserer prøvene. Ved hver syklus vil de fluorescerende signalene måles. Disse signalene vil øke og synke i forhold til innholdet av dsDNA i reaksjonen (13). qPCR-analyser har to dominerende teknikker; SYBR Green og TaqMan-prober. I forhold til TaqMan-prober er SYBR Green mye mer kostnadseffektivt, samt enklere å bruke. Den viktigste forskjellen mellom de to metodene er at i en probebasert qPCR vil det detekteres flere ulike målgen samtidig i hver prøve, noe SYBR Green ikke har egenskaper til. I tillegg vil SYBR Green binde seg uspesifikt til alt dsDNA i prøvene (17).

I tillegg til SYBR Green benyttes et referansefargestoff som sørger for at signalene fra hver brønn overvåkes og korrigerer for eventuelle deteksjonsforskjeller fra brønn til brønn i instrumentet. Referansefargen kan også brukes til å normalisere «kanteffekt» som kan oppstå ved brønnene på de ytterste radene og på denne måten normalisere forskjellene mellom ytter- og inner-brønnene. Den mest brukte referansefargen er ROX (6-carboxy-X-rhodamine) (12, s. 11-12).

2.3.1 SYBR Green

En interkalator er et molekyl som har lignende struktur som et basepar. På denne måten kan molekylet feste seg mellom DNA-dobbeltspiralen (18). Når interkalatoren fester seg til DNA vil det emitteres fluorescerende signaler. Ved å øke temperaturen gradvis vil DNA-et dissosiere og de to DNA-trådene vil løsne fra hverandre. Samtidig som dissosieringen skjer, vil det DNA-bindende fargestoffet løsne. Som et resultat vil det fluorescerende signalet synke. Dette gir muligheter til å kunne observere mengden av DNA som påvirkes av fluorescenssignalet. (12, s. 146).

SYBR Green er en interkalator med fluorescerende egenskaper som kan benyttes i qPCR-analyser. Når SYBR Green binder seg til dsDNA vil det emitteres et fluorescenssignal. I de første amplifiseringssyklusene vil ikke fluorescenssignalet til SYBR Green være sterkt nok til å kunne bli registrert. Under den eksponentielle fasen vil fluorescensen i teorien dobles for hver syklus, før signalet når et høydepunkt ved slutten av amplifiseringen (12, s. 139).

Smeltepunktsskurve brukes blant annet til å sjekke om produktet er amplifisert og om primer-dimere interfererer med reaksjonen (12, s. 146). Smeltepunktsskurve dannes ved å varme opp PCR-produktet mot slutten av PCR-reaksjonen. Temperaturen økes gradvis samtidig som instrumentet måler mengden av fluorescens. Oppvarmingen fører til at PCR-produktet smelter, dsDNA går over til ssDNA, og SYBR-Green løsnes fra DNA-et. Dette fører til at fluorescensen synker og det dannes en smeltepunktsskurve (19). Smeltepunktet til sekvensene er også avhengig av lengden. Kortere DNA-sekvenser har lavere smeltepunkt (T_m) enn lengre sekvenser. På den andre siden vil lengre DNA-produkter ha høyere dissosieringstemperatur (20).

2.4 Primerdesign og optimalisering

2.4.1 Primerdesign

Et av de viktigste trinnene i et PCR-forsøk er design av primere, som bestemmer templat-DNA-et. Denne delen av forsøksprosessen er avgjørende for at resten av prosessen skal lykkes. Det er flere ulike faktorer som er viktig å ta hensyn til når primer skal designes. For å oppnå en amplifisering av riktig målgen, er det viktig at primere designes spesifikt for ønsket DNA. (12, s. 140-142). Det ble brukt mitokondrielt DNA (mtDNA) som utgangspunkt. mtDNA er DNA som befinner seg utenfor cellekjernen, og tilhører mitokondriet. Dette er en kritisk organelle for nesten alle eukaryote celler, men organelen finnes ikke i prokaryote celler. mtDNA-et til lakselus er på 15 445 basepar og inneholder genene som ble brukt til utgangspunkt i primerdesign i denne oppgaven (21).

Når målgen og DNA er bestemt er det viktig at de to ulike primerne i et primerpar ikke er komplementære. (12, s. 140-142). Er primeren for kort vil amplifikasjonsproduktet bli for uspesifikt og annealingtemperaturen kan bli vanskelig å optimalisere. Er primeren for lang vil hybridiseringshastigheten være lavere, som senker forsøkets effektivitet. Lengre primere gir også høyere risiko for dannelse av sekundærstrukturer, primer-dimere og self annealing (22). Derfor er optimal lengde på en primer mellom 18 og 24 nukleotider (12, s. 131). DNA-strukturer med utpreget sekundærstruktur bør unngås slik at begge primerne har lik bindingstid (12, s. 140-142).

I tillegg til primerens lengde, må PCR-amplikonstørrelsen selekteres. For qPCR varierer optimal amplikonstørrelse etter kilde og produsent. Agilent Technologies har anbefalt 70-200 basepar som gunstig produktlengde, mens «Real-Time PCR» av M. Tevfik Dorak anbefaler en produktlengde på 100-250 basepar (23, s. 21, 12, s. 131). Ved design av lengre primere, må syklusene justeres med lengre elongering (24). For korte PCR-produkter kan gi vanskeligheter i å skille mellom PCR-produkt og primer-dimere. Dette er fordi de korte produktene inneholder høyere C_q-verdier, grunnet senere amplifisering (25, s. 25).

Den kjemiske bindingen mellom nukleotidene G og C danner tre hydrogenbindinger, mens A og T danner bare to hydrogenbindinger. Dette gjør at GC danner en mer stabil binding og det er derfor ønskelig med GC-innhold mellom 40% og 60 % (12, s. 131). For lavt innhold av GC-nukleotider i primeren fører til mangelfull primerbinding, som gir redusert PCR-effektivitet. Ved for høyt GC-innhold kan det dannes stabile sekundærstrukturer og self annealing. Det fører også til høye annealingtemperaturer (22).

Nested PCR er en modifisering av PCR som benytter seg av to primersett og to etterfølgende runder av PCR-reaksjoner. Nested PCR benyttes for å forbedre både sensitivitet og spesifisitet av PCR. Ved bruk av denne metoden er det viktig å designe en primer som ligger innenfor sekvensen til den andre (26).

2.4.2 Metodeoptimalisering

Annealingtemperaturen er ønskelig å optimalisere, og ligger som regel i et område rundt 50-60 °C (12, s. 131). Det er ofte nødvendig å finjustere denne temperaturen for å få optimale resultater. Da kan det for eksempel gjøres optimaliseringsforsøk på temperaturer som 57, 58, 59 og 60 °C. En for høy annealingtemperatur kan resultere i en lite effektiv annealing, mens en for lav annealingtemperatur kan resultere i at primere binder seg til andre områder enn målgenet. Annealingtemperaturen til primerne i et par bør være så lik som mulig, slik at begge primere bindes til templat-DNA og danner et fullstendig PCR-produkt (22).

I tillegg til temperaturen, er det ofte nødvendig å optimalisere volum. Det er to forskjellige volum som bør tas i betraktning ved bruk av qPCR. Det ene er totalt reaksjonsvolum og det andre er volumet til hver enkelt reagens. Det totale reaksjonsvolumet står spesifisert i brukermanualen utgitt av produsenten av instrumentet. Dette kan derimot justeres basert på forsøket natur eller kontekst så lenge det er innenfor maskinens kapasitet (27). Primere

justeres ved å fortynne til ønsket konsentrasjon og volumet vil derfor ikke være nødvendig å endre. Volumet til templat-DNA justeres etter konsentrasjon, hvor lavere konsentrasjoner krever større volum. RNase-fritt vann tilsettes med utgangspunkt i templat-DNA-ets volum for å oppnå gunstig totalt reaksjonsvolum (12, s. 209).

Det er viktig å optimalisere konsentrasjonen av primeren som brukes. Dette kommer av at ulike primere presterer forskjellig ved ulike konsentrasjoner. Primerkonsentrasjon bør ikke være for høy, da dette kan hemme effektiviteten til reaksjonen. Konsentrasjonen kan heller ikke være for lav, da dette fører til ineffektiv og sen amplifisering (28).

For å finne den optimale primerkonsentrasjonen tilsettes ulike mengder primere i reaksjonen. I de ulike reaksjonene er det kun primerkonsentrasjonene som varierer, mens andre parametere, som volum av DNA, skal være likt. Denne analysen gjør det mulig å sammenligne hvordan de ulike konsentrasjonene påvirker Cq-verdien. Ved optimalisering av primerkonsentrasjon ønskes det en så lav Cq-verdi som mulig, da dette indikerer vellykket amplifisering ved en tidlig start (29).

2.4.3 Standardkurve og deteksjonsgrense

Et av de mest brukte verktøyene for å observere effektiviteten og reproduserbarheten til et qPCR-assay kalles en standardkurve. En standardkurve produseres ved å sette opp en fortynningsrekke. Det er vanlig å sette opp en fortynningsrekke basert på 5-foldige fortynninger. Ved lav konsentrasjon er det gunstig å sette opp en fortynningsrekke med mindre drastiske fortynninger (30 s. 3).

Det er vanligvis to verdier som observeres ved bruk av standardkurve: R^2 -verdi og slope-verdi. R^2 -verdien indikerer hvor lineært assayet er i hele måleområdet og hvordan de forskjellige datapunktene er posisjonert i forhold til hverandre. En ideell R^2 -verdi vil være fullstendig korrelert. Ved fullstendig korrelasjon vil R^2 -verdien være 1, men i qPCR er det akseptabelt med en R^2 -verdi ned til 0,985. Er datapunkter disproporsjonalt plassert i forhold til hverandre kan det være nødvendig å feilsøke dette. Slope-verdien viser hvor effektiv amplifikasjonen til assayet er. Det er ideelt med en slope-verdi så nærme -3,32 som mulig, da dette tyder på dobbelt så mange kopier av målsekvensen for hver syklus. -3,32 tilsvarer en effektivitet på 100 %. Anbefalte grenser ligger mellom -3,1 og -3,6, der disse tilsvarer mellom

90 og 110% effektivitet. Dersom slope-verdien er for lav antyder dette at reaksjonen blir inhibert. Om slope-verdien er mye høyere enn -3,32 kan dette vise til feil i forsøket som degradering av fargestoff, primer-dimere, dårlige primere osv (31 s. 26).

Deteksjonsgrense, også kjent som LoD (Limit of detection) er definert som det punktet der PCR-assayet ikke lenger kan produsere positive resultater med et 95% konfidensintervall. Den teoretiske mest sensitive deteksjonsgrensen, med ingen forstyrrelser, vil være på tre kopier av målgenet (32 s. 21). Det er viktig å ta i betraktning at det alltid vil være en forskjell mellom praktisk og teoretisk applikasjon (33 s. 612).

2.5 DNA-isolering og Qubit

For at det skal kjøres PCR, må DNA-et som befinner seg i cellene være tilgjengelig og renset. Det blir benyttet et DNA-isoleringskit som består av en lysering, rensing og eluering. DNA-et blir gjort tilgjengelig ved at cellemembranen og komponenter i cellene brytes ned i lyseringen ved bruk av ulike lyseringsbuffer. Videre vil dette gå gjennom en grundig vasking med ulike vaskebuffer. Til slutt elueres DNA-et ut av membranen med en elueringsbuffer, som også brukes til lagring av DNA-et (34).

Et Qubit-fluorometer detekterer fluorescerende fargestoff som er spesifikt bundet til molekyler. Fargestoffene emitteres bare dersom de er bundet til disse molekylene, selv under lave konsentrasjoner. Quant-iT dsDNA Assay er et valg på fluorometeret som er spesifikt for dobbeltrådet DNA, og gir både selektivitet og muligheter for kvantifisering av DNA. I tillegg til å kvantifisere mengden DNA, kan det også benyttes som en kvalitativ metode for påvisning om DNA er til stede i en prøve eller ikke (35).

3. Materialer og metoder

3.1 qPCR

«The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments» publisert i «Clinical Chemistry» gir den nødvendige informasjonen for å kunne gjennomføre et qPCR-eksperiment med sikker relevans, nøyaktighet, korrekt tolking og repeterbarhet. MIQE Guidelines er retningslinjene som følges gjennom denne oppgaven. Det blir tilpasset til de kritiske punktene som er relevante for en kvalitativ qPCR-metode med SYBR Green (33).

3.1.1 Primerdesign

DNA-sekvensene benyttet som målgener ble hentet fra NCBI sin database med søkeordet «*Lepeophtheirus salmonis*» sortert etter mitokondrielt DNA (36). Det ble valgt tre gener og sekvensene til hver av genene ble deretter brukt i «Primer-BLAST» (37). Ved bruk av primer-BLAST ble avgrensningene i tabell 2 benyttet. Resterende parametere ble ikke endret, og standardverdiene ble benyttet.

For å kryssjekke primerne ble det benyttet «Nucleotide BLAST», hvor primernes sekvenser søkes opp mot DNA i databasene GenBank, EMBL (European Molecular Biology Laboratory), DDBJ (DNA Data Bank of Japan), PDB (Protein Data Bank) og RefSeq (The Reference Sequence database) (38). Primere ble beholdt dersom de kun ga utslag for ønsket art ved de 100 første treffene, som i dette tilfellet var *L. salmonis*.

Tabell 2: Oversikt over avgrensingskriterier som ble endret fra standardverdiene i primer-BLAST søk. Verdiene i parentes er standardverdiene som primer-BLAST oppgir (37).

Avgrensingskriterium	Verdi benyttet
PCR product size	Minimum: 100 baser – (70) Maximum: 250 baser – (1000)
Of primers to return	10 primerpar (40 ved nested)
Primer melting temperatures (T_m)	Minimum: 57°C – (57) Optimum: 58°C – (60) Maximum: 60 °C – (63)
Max T_m difference:	2 – (3)
Database	Custom: Her settes sekvensen som skal analyseres inn på nytt.
Organism	<i>Lepeophtheirus salmonis</i>
Primer Size	Minimum: 16 – (15) Optimum: 20 – (20) Maximum: 25 – (28)
Primer GC content (%)	Minimum: 40 % – (20%) Maximum: 60 % – (80%)

3.1.2 Metodeoptimalisering

De designede primerne ble først volum- og temperaturoptimalisert etter prosedyren i vedlegg 8. Platene ble pipettert med ulike volum av DNA og det ble tilsatt blant annet Invitrogen Custom primere (*Invitrogen™, USA*) og PerfeCTa SYBR Green SuperMix ROX (*Quantabio™, USA*). Platene ble så analysert på G8830A AriaMX Real-Time PCR System (*Agilent Technologies™, USA, SN. MY15345078*), der annealingtemperaturen ble satt til 58 °C.

Det ble utført optimalisering av primere i henhold til vedlegg 9. Plateoppsettet i vedlegg 9 ble fulgt ved pipettering. Platen med ulikt innhold i brønnene ble så analysert opp mot hverandre ved hjelp av AriaMX Real-Time PCR System.

3.1.3 Standardkurve og deteksjonsgrense

Etter optimaliseringen, ble det utført en tifolds fortynningsrekke med lakselusprøver og RNase-fritt vann. Det ble, til forskjell fra tidligere analyseringer, laget mastermikser med SYBR Green SuperMix ROX, primere og RNase-fritt vann. Fortynningsrekken ble pipettert i henhold til plateoppsettet i vedlegg 10 og analysert.

3.1.4 Analysere lakselusprøver

Det ble gjort qPCR-analyser med ulike konsentrasjoner av lakseluslarve-DNA og alge-DNA. Det ble brukt optimaliserte verdier fra de tre tidligere optimaliseringene. Det ble laget mastermikser for hvert primerpar. Mastermiksen av SYBR Green, primerpar og RNase-fritt vann ble pipettert i henholdt til plateoppsettet i vedlegg 11. Det ble så pipettert over DNA, før det ble målt og analysert av AriaMX Real-Time PCR System.

3.2 Prøvemateriale

Det ble høstet inn lakselus med eggstrenger fra oppdrettsanlegg, som ble klekket på laboratoriet og fryst inn. Algene ble dyrket i laboratoriet av en annen bachelorgruppe. Det ble brukt to ulike arter alger, *Isochrysis galbana* (*I. galbana*) og *Tetraselmis subcordiformis* (*T. subcordiformis*). *I. galbana* er en brungul alge som lever naturlig i havet. *T. Subcordiformis* er en grønn alge som også har habitat i havet. *T. Subcordiformis* sto på risting, mens *I. galbana* sto uten risting. Begge hadde tilførsel av oksygen, sto i romtemperatur med aluminiumsfolie og det var konstant lys til stede. Det ble laget tre løsninger av algene: En med *I. galbana*, en med *T. Subcordiformis* og en miks av begge algene.

3.2.1 Telling av lakseluslarver:

Lakseluslarvene ble først tinet i én time før telling. Lakseluslarvene ble pipettert ut med automatpipette fra petriskål over i spotplate, etter tining, og telt. Det ble brukt RNase-fritt vann til å pipettere opp lakseluslarvene over i eppendorfrør klare for DNA-isolering. Lakseluslarvene ble benyttet både som prøvemateriale og positiv kontroll.

3.2.2 Telling av alger:

Algene ble hentet ut og overført til erlenmeyerkolber med to for hver prøve som følgende: *I. galbana*, *T. Subcordiformis* og en blanding med 5 mL *I. galbana* og 5 mL *T. Subcordiformis*. Det ble tilsatt noen dråper Lugol's jodløsning (*BDH*™, *England*) i en av parallellene til de ulike kolbene. Det ble benyttet automatpipette til å overføre hver av algekulturene i hvert sitt C-chip Bürker tellekammer (*NanoEntek*™, *Sør-Korea*). Algene ble telt under mikroskop etter prosedyren i vedlegg 5. Algeprøvene ble til slutt pipettert over i eppendorfrør klare for DNA-isolering.

3.2.3 DNA-isolering

Det ble benyttet DNeasy Blood and Tissue (*Qiagen*™, *Tyskland*). Prosedyren for DNA-isolering ble fulgt i henhold til vedlegg 6. Det ble tilsatt ATL-buffer og proteinkinase K til prøvene og de ble satt til inkubering i 1,5 time ved 56 °C til lysing. Eppendorfrørene ble mikset på Lab Dancer S040 for å vortexe og gi mekanisk belastning under lysingen. Etter lysingen ble AL-buffer tilsatt og prøvene ble satt på ny inkubering i ti minutter ved 56 °C. 96 % etanol ble tilsatt og miksen ble sentrifugert gjennom en DNeasy Mini Spin Column. Deretter ble det tilsatt AW1- og AW2-buffer i ulike omganger. Det ble sentrifugert ved ulike hastigheter og ulike varigheter. Samlerørene ble kastet etter hver sentrifugering, og et nytt samlerør ble benyttet for hver runde. Til slutt ble det pipettert to omganger med AE-buffer for eluering av DNA. Etter ferdig DNA-isolering ble produktene fryst ned ved -20 °C.

3.2.4 Qubit

Det ble benyttet Qubit kit (*Invitrogen*™, *USA*) og prosedyren i vedlegg 7 ble fulgt. Først ble *Invitrogen*™ Qubit Fluorometer kalibrert. Etter kalibreringen ble DNA-prøvene målt ved å tilsette 2 µL prøve til 198 µL working solution i qubitrør. Rørene ble vortexet og plassert i Qubit-fluorometeret og analysert.

4. Resultater

4.1 Primerdesign og optimalisering

4.1.1 Primerdesign

Søkemotoren til NCBI resulterte i 12 bekreftede gener innenfor arten *L. salmonis*. Følgende tre gener ble valgt: Cytochrome b, cytochrome c oxidase subunit I og ATP synthase F0 subunit 6. Primer-BLAST resulterte i 4 primerpar listet i tabell 3. Primerpar 1 og 2 har samme målgen og ble designet med mulighet for å kjøre nested PCR.

Tabell 3: Oversikt over primerpar benyttet i forsøket.

Gennavn	Gen ID	Sekvens (5`->3`)	Antall nukleotider	Cat. nr/ID nr
Primerpar 1				
Cytochrome c oxidase subunit I	3523614	Forward: TTCGGGAGTTTTTCACTCCG	20	10336-022 Y5860D06
		Reverse: ATTGGCATTGCCCCACTAA	20	10336-022 Y5860D07
Primerpar 2				
Cytochrome c oxidase subunit I	3523614	Forward: GGGCTTCAGTAGATTTGCG	19	10336-022 Y5860D08
		Reverse: CTAAAAGTCCCAAGCACCGT	20	10336-022 Y5860D09
Primerpar 3				
Cytochrome b	3523617	Forward: CCGCATGATATGGTCTACGG	20	10336-022 Y5860D10
		Reverse: GGGTGGAACCTTGGGTCTTT	20	10336-022 Y5860D11
Primerpar 4				
ATP synthase F0 subunit 6	3523613	Forward: TAGTGAAGGGGCAGGGTTTA	20	10336-022 Y5860D12
		Reverse: CACACAGATGTGCCTACTCC	20	10336-022 Y5860D13

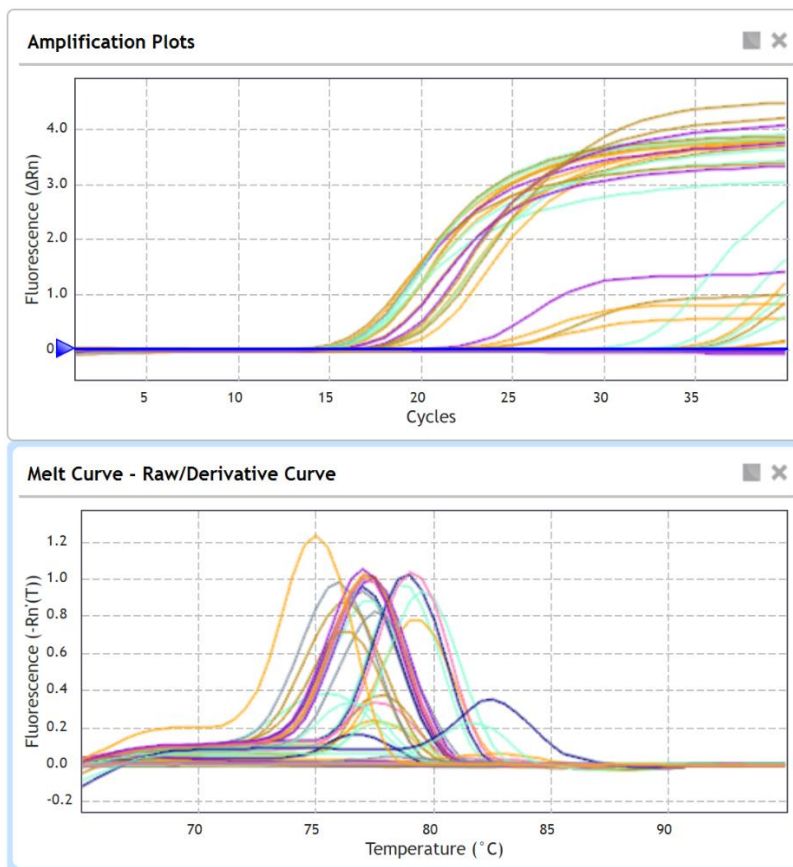
4.1.2 Optimalisering av templatvolum og annealingtemperatur

Temperaturen ble satt til 58 °C.

Templatvolum 1 µL viste uregelmessige amplifikasjonsplott og smeltepunktsskurver, samt høye C_q-verdier. Volum 2 µL og 3 µL viste begge mer regelmessige amplifikasjonsplott. T_m-verdiene var jevne blant alle prøvene, utenom volum 3 µL som hadde høyere verdier enn både volum 1 og 2 µL. Volum 2 µL hadde de laveste T_m-verdiene og de beste smeltepunktsskurvene (ref. Vedlegg 4 tabell 15).

Primerpar 2 og 3 resulterte i best amplifikasjonsplott samt smeltepunktsskurver ved valgt templatvolum, med lave C_q-verdier for begge. Primerpar 4 ga for store avvik, med høye C_q- og T_m-verdier. Primerpar 1 fikk, i motsetning til primerpar 4, manglende C_q-verdier med høye T_m-verdier på de få prøvene som fikk C_q-resultater (ref. Vedlegg 4 tabell 15).

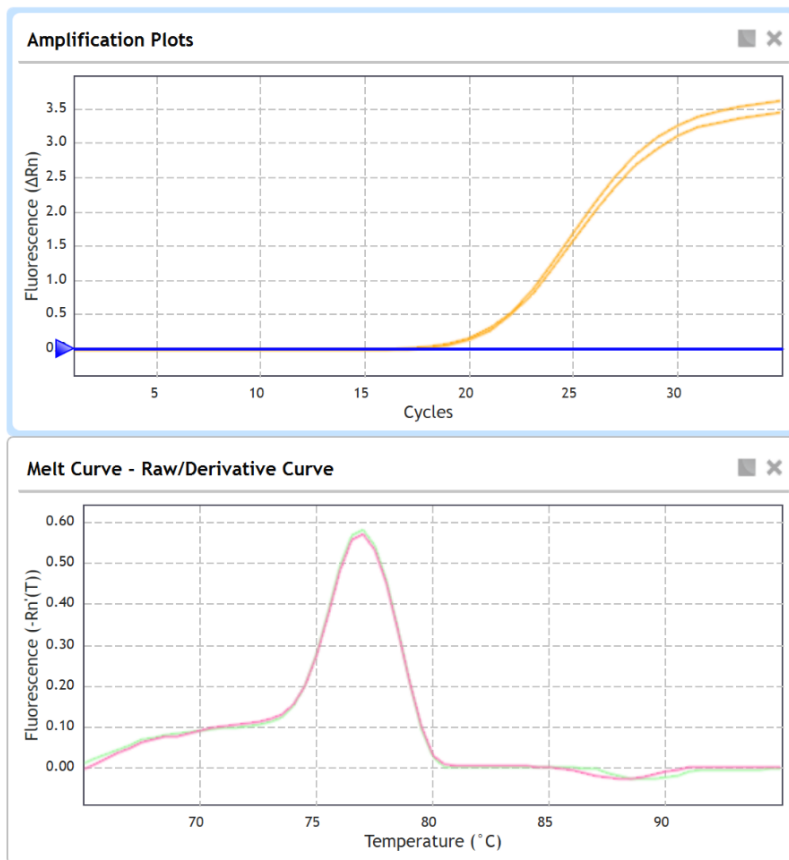
2 av 24 NTC fikk C_q-verdier, mens resterende fikk negative resultater (ref. Vedlegg 4 tabell 15). Figur 2 viser analysedata fra denne optimaliseringen.



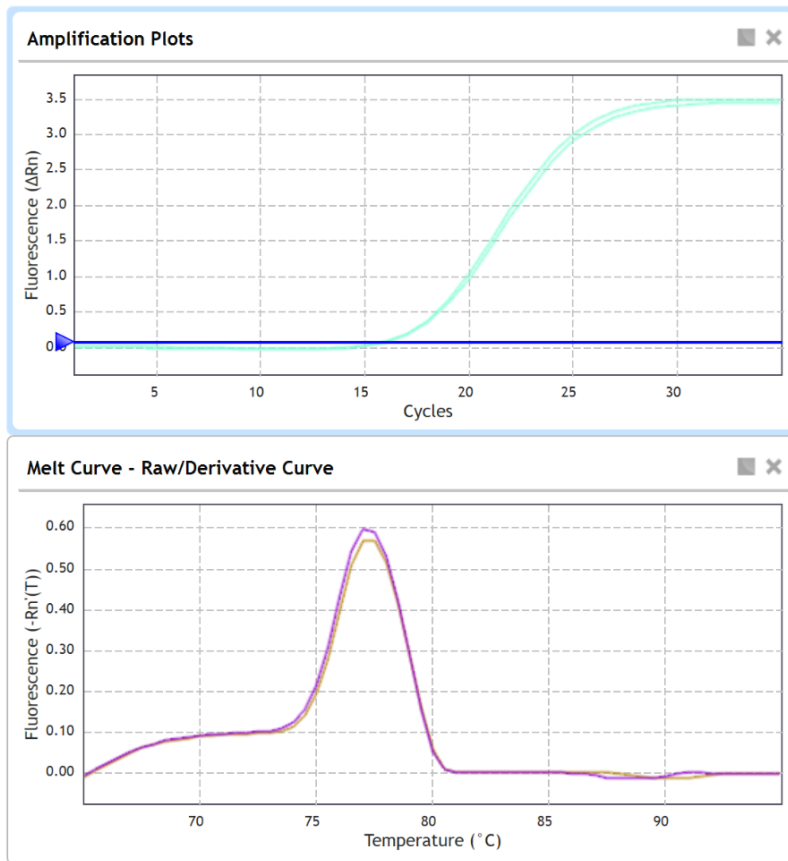
Figur 3: Oversikt over analysedata fra første qPCR-analyse. Optimalisering av templatvolum og annealingtemperatur

4.1.3 Optimalisering av primerkonsentrasjon

For primerpar 2 ble det vurdert at konsentrasjonen for både FWD og RWD var optimal ved 500 nM. Både amplifikasjonsplottet og smeltepunktsskurven er korresponderende, og C_q-verdiene er lave (ref. Vedlegg 4 tabell 16). Begge parallellene med valgt konsentrasjon er framstilt i figur 3 og 4. For primerpar 3 ble det vurdert at konsentrasjonen for FWD var optimal ved 500 nM og RWD var optimal ved 600 nM. Både amplifikasjonsplottet og smeltepunktsskurven er korresponderende, med lave C_q-verdier (ref. Vedlegg 4 tabell 17). T_m-verdien for både primerpar 2 og 3 var jevne ved 77 °C . Alle 16 NTC ble negative.



Figur 4: Amplifikasjonsplott og smeltepunktsskurve for primerpar 2 med konsentrasjon 500 nM for både FWD- og RWD-primer.

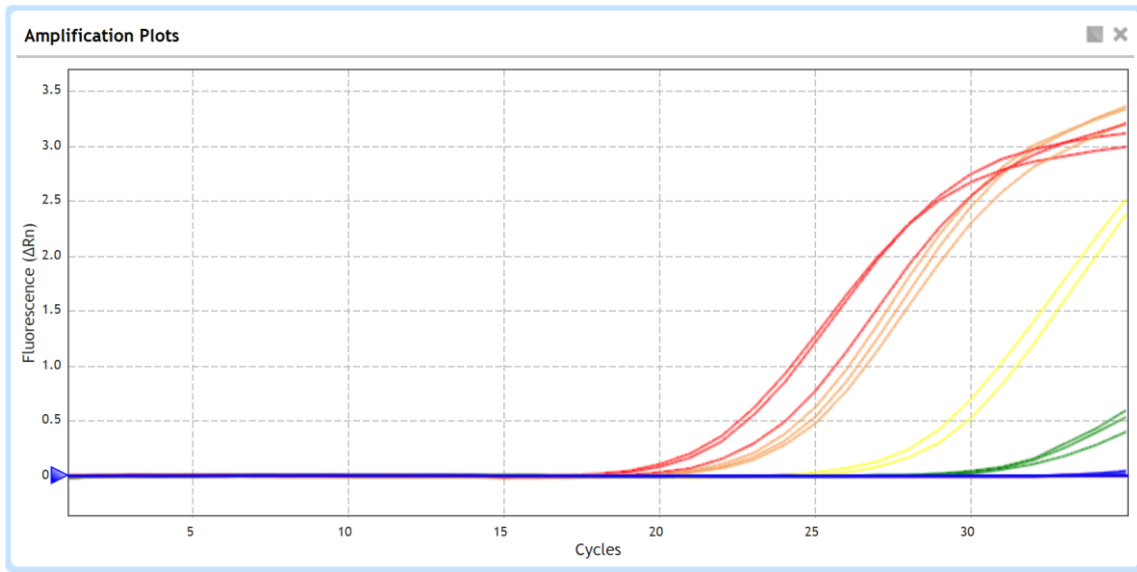


Figur 5: Amplifikasjonsplott og smeltepunktsskurve for primerpar 3 med konsentrasjon 500 nM for FWD-primer og 600 nM for RWD-primer.

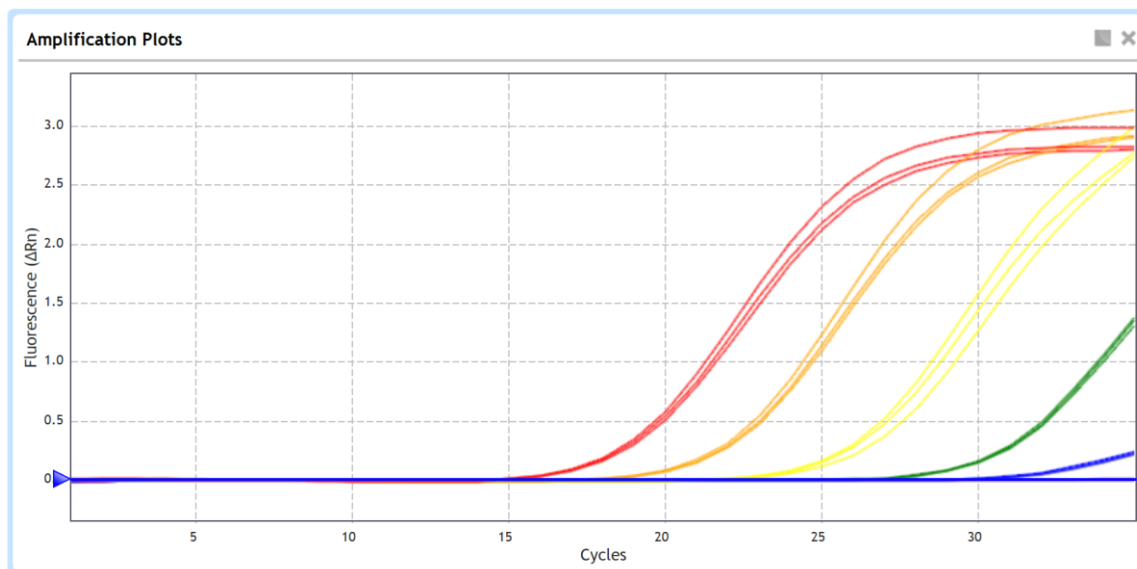
4.1.4 Standardkurve og deteksjonsgrense

Standardkurven til primerpar 2 fikk en slope-verdi på -3,9180, en R^2 -verdi på 0,9800.

Effektiviteten til qPCR-analysen regnes i til henhold til formel 3 i vedlegg 10 og resulterte i 80,00%. Standardkurven til primerpar 3 fikk en slopeverdi på -3,8817, en R^2 -verdi på 0,9954. Effektiviteten ble regnet ut til 81,00%. Figur 5 og 6 viser resultatene etter fortynningsrekkene for de ulike primerparene.



Figur 6: Amplifikasjonsplott og smeltepunktsskurve for fortynningsrekke med primerpar 2. Fargekoder: Rød: ufortynnet prøve, Oransje: fortynning 1, Gul: Fortynning 2, Grønn: fortynning 3, Blå: fortynning 4 og Fiolett: fortynning 5.



Figur 7: Amplifikasjonsplott og smeltepunktsskurve for fortynningsrekke med primerpar 3. Fargekoder: Rød: ufortynnet prøve, Oransje: fortynning 1, Gul: Fortynning 2, Grønn: fortynning 3, Blå: fortynning 4 og Fiolett: fortynning 5.

Tabell 4 viser en oversikt over fortynningsrekken med fem fortynninger og ufortynnet prøve. Kun fortynning 5 hadde negative Cq-verdier. Fortynning 1 til 4 resulterte i stigende Cq-verdier, med høyest verdi for fortynning 4 (ref. Vedlegg 4 tabell 18).

Tabell 4: Oversikt over fortynningsnumre, fortynningsfaktorer, utregnede DNA-konsentrasjoner av lakselus og antall lakselus i fortynningsrekken. Utrekningene er gjort med Qubit-resultatene hentet fra tabell 8 under avsnitt 4.3.

Fortynning nr.	Fortynningsfaktor	Konsentrasjon av lakselus-DNA	Antall lakselus
Ufortynnet (Qubit resultater)	10^0	$5,01 * 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$	40 lakselus /400 μL
1	10^{-1}	$5,01 * 10^{-4} \mu\text{g}/\mu\text{L}$	1 lakselus/100 μL
2	10^{-2}	$5,01 * 10^{-5} \mu\text{g}/\mu\text{L}$	0,1 lakselus/100 μL
3	10^{-3}	$5,01 * 10^{-6} \mu\text{g}/\mu\text{L}$	0,01 lakselus/100 μL
4	10^{-4}	$5,01 * 10^{-7} \mu\text{g}/\mu\text{L}$	0,001 lakselus/100 μL
5	10^{-5}	$5,01 * 10^{-8} \mu\text{g}/\mu\text{L}$	0,0001 lakselus/100 μL

4.2 Analyse av prøver

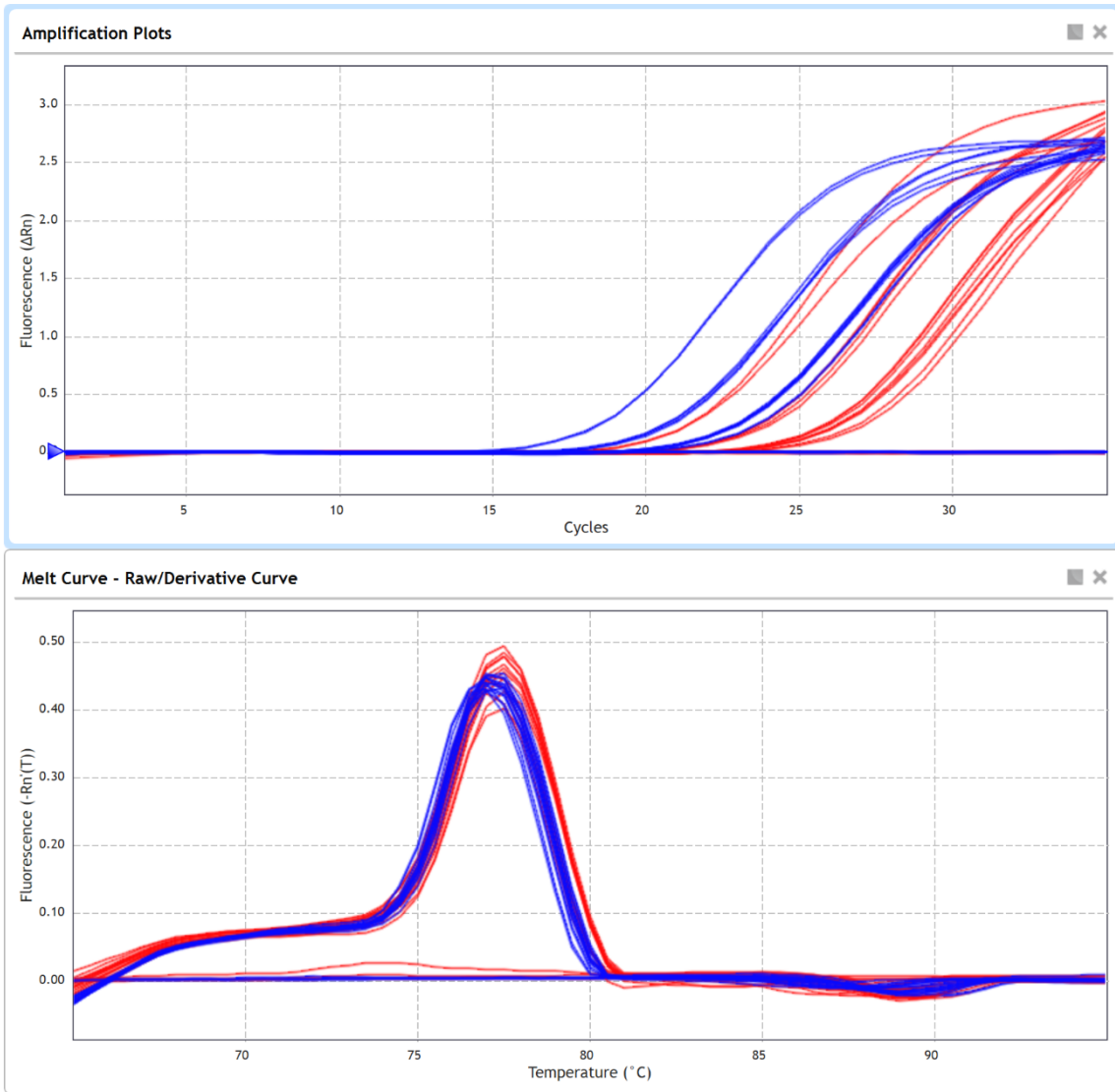
4.2.1 Analyse 1

Tabell 5 viser en oversikt over prøveinnholdet i analyse 1.

Tabell 5: Oversikt over antall lus og antall alger som ble tilsatt eppendorfrørene i analyse 1.

Eppendorfrør nr.	Antall lus	Algeart	Antall alger	Volum alger tilsatt
1	2	<i>T. Subcordiformis</i>	1 107 000	0,9 mL
2	10	<i>T. Subcordiformis</i>	1 107 000	0,9 mL
3	2	<i>I. galbana</i> <i>T. Subcordiformis</i>	1 111 600	0,14 mL
4	10	<i>I. galbana</i>	11 003 200	0,52 mL
5	2	<i>I. galbana</i>	11 003 200	0,52 mL
6	2	<i>I. galbana</i> <i>T. Subcordiformis</i>	11 116 000	1,4 mL
7 (negativ kontroll)	0	<i>I. galbana</i> <i>T. Subcordiformis</i>	11 116 000	1,4 mL

Figur 7 viser amplifikasjonsplott og smeltepunktsskurver for primerpar 2 (rød) og 3 (blå). Ut ifra figuren er smeltepunktsskurvene samsvarende og amplifikasjonsplottene jevnt gode til begge primerparene (spesielt primerpar 3). Alle prøver har fått positive resultater, negativ kontroll har ingen positive resultater, positiv kontroll har ingen negative resultater og alle NTC er blanke. C_q-verdiene var lave, og T_m-verdiene var jevne (ref. Vedlegg 4 tabell 19 og 20).



Figur 8: Amplifikasjonsplott og smeltepunktskurve for analyse 1. Primerpar 2 er markert i rødt og primerpar 3 i blått.

4.2.2 Analyse 2

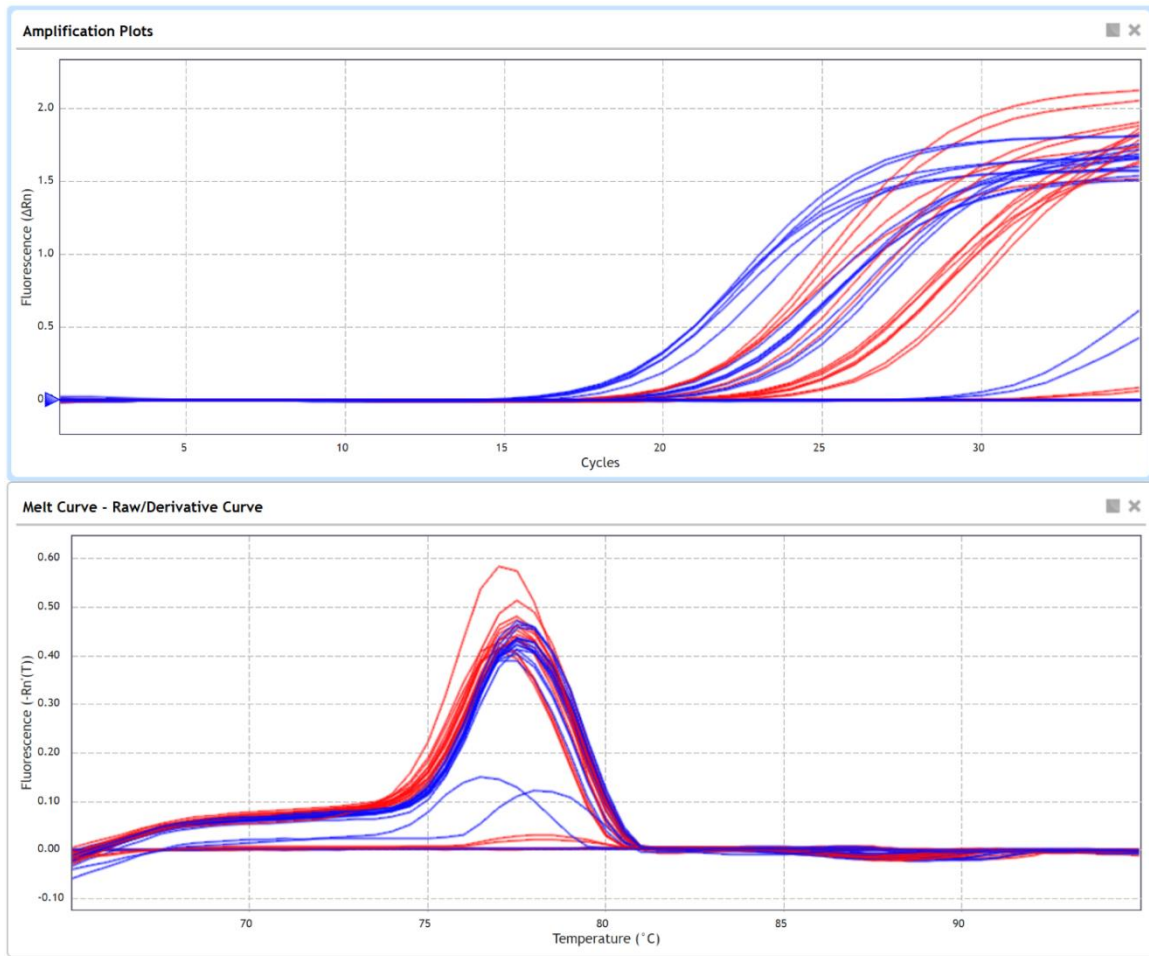
I tabell 6 er en oversikt over prøveinnholdet i analyse 2.

Tabell 6: Oversikt over antall lus og antall alger som ble tilsatt eppendorfrørene i analyse 2.

Eppendorfrør nr.	Antall lus	Algetype	Antall alger	Volum alger tilsatt
1	2	<i>T. Subcordiformis</i>	10 000	13,5 µL
2	10	<i>T. Subcordiformis</i>	10 000	13,5 µL
3	2	<i>I. galbana</i> <i>T. Subcordiformis</i>	200 000	19,8 µL
4	10	<i>I. galbana</i>	200 000	19,8 µL
5	2	<i>I. galbana</i>	100 000	20,6 µL
6	2	<i>I. galbana</i> <i>T. Subcordiformis</i>	100 000	20,6 µL
7 (negativ kontroll)	0	<i>I. galbana</i> <i>T. Subcordiformis</i>	100 000	20,6 µL

Det ble observert noe høyere spredning ved analyse 2 enn ved analyse 1 (ref. figur 8).

Smeltepunktsskurven var stabil med få unntak. Alle prøver har fått positive resultater og positiv kontroll har ingen negative resultater. Negativ kontroll har 4 av 4 positive resultater med C_q-verdier fra 28,19 til 31,2. Alle 6 NTC ga negative resultater. C_q-verdiene var lave, og T_m-verdiene var jevne (ref. Vedlegg 4 tabell 21 og 22).



Figur 9: Amplifikasjonsplott og smeltepunktsskurve for analyse 2. Primerpar 2 er rød, og primerpar 3 er blå.

4.3 DNA-isolering og Qubit

Etter første DNA-isolasjon ble følgende konsentrasjoner målt med Qubit (ref. tabell 7).

Tabell 7: Konsentrasjoner av DNA-prøver fra lakselus ved første DNA-isolasjon. I første runde av DNA-isolasjon ble det kjørt isolering i 3 ulike prøverør.

DNA-prøve nr.	Konsentrasjon
1	$7,02 \cdot 10^{-4} \mu\text{g}/\mu\text{L}$
2	$8,82 \cdot 10^{-4} \mu\text{g}/\mu\text{L}$
3	$8,04 \cdot 10^{-4} \mu\text{g}/\mu\text{L}$

Før fortynningen ble følgende konsentrasjoner i DNA-prøvene målt, presentert i tabell 8.

Tabell 8: Konsentrasjoner av DNA og fortynninger fra standardkurve. Prøverør 1 og 2 fra første måling ble blandet sammen, og markert med 2.

DNA-prøve nr.	Konsentrasjon
2 (1 + 2)	$5,01 \cdot 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$
3	$5,11 \cdot 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$
Fortynningsrekke	Out of range

På grunn av beregningsfeil ble det utført to runder av DNA-isoleringer, og dermed Qubit-målinger på hver av disse. Som vist på tabell 9 har prøvene fra analyse 1 høyere verdi enn prøvene fra analyse 2.

Tabell 9: Konsentrasjoner av DNA fra alger. I denne runden av DNA-isolasjon ble det kjørt isolering i 7 ulike prøverør.

Prøve nr.	Analyse 1	Analyse 2
1	$7,5 \cdot 10^{-6} \mu\text{g}/\mu\text{L}$	$5,4 \cdot 10^{-7} \mu\text{g}/\mu\text{L}$
2	$7,97 \cdot 10^{-6} \mu\text{g}/\mu\text{L}$	$2,73 \cdot 10^{-6} \mu\text{g}/\mu\text{L}$
3	$5,52 \cdot 10^{-6} \mu\text{g}/\mu\text{L}$	$6,67 \cdot 10^{-6} \mu\text{g}/\mu\text{L}$
4	$1,08 \cdot 10^{-5} \mu\text{g}/\mu\text{L}$	$1,16 \cdot 10^{-6} \mu\text{g}/\mu\text{L}$
5	$9,32 \cdot 10^{-6} \mu\text{g}/\mu\text{L}$	$8,1 \cdot 10^{-7} \mu\text{g}/\mu\text{L}$
6	$1,45 \cdot 10^{-5} \mu\text{g}/\mu\text{L}$	$7,7 \cdot 10^{-7} \mu\text{g}/\mu\text{L}$
7	$1,45 \cdot 10^{-5} \mu\text{g}/\mu\text{L}$	$5,1 \cdot 10^{-7} \mu\text{g}/\mu\text{L}$
Lakselusprøver	Ikke målt	$6,61 \cdot 10^{-6} \mu\text{g}/\mu\text{L}$

5 Diskusjon

5.1 Primerdesign og optimalisering

Utførelse og tolkning av qPCR-eksperimenter har vært omdiskutert grunnet manglende enighet rundt temaet. Ved å følge MIQE Guidelines ved optimalisering og tolkning vil det produseres data som er mer ensartet, sammenlignbart og pålitelig. Det ble det i denne oppgaven tatt utgangspunkt i boken «Real-Time PCR» for primerdesign og MIQE Guidelines for optimalisering og tolkning(12, 33).

MIQE Guidelines har et hovedfokus på revers transkriptase PCR, hvor det benyttes mRNA. Gjennom dette arbeidet har det vært fokus på kvalitativ qPCR med DNA som nukleinsyre og derfor har enkelte parametere, som MIQE Guidelines presenterer, blitt ekskludert.

5.1.1 Primerdesign

Det ble designet egne primere for ulike gener i lakselusartens mtDNA med mål om å identifisere lakselus blant andre krepsdyr som naturlig kan være til stede i en vannprøve. Ved hjelp av primer-BLAST, som NCBI tilbyr, ble primere designet for genene Cytochrome c oxidase subunit I, Cytochrome b og ATP synthase F0 subunit 6 som alle ligger innenfor mtDNA-et. Denne beslutningen var tilfeldig, siden alle 12 søkeresultatene teoretisk kunne benyttes som målgen. Alle primerne ble designet med verdiene i tabell 2, hvor ulike faktorer ble justert. Primere som havnet utenfor disse grensene ble filtrert bort, etter anbefalinger fra «Real-time PCR» (12). Dette resulterte i 4 primerpar til vurdering. (Ref. Tabell 3, 4.1.1 primerdesign). Før primerne ble bestilt, ble de kryssjekket opp mot andre organismer for å verifisere at de ikke reagerte med DNA fra andre arter.

En celle inneholder en cellekjerne med kun en kopi av DNA. I motsetning inneholder cellen flere mitokondrier. Selve mitokondrien kan i tillegg ha flere kopier av mtDNA-et. Summeres antallet celler i en organisme med disse tallene, betyr dette at det er mange kopier av det samme mitokondrielle DNA-et (39). Ved å bruke mtDNA som målgen økes muligheten for at designede primere finner komplementær sekvens. Dette gjør at deteksjonsgrensen blir lavere og sannsynligheten for en vellykket metode blir høyere.

5.1.2 Metodeoptimalisering

På tross av filtreringene gjort under primerdesign, er det ikke alltid at teoretisk designede primere fungerer like godt i praksis. Primerne må derfor gjennom en optimalisering.

Optimalisering av metoden sørger for en robust PCR-analyse, med optimale faktorer for reaksjonen. Siden det ble designet 4 primerpar, var det i tillegg ønskelig å bestemme hvilke som ga best resultater. Ved å sammenligne figur 2 (ref. 4.1.2 optimalisering av templatvolum og annealingtemperatur) og 8 (ref. 4.2.1 Analyse 1) ser vi tydelig effekten av optimaliseringen. Smeltepunktsskurven og amplifikasjonsplottene har samlet seg og resultatene er jevnere ved figur 8.

Gjennom optimaliseringen ble det benyttet NTC som kontroller. Alle ble negative med unntak av første optimalisering hvor 2 av 24 NTC fikk C_q-verdier. Slike resultater kan forekomme ved bruk av SYBR Green, som kan gi falske positive resultater, og med tanke på de lite optimale analyseforholdene ved første qPCR. C_q-verdiene på de 2 positive resultatene lå begge over 30 (ref. Vedlegg 4 tabell 15), som indikerer at disse er primer-dimere. På grunnlag av dette ble det valgt å se bort i fra disse to positive NTC prøvene. Templat-DNA benyttet i prøvene er isolert fra rendyrkede lakseluslaver, og fungerer derfor som positiv kontroll gjennom optimaliseringen.

5.1.3 Optimalisering av volum og annealingtemperatur

For å velge hvilke egendesignede primere som er best egnet for videre bruk og dermed øke muligheten for en mest mulig effektiv qPCR-prosedyre, ble det først utført volum- og temperaturoptimalisering. Ved hjelp av informasjonen om primerne fra «Primer-BLAST» (ref. vedlegg 4 tabell 15), ble det først valgt 58 °C som annealingtemperatur. Etersom det ga gode resultater, ble det ikke gjort endringer her. Amplifisering med 40 sykluser ble, etter første qPCR-forsøk, endret til 35 sykluser. Dette ble gjort grunnet mange uspesifikke bindinger etter 35 sykluser (ref. figur 2, 4.1.2 Optimalisering av templatvolum og annealingtemperatur).

2 µL ble valgt som templatvolum på grunnlag av bedre resultater sammenlignet med 1 µL. 1 µL ga høye C_q-verdier, som tyder på for lav konsentrasjon og dermed en sen amplifisering. På grunnlag av lavere C_q-verdier og T_m-verdier, samt bedre smeltepunktsskurver ble 2 µL

valgt fremfor 3 μL . Primerpar 2 og 3 ga jevnt bedre resultater og ble brukt til videre optimalisering.

På tross av at primerpar 1 og 4 ble designet med anbefalte verdier som utgangspunkt, ble det avgjort å ikke bruke disse videre i optimaliseringen. Primerpar 1 ble designet i kombinasjon med primerpar 2 for å utføre nested PCR. Siden primerpar 1 ikke ble godkjent ble det ikke utført nested PCR i denne oppgaven.

Flere av parallellene til primerpar 1 fikk negative resultater ved volum 1 og 2. To av parallellene, ved volum 1 og 2 μL , til primerpar 4 manglet Cq-verdier. Resterende verdier var jevnt for høye (ref. Vedlegg 4 tabell 15). Manglende eller høye Cq-verdier ved disse volumene kan tyde på for lav konsentrasjon av templat-DNA. Konsentrasjonen av primerne i dette forsøket var høye (10 μM). Dette var på grunn av at det ikke var gjennomført en primeroptimalisering på dette tidspunktet. Det kan tyde på at forskjellen i konsentrasjon mellom primere og templat-DNA var for stor. I tillegg var qPCR-instrumentet ikke kalibrert før volum- og temperaturoptimalisering, som også kan påvirket resultatet. Høye Cq-verdier kan også bety dårlig primerspesifisitet.

5.1.4 Optimalisering av primerkonsentrasjon

Faktorene som ble bestemt i volum- og temperaturoptimaliseringen ble brukt videre i primeroptimalisering. Primeroptimaliseringen er viktig fordi ulike primere fungerer optimalt ved ulike konsentrasjoner. Dette gjelder også innenfor et spesifikt primerpar hvor ulike optimale konsentrasjoner, for FWD og RWD, er normalt.

Det ble bestemt optimale konsentrasjoner for primerpar 2 og 3. De ulike konsentrasjonskombinasjonene ble forkastet i forhold til følgende vurderinger: Om parallellene viser store individuelle forskjeller, om resultatene var negative og om smeltepunktsskurven var avvikende. De laveste konsentrasjonene, på 300 nM, ble på denne måten utelukket for både primerpar 2 og 3. Videre ble det vurdert hvor ofte de gjenværende konsentrasjonene ga optimale resultater for begge parallellene. For primerpar 3 ble det vurdert at 400 og 500 nM på RWD måtte utelukkes, grunnet manglende Cq-verdier for flere av parallellene. Til slutt ble det sett på Cq-verdien for de gjenværende konsentrasjonskombinasjonene. Etter disse vurderingene endte primerpar 2 opp med en

optimal primerkonsentrasjon på 500 nM for både FWD og RWD. For primerpar 3 var det tydelig at konsentrasjonene 500 nM for FWD og 600 for RWD var det beste valget (Ref. 4.1.3 Primeroptimalisering og vedlegg 4 tabell 19, 20, 21 og 22).

Et optimalt primerpar har så lite primer-dimere til stede som mulig. I dette forsøket fikk alle resultatene primer-dimere. Siden det benyttes smeltepunktsskurve er det lett å skille primer-dimere fra amplifisert produkt. Derfor ble denne faktoren mindre vektlagt.

5.1.5 Standardkurve og deteksjonsgrense

Etter metodeoptimaliseringene ble det utført forsøk for å bestemme sensitivitet ved hjelp av deteksjonsgrensen og effektivitet ved hjelp av standardkurven. Dette ble gjort ved å analysere en fortynningsrekke ut fra lakselusprøvene. Flere paralleller ble satt opp og brukt som utgangspunkt til å lage standardkurve for begge primerparene.

MIQE Guidelines definerer deteksjonsgrensen som den laveste konsentrasjonen som gir 95 % positive svar for paralleller. Siden det ble satt opp tre paralleller ble denne grensen satt til 2/3. Alle parallellene for primerpar 3 ga positive resultater. For primerpar 2 fikk én av parallellene for fortykning 2 negativt svar, som er innenfor satt grense. Unntaket er fortykning 5, hvor ingen paralleller fikk positive svar. Dette indikerer at fortykningene er under deteksjonsgrensen for metodene, og derfor forkastes fortykningen. (ref. Vedlegg 4 tabell 18).

Det ble ikke bestemt en nøyaktig deteksjonsgrense. Dette kommer av at Qubit-resultatene vurderes som upålitelige, da instrumentet som ble benyttet ikke var tillitsverdig (ref. 5.4 DNA-isolering og Qubit). Det ble i stedet satt en indikasjon på prøveinnholdet i de ulike fortykningene. Qubit-resultatene for lakselusprøven (Ref 4.3 DNA-isolering og Qubit, tabell 8) ble benyttet til utregning av konsentrasjonene til fortynningsrekken, som oppført i tabell 4 (ref 4.1.4 Standardkurve og deteksjonsgrense). Siden deteksjonsgrensen er usikker, ville det vært optimalt å kjøre et nytt forsøk, med en ny fortynningsrekke og på denne måten bestemme den nøyaktige deteksjonsgrensen. På grunn av manglende laboratorietid grunnet koronasituasjonen, ble det ikke utført ny fortynningsrekke for å prioritere analysering av metoden.

Primerpar 2 og 3 resulterte i stigende C_q-verdier fra ufortynnet prøve til fortykning 1, 2, 3 og 4, hvilket er som forventet (Ref. figur 5 og 6, 4.1.4 Standardkurve og deteksjonsgrense).

Fortynning 3 og 4 hadde for høy Cq-verdi til å kunne godkjennes for primerpar 2. For primerpar 3 ble Cq-verdien til fortynning 4 for høy (ref. Vedlegg 4 tabell 18). Det ble tolket som at konsentrasjonene muligens var under deteksjonsgrensen og de høye Cq-verdiene kan i den sammenhengen forveksles med primer-dimere. For å være på den sikre siden ble fortynning 2 satt som deteksjonsgrense for primerpar 2, som indikerer en deteksjonsgrense rundt $5 \cdot 10^{-5}$ µg DNA/µL. Dette tilsvarer en sensitivitet hvor prøven kan inneholde 0,1 lakselus per 100 µL. Fortynning 3 ble satt som deteksjonsgrense for primerpar 3 og indikerer en deteksjonsgrense rundt $5 \cdot 10^{-6}$ µg DNA/µL. Dette tilsvarer en sensitivitet hvor prøven kan inneholde 0,01 lakselus per 100 µL. (ref. tabell 4, 4.1.4 Standardkurve og deteksjonsgrense). Dette viser at både primerpar 2 og 3 har en god nok sensitivitet til å gi svar på om det er lakseluslarver til stede i en prøve.

Effektiviteten til de to ulike primerparene ble beregnet ut ifra en standardkurve.

Standardkurven ble laget med Cq-gjennomsnittet av tre paralleller for ufortynnet prøve og 4 tifoldfortynninger. Siden ingen av parallellene til fortynning 5 fikk resultater, som gjaldt for begge primerparene, ble de sett bort ifra. Dette resulterte i standardkurve med fem punkter for både primerpar 2 og 3. (ref. Vedlegg 4 tabell 18). Ut ifra standardkurven, ble det beregnet R²-verdi, slope-verdi og effektivitet.

Begge primerparene viste standardkurver med god R²-verdi for assayet. Videre fikk begge primerparene høye slope-verdier, utenfor anbefalte grenser. Ut ifra slope-verdiene ble det beregnet effektivitet som resulterte i en lav effektivitet på rundt 80 %. (Ref. 4.1.4 standardkurve og deteksjonsgrense). På tross av dette, ble det valgt å godkjenne verdien. De anbefalte grensene (Ref 2.4.3 Standardkurve og deteksjonsgrense) er spesifikke for kvantitative qPCR-metoder. Siden denne oppgavens formål er å utvikle en kvalitativ metode, blir det satt et lavere krav til både slope-verdi og effektivitet. De gjeldene anbefalingene er derfor en slope-verdi mellom -3,9 og -2,9, og effektivitet mellom 80 og 120 %. R²-verdien anbefales å være over 0,98 (40). I tillegg ble det tatt i betraktning at MIQE Guidelines beskriver at Cq-verdier som er over 40 er en indikasjon på dårlig effektivitet. Cq-verdier over 40 ble ikke målt gjennom dette arbeidet (ref. Vedlegg 4 tabell 18).

Ut ifra resultatene etter forsøket, indikeres det at primerpar 3 har en bedre deteksjonsgrense og dermed en bedre sensitivitet enn primerpar 2. Primerpar 3 har også lavere slope-verdi, høyere R^2 -verdi og høyere effektivitet. Det har gjennom hele forsøket vært mer optimale resultater for primerpar 3 i forhold til primerpar 2. Denne forskjellen vises spesielt i figur 5 og 6 (Ref. 4.1.4 Standardkurve og deteksjonsgrense), hvor primerpar 3 har et finere amplifikasjonsplott og smeltepunktskurve i forhold til primerpar 2

Det ble oppdaget at FWD-primeren for primerpar 2 manglet et nukleotid, og at denne inneholdt 19 basepar. Det kan tolkes som at det har skjedd en bestillingsfeil, ettersom designet primer originalt hadde 20 basepar. Denne feilen har mest sannsynlig forekommet mellom overgangen fra primer-BLAST resultatene og til bestillingskjemaet. Primersekvensen som ble bestilt og brukt var GGGCTTCAGTAGATTTGCG (5'--> 3'). Her manglet det en T på nukleotid 16 i forhold til ønsket sekvens, som var GGGCTTCAGTAGATTTGCG (5'--> 3'). Siden det ble oppdaget at primerpar 2 hadde en feil ved sekvensen, kan det anbefales å bestille nye primere og undersøke paret på nytt for å forbedre resultatene i et fremtidig arbeid.

Dette gir grunnlag for forklaringer på hvorfor primerpar 2 har mindre effektivitet og sensitivitet i forhold til primerpar 3. I hovedsak påvirker dette annealingen mellom primer og templat-DNA, da disse skal være så komplementære som mulig. Når primersekvensen mangler et nukleotid kan de teoretiske faktorene, som oppgis av primer-BLAST under primerdesign, forandres i praksis.

5.2 Analyse av prøver

Før utførelsen av analyse 1 ble det beregnet feil volum av alger. Dette førte til en drastisk økning av mengden alger i løsningene (ref. 4.2.1 Analyse 1, tabell 5 og 4.2.2, tabell 6). Mengden alger i analyse 1 var oppimot 100 (varierte fra prøverør til prøverør) ganger høyere enn ved analyse 2. Det ble bestemt at det skulle utføres to analyser. Analyse 1 med de høykonsentrerte løsningene og analyse 2 med prøver som hadde lavere konsentrasjon av alger med samme mengde lakseluslarver.

5.2.1 Analyse 1

Det ble observert C_q-verdier mellom 15,5 og 24 for alle målprøvene (ref. Vedlegg 4 tabell 19 og 20). Dette tyder på at optimaliseringen har vært vellykket og den utviklede metoden kan benyttes ettersom det har blitt påvist lakseluslarver blant algene (ref. tabell 5, 4.2.1 Analyse 1). For eksempel observeres det i tabell 5 (ref. 4.2.1 Analyse 1) at prøve nr. 6 inneholder DNA til to lakseluslarver som har blitt detektert blant 11 millioner alger.

I tillegg til sakte pipettering, kort oppholdstid i pipette og at samme person utfører hele pipetteringen ble det ved analyse 1 lagt mer fokus på pipetteringsteknikk enn i tidligere forsøk. Til forskjell fra tidligere forsøk, ble pipetteringen nå utført på en slik måte at pipettespissen gikk lengre ned i brønnen enn ved tidligere forsøk. Fokus på pipetteknikk er for å unngå feilkilder grunnet varians i pipettering. Det vurderes om dette kan ha hatt en positiv effekt på resultatene i dette forsøket, da alle reagenser blandes ordentlig sammen uten at noe henger igjen på veggen av de ulike brønnene.

I analyse 1 og 2 ble det benyttet positive og negative kontroller. De positive kontrollene inneholdt bare lakseluslarver, mens de negative kontrollene inneholdt bare alger. Ved analyse 1, med høy konsentrasjon, ble resultatene som forventet (ref. Vedlegg 4 tabell 19 og 20). Alle negative kontroller oppnådde et negativt utslag, som indikerer at primerne ikke har festet seg til uspesifikke DNA-sekvenser. Alle de positive kontrollene fikk positivt utslag, som indikerer at primerparene bindes til ønsket templat-DNA. Siden både positive og negative kontroller gir optimale resultater, viser det at de egendesignede primerparene binder seg spesifikt til målgenene og ikke til annet DNA i prøvene.

Det ble observert tendenser til primer-dimere helt på slutten av smeltepunktskurvene, slik som det har blitt observert tidligere (Ref 4.2.1 Analyse 1). Primer-dimere kan skyldes primere med for mye GC-innhold og med for mye overlapp. Det kan også inntreffe dersom mastermiksen har vært lagret for lenge (41,42). Siden alle mastermiksene ble laget samme dag som bruk, er ikke dette tilfellet. Primer-dimere detekteres fordi SYBR Green binder seg uspesifikt til alt dsDNA i prøvene. Fargestoffet kan derfor binde seg til uønskede komponenter som primer-dimere.

5.2.2 Analyse 2

Ved analyse 2 var det utslag på alle 4 negative kontroller, men med svært høye Cq-verdier (ref. Vedlegg 4 tabell 21 og 22). Svært høye Cq-verdier kan ofte indikere primer-dimere, men kan også indikere potensielle feilpipetteringer eller forurensninger. Siden dette kun var et problem ved analyse 2, kan det diskuteres at forskjeller ved utførelse av de to analysene kan ha forårsaket dette. På grunn av koronarestriksjoner var det ikke mulig for selve bachelorgruppen å være til stede ved analyse 2, og selve utførelsen av forsøket ble derfor ikke observert.

Ved analyse 2 fikk alle prøvene lave Cq-verdier mellom 15 og 23 (ref. Vedlegg 4 tabell 21 og 22), som igjen støtter oppunder en vellykket optimalisering. I alle prøvene har det blitt detektert lakselus blant alger. Alle NTC hadde «No Cq», som indikerer lite bakgrunnsstøy og lite forurensninger (ref. 2.2 Real-time PCR (qPCR)). De positive kontrollene ga forventede resultater. På tross av disse resultatene, er det en viss usikkerhet i forsøket, på grunnlag av de negative kontrollene. Det hadde derfor vært ideelt å utføre et nytt forsøk med samme oppsett for å se om man kan reprodusere denne feilen og observere om de negative kontrollene får utslag eller ikke. Dette ble dessverre ikke mulig grunnet tidspress og koronarestriksjoner.

Det ble benyttet et annet plateoppsett ved dette forsøket enn det som har vært benyttet tidligere. Det kan stilles spørsmål til om dette kan ha påvirket resultatet dersom noen av brønnene kan ha hatt større variasjon enn andre. Det burde derfor utføres et forsøk der det blir benyttet samme plateoppsett som ved analyse 1. Dette kan snevre inn potensielle feilkilder.

5.3 DNA-isolering og Qubit

Det ble til sammen utført 17 DNA-isoleringer i tre omganger: Tre isoleringer for optimalisering og positiv kontroll, sju isoleringer for analyse 1 og sju isoleringer for analyse 2. Alle prøvene for DNA-isolering ble utsatt for lik prosess (Ref. vedlegg 6), for å unngå avvik og variasjon mellom prøvene. Hvert eneste trinn i prosessen ble utført i henhold til metoden for å unngå feil. For å unngå kontaminasjon ved arbeidet på laboratoriet ble det benyttet hansker og pipettespisser ble skiftet ut mellom hver pipettering.

Qubit-fluorometeret ble brukt fire ganger under dette forsøket, som vist under 4.3 DNA-isolering og Qubit. Første analyse var DNA-isoleringen av lakseluslarver. Deretter ble de

samme prøvene testet før standardkurve-analysen. Til slutt ble prøvene fra DNA-isolering for analyse 1 og analyse 2 målt. Qubit-resultatene viste generelt lave konsentrasjoner av DNA etter første DNA-isolering. De lave verdiene fra tabell 7 (ref. 4.3 DNA-isolering og Qubit) kan indikere at det ble eluert for lite DNA under isoleringen, men også at antallet lakselus kunne vært høyere. Med tanke på dette, ble det bestemt at første analyse krevde en volumoptimalisering, i tillegg til temperaturoptimaliseringen.

Etter Qubit-analyse på prøvene med lakseluslarver, som vist i tabell 7 (ref. 4.3 DNA-isolering og Qubit), ble det bestemt at prøve 1 og 2 ble mikset for å oppnå en jevnere DNA-konsentrasjon i sammenligning med prøve 3. I tabell 7 (ref. 4.3 DNA-isolering og Qubit) har denne miksen fått navnet prøve 2. Etersom prøve 2 inneholdt større totalvolum, ble denne brukt videre i optimalisering. Dette var ønskelig for å bruke samme prøve under alle optimaliseringene, slik at unødvendige variasjoner ble unngått. Prøve 3, som inneholdt mindre volum enn prøve 2, ble brukt til positiv kontroll ved analyse 1 og 2.

Resultatene fra tabell 8 (ref. 4.3 DNA-isolering og Qubit) viser at DNA-prøvene som ble benyttet til positiv kontroll i qPCR-analysene inneholder DNA. Dette var de samme prøvene fra første Qubit-analyse. Ved andre måling ble det målt høyere konsentrasjon enn ved første måling (ref. tabell 7 og 8, 4.3 DNA-isolering og Qubit). Dette kommer trolig av en forlengelse av inkubasjonstiden ved andre måling, noe som påvirket resultatet.

Ved Qubit-målingene av fortynningsrekken ble det passet på å mikse fortynningene ordentlig, og la reaksjonen med Working Solution virke ved å inkubere prøvene før de ble plassert i fluorometeret. På tross av dette ble det ikke detektert nok DNA til at fluorometeret kunne oppgi en verdi på fortynningsrekken. Resultatene fra qPCR-analysene (ref. 4.1.4 Standardkurve og deteksjonsgrense) viser at fortynningsrekken, med unntak av fortynning 5, er positive på tross av at Qubit-fluorometeret ikke klarte å detektere DNA-et. Det knyttes derfor skepsis til nøyaktigheten til Qubit-fluorometeret som ble brukt. Det antas at Qubit-fluorometeret benyttet i dette arbeidet har vanskeligheter for deteksjon av DNA ved nedre deteksjonsgrense.

Qubit 2.0 er et eldre instrument og siden det ble lansert har det kommet flere nyere versjoner. Instrumentet som ble brukt var mye eldre enn garantitiden, som er på ett år etter innkjøp. Derfor må instrumentet holdes godt ved like etter denne tiden. Siden instrumentet ble benyttet i skolesammenheng har informasjon om eventuell uforsiktig bruk av instrumentet vært

utilgjengelig. Det er erfaringer fra tidligere arbeid, at instrumentet ikke har fungert optimalt (43).

Ved de teoretiske beregningene av fortynningsrekkenes konsentrasjon (ref. tabell 4, 4.1.4 Standardkurve og deteksjonsgrense), inneholdt de første fortynningene betraktelig mer DNA enn fluorometerets nedre deteksjonsgrense (Ref. tabell 8, 4.3 DNA-isolering og Qubit). Derfor ble Qubit-analysene hovedsakelig brukt som et kvalitetssikringstrinn, og det var rettet mer fokus på tilstedeværelse av DNA i Qubit-prøvene enn konsentrasjonen.

Ved telling av algene ble det gjort en menneskelig feil i utregningen, slik at det ble tilsatt et høyere volum av alger i analyse 1 sammenlignet med analyse 2. Som vist i tabell 9 (ref. 4.3 DNA-isolering og Qubit), førte regnefeilen til forhøyede verdier. Ved å gjenta forsøket med lavere konsentrasjoner av alger, ble det observert lavere verdier for alle sju prøvene. Disse verdiene, som var fra analyse 2 var som forventet.

5.4 Praktisk informasjon

I følge DNeasy® Blood & Tissue Handbook tar DNA-isolering 1 time og 20 min etter prøvepreparering (44). I denne oppgaven beregnes det utvidet tid, da lyseringen ble satt til 90 min i stede og pipetteringen tok 30 min. Selve qPCR-analysen krever rundt 40 minutter til pipettering og 80 min analysetid. Det estimeres at hele prosedyren til sammen vil ta 4 timer utenom prøvepreparasjon. Ønskes det å utføre Qubit etter DNA-isoleringen som en kvalitetskontroll, må dette medberegnes. Tiden er beregnet for preparering av 7 prøver. Ved benyttelse av DNeasy® 96 prosedyre kan flere prøver tas samtidig (44). Ved å benytte automatiserte pipetteringsteknikker kan prosessen effektiviseres, og utførelsen vil ta kortere tid.

Metoden som er utviklet i denne oppgaven kan identifisere tilstedeværelse av lakseluslarver i en prøve. Dette kan benyttes til å lokalisere lakseluslarver. Potensielt kan metoden benyttes til undersøkelse av eventuelle levemønstre ved å hente feltprøver fra ulike dybder. Metoden sier ikke noe om antallet larver som eventuelt er til stede. I denne sammenhengen er det viktig å nevne at qPCR-metoden ikke kan skille mellom døde og levende lakselus. Det kan heller ikke brukes for å gi informasjon om lakselusens helse. Dette betyr at tilstedeværelse av døde lakselus fortsatt vil kunne gi utslag.

5.5 Videre arbeid

Resultatene til analyse 1 er svært relevante for andre som skal reprodusere eller videreutvikle metoden, da disse viser spesifisiteten og repeterbarheten til analysen (ref. vedlegg 4 tabell 19 og 20 og 4.2.1 Analyse 1). Metoden anses å være vellykket, men det kan utføres forbedringer. Forsøkene i dette arbeidet burde kjøres flere ganger for å sikre at resultatene er reproduserbare. Robustheten til metoden burde testes og flere av parameterne burde justeres for å se om man fortsatt kan oppnå akseptable resultater. Slike forsøk kan gi viktig informasjon til å velge hvilke parametere som er essensielle og hvilke parametere som er mindre essensielle for metoden. Ved å teste metoden med arter som ligger i nær fylogenetisk posisjon som lakseluslarver, kan metoden videre testes for spesifisitet for lakseluslarver. Dette kan for eksempel være *Tigriopus japonicus* (21).

Hvis det benyttes et DNA-isoleringskit spesifikt for mtDNA kan dette videre forbedre metoden (45). Dette vil utelukke mye annet DNA i prøvene. Siden det kun er eukaryote celler som har mitokondrielt DNA, vil forurensninger fra prokaryote celler ikke påvirke resultatene i et slikt tilfelle.

6 Konklusjon

Det ble utviklet en metode for påvisning av lakselus i vannprøver som spesifikt kan detektere lakselus i en prøve som inneholder plankton ved hjelp av qPCR. Metoden er ikke avhengig av lakselusens utviklingsstadium da det kun er mengden lakselus-DNA til stede i prøven som er avgjørende. Arbeidet vil være et godt underlag for videre utvikling av kvalitativ metode for lakselus.

Av fire designede primerpar fra tre ulike gener innenfor genomet til *Lepeophtheirus salmonis*, ble Cytochrome b med forward-sekvens CCGCATGATATGGTCTACGG og reverse-sekvens GGGTGGAACCTTGGGTCTTT (primerpar 3 i denne oppgaven) funnet å gi de beste resultatene. I tillegg ble det vist at Cytochrome c oxidase subunit I med forward-sekvens GGGCTTCAGTAGATTTGCG og reverse-sekvens CTAAAAGTCCCAAGCACCGT (primerpar 2 i denne oppgaven) også kan brukes til samme formål, med noe mindre optimale resultater. Primerpar 2 og 3 kan ikke brukes sammen til videre arbeid med nested PCR.

Alle optimaliserte metodeparametere er summert i tabell 10 under. Ferdig metode er beskrevet i vedlegg 12.

Tabell 10: Oppsummering av optimaliserte parametere.

Parameter	Primerpar 2	Primerpar 3 (anbefalt primerpar)
Templatvolumoptimalisering	2 μ L	
Annealingtemperatur	58 °C	
Antall sykluser	35	
Primerkonsentrasjon	FWD 500 nM/RWD 500 nM	FWD 500 nM/RWD 600 nM
Deteksjonsgrense	$5 \cdot 10^{-5}$ μ g/ μ L	$5 \cdot 10^{-6}$ μ g/ μ L
Slope-verdi	3.9180	3.8817
Effektivitet	80.00 %	81.00%
R ² -verdi	0,9800	0,9954

7. Litteraturliste

1. Utenrikshandel med varer, Statistisk sentralbyrå [Internett]. 15. april 2021 [hentet 10. mai 2021]; Tilgjengelig fra: <https://www.ssb.no/utenriksokonomi/utenrikshandel/statistikk/utenrikshandel-med-varer>
2. Innovations for Sustainable Eabased Aquaculture (InnoSEA), NTNU [Internett]. c2020 [hentet 1 mai 2021]; Tilgjengelig fra: <https://www.ntnu.edu/iba/innosea#/view/about>
3. Uglem I., Finstad B. og Næsje T. Hvorfor er lakselus fra oppdrett et problem for vill laksefisk? [Internett]. 16. juli 2019 [hentet 1 mai 2021]; Tilgjengelig fra: <https://blogg.forskning.no/blogg-villaksbloggen-fisk/hvorfor-er-lakselus-fra-oppdrett-et-problem-for-vill-laksefisk/1359233>
4. Fakta om lakselus og lakselusbekjempelse, Mattilsynet. [Internett]. 20. september 2016 [hentet 18. januar 2021]; Tilgjengelig fra: https://www.mattilsynet.no/fisk_og_akvakultur/fiskehelse/fiske_og_skjellsykdommer/lakselus/fakta_om_lakselus_og_lakselusbekjempelse.23766
5. Jakobsen A. Ny metode gjør lakselus selvlysende, forskning.no. [Internett]. 23. mai 2020 [hentet 12. januar 2021]; Tilgjengelig fra: <https://forskning.no/fisk-fiskehelse-havforskningsinstituttet/ny-metode-gjor-lakselus-selvlysende/1683820>
6. Håstein T., Sømme L. S, Halleraker J. H., Vøllestad A. Lakselus. Store Norske Leksikon. [Internett]. 8. januar 2021 [hentet 28. januar 2021]; Tilgjengelig fra: <https://snl.no/lakselus>
7. Lepeophtheirus salmonis. Schoch CL, et al. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford). [Internett]. 2020 [hentet 24. januar 2021]; baaa062. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=info&id=72036>
8. Generell biologi. Havforsknings instituttet. [Internett]. 17. desember 2018 [hentet 12. januar 2021]; Tilgjengelig fra: <https://www.hi.no/hi/temasider/arter/lakselus/generell-biologi>

9. Sea Lice Research Centre. SLRC - Life cycle of the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*). DataverseNO [Internett]. 12. januar 2020 [hentet 5. mai 2021]; Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.18710/GQTYYL>
10. Sussie Dalvin, Frode Oppedal. Utvikling av lakselus ved ulike temperatur og lys. Havforsknings instituttet. [Internett]. 5. mars 2019 [hentet 18. januar 2021]; Tilgjengelig fra: <https://www.hi.no/hi/nettrapporter/rapport-fra-havforskningen-2019-13>
11. Heuch P.A., Nordhagen J.R., Schram T.A. Egg production in the salmon louse [*Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer)] in relation to origin and water temperature. Aquaculture Research. [Internett]. 24. desember 2001 [hentet 18. januar 2021]; 31:805-814. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2000.00512.x>
12. M. Tefvik Dorak. Real-time PCR. 2006. USA og England. Real-time PCR
13. Neidler S. What are the differences between PCR, RT-PCR, qPCR, and RT-qPCR? Enzo Life Sciences. [Internett]. mars 2017 [hentet 28. januar 2021]; Tilgjengelig fra: <https://www.enzolifesciences.com/science-center/technotes/2017/march/what-are-the-differences-between-pcr-rt-pcr-qpcr-and-rt-qpcr?/>
14. N Bermingham, K Luettich, Polymerase chain reaction and its applications, Current Diagnostic Pathology, [Internett]. 10. april 2003 [hentet 14. mars 2021]; 9(3):159-164. Tilgjengelig fra: [https://doi.org/10.1016/S0968-6053\(02\)00102-3](https://doi.org/10.1016/S0968-6053(02)00102-3)
15. Oswald, N. What is a Cq (Ct) Value? BiteSizeBio [Internett]. 17. november 2020 [hentet 28. januar 2021]. Tilgjengelig fra: <https://bitesizebio.com/24581/what-is-a-ct-value/>
16. B. John. Process controls: internal and external. Medical Laboratory Observer. [Internett]. 18. november 2013 [hentet 14. mai 2021]; Tilgjengelig fra: <https://www.mlo-online.com/home/article/13005863/process-controls-internal-and-external>
17. Tajadini, M., Panjehpour, M. og Javandmard, S.H. Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. NCBI [Internett]. 28 februar 2014 [hentet 8 februar 2021]. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3988599/>

18. Mukherjee A, Sasikala W. D. Chapter One - Drug–DNA Intercalation: From Discovery to the Molecular Mechanism. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. [Internett]. 15. august 2003 [hentet 7. februar 2021]; 92:1-62. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411636-8.00001-8>
19. Downey, N. *Interpreting melt curves: An indicator, not a diagnosis*. Coralville, 2014 [hentet 3 februar 2021]. Tilgjengelig fra: <http://www.science.smith.edu/cmbs/wp-content/uploads/sites/36/2015/09/Interpreting-melt-curves.pdf>
20. *Melting Curve Analysis*. Fluidigm, South San Francisco, 2015 [hentet 3 februar 2021]. Tilgjengelig fra: <https://www.fluidigm.com/binaries/content/documents/fluidigm/resources/melting-curve-analysis-ug-68000118/melting-curve-analysis-ug-68000118/fluidigm%3Afile>
21. Tjensvoll K., Hodneland K., Nilsen F., Nylund A. Genetic characterization of the mitochondrial DNA from *Lepeophtheirus salmonis* (Crustacea; Copepoda). A new gene organization revealed. [Internett]. 28. juni 2015 [hentet 10. mai 2021]; *Gene*; 353(2) Tilgjengelig fra: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378111905002453?via%3Dihub>
22. Dieffenbach CW, Lowe TM, Dveksler GS. General concepts for PCR primer design. *PCR Methods Appl*. [Internett]. 3. desember 1993 [hentet 4. mai 2021]; (3):S30-7. Tilgjengelig fra: <https://genome.cshlp.org/content/3/3/S30>
23. Cutler C. *A Brief Introduction to Quantitative PCR and Applications* [Internett]. Agilent Technologies [Hentet 30. mars 2021]. Tilgjengelig fra: <https://www.agilent.com/cs/library/slidepresentation/public/QPCR%20basics%20and%20applications%20NIH%20Oct%202022.pdf>
24. *Steps for a successful qPCR experiment*. Integrated DNA Technologies [Internett]. [Hentet 14. Mai 2021]. Tilgjengelig fra: <https://eu.idtdna.com/pages/education/decoded/article/successful-qpcr>

25. Bustin, Stephen, and Jim Huggett. "qPCR primer design revisited." *Biomol detect quantif*. [Internett]. 22. november 2017 [hentet 4. mai 2021]; 14(19-28):25 Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5702850/>
26. Carr, J., Williams, D.G., og Hayden. R.T. Molecular Detection of Multiple Respiratory Viruses. Amsterdam. [Internett]. 29 januar 2010 [hentet 3 februar 2021]. Tilgjengelig fra: <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/nested-polymerase-chain-reaction>
27. AriaMx Real-time PCR System [Internett]. Agilent Technologies [Hentet 20. Mars 2021]. Tilgjengelig fra: [https://www.agilent.com/en/product/real-time-pcr-\(qpcr\)/real-time-pcr-\(qpcr\)-instruments/ariamx-real-time-pcr-system-software-pc/ariamx-real-time-pcr-system-232711](https://www.agilent.com/en/product/real-time-pcr-(qpcr)/real-time-pcr-(qpcr)-instruments/ariamx-real-time-pcr-system-software-pc/ariamx-real-time-pcr-system-232711)
28. PCR Troubleshooting. BIO-RAD. [Internett]. 2021 [hentet 26. mars 2021]; Tilgjengelig fra: <https://www.bio-rad.com/en-no/applications-technologies/pcr-troubleshooting?ID=LUSO3HC4S>
29. Design and optimization of SYBR Green assays. Thermo Fisher scientific. [Internett]. 2020 [hentet 8. januar 2021]; Tilgjengelig fra: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/GSD/Reference-Materials/sybr-green-assays-white-paper.pdf>
30. The Ultimate qPCR Assay Design Guide [Internett]. Bio-Rad Laboratories. [Hentet 25.Mars 2021] Tilgjengelig fra: https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6894.pdf
31. Introduction to Quantitative PCR: methods and applications guide. Stratagene. [Internett]. 2004 [Hentet 22 Mars 2021]. Tilgjengelig fra: <https://www.gene-quantification.de/qpcrGuide-Stratagene.pdf>
32. Forootan, A., Sjöback, R., Björkman, J., Sjögreen, B., Linz, L., & Kubista, M. Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR). *Biomolecular detection and quantification*, [Internett]. 29. april 2007 [hentet vår 2021]; 12, 1–6. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.04.001>

33. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*. [Internett]. 1. April 2009 [hentet vår 2021]; 55(4):611-22. Tilgjengelig fra: <https://academic.oup.com/clinchem/article/55/4/611/5631762>
34. DNA extraction. University of Waikato. Hamilton. [Internett]. 18 juni 2009 [hentet 10 april 2021]. Tilgjengelig fra: <https://www.sciencelearn.org.nz/resources/2036-dna-extraction>
35. Qubit Fluorometric Quantification [Internett] ThermoFischer Scientific. [hentet 10 april 2021]. Tilgjengelig fra: https://www.thermofisher.com/no/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/fluorometers/qubit.html?ef_id=CjwKCAjwhYOFBhBkEiwASF3KGYGQbf8xARyOsbi_PwvFxm2DTHV-F0CL17oxc-pBcyiEyOkPzTfFFRoCu_gQAvD_BwE:G:s&s_kwcid=AL!3652!3!393988167744!e!!g!!qubit%20fluorometer&cid=bid_pca_aqb_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_gaw_bt_pur_con&gclid=CjwKCAjwhYOFBhBkEiwASF3KGYGQbf8xARyOsbi_PwvFxm2DTHV-F0CL17oxc-pBcyiEyOkPzTfFFRoCu_gQAvD_BwE
36. National Center for Biotechnology Information (NCBI)[. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology. . [Internett]. 1998 [hentet vår 2021]; Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
37. Primer-BLAST. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology. [Internett]. [hentet vår 2021];. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>
38. Nukleotid-BLAST. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology. [Internett]. [hentet vår 2021]; Tilgjengelig fra: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome
39. Chinnery, P. F., & Hudson, G. Mitochondrial genetics. *British medical bulletin*. National Center for Biotechnology. [Internett]. Juni 2013 [hentet 10. mai 2021]; 106(1), 135–159. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3675899/>

40. Broeders S, Huber I, Grohmann L, Berben G, Taverniers I, Mazzara M, et al. Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. *Trends in Food Science & Technology*. [Internett]. 01. juni 2014 [hentet 6. mai 2021]; 37(2):115-26. Tilgjengelig fra: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224414000661>
41. Ruiz-Villalba, A., van Pelt-Verkuil, E., Gunst, Q. D., Ruijter, J. M., & van den Hoff, M. J. Amplification of nonspecific products in quantitative polymerase chain reactions (qPCR). *Biomolecular detection and quantification*, [Internett]. 2017 [hentet 28. mars 2021]; 14, 7–18. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.10.001>
42. Behind The Bench Staff. PCR Primer Design Tips. ThermoFischer Scientific [Internett].; 09.25.2019 [Hentet 28. mars 2021]. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/blog/behindthebench/pcr-primer-design-tips/>
43. Qubit Fluorometer. Invitrogen [Internett] Carlsbad; 2007 [hentet 22 april 2021]. Tilgjengelig fra: http://fg.cns.utexas.edu/fg/research_archive_of_manuals_files/qubit.pdf?fbclid=IwAR1_r2HwmajAwpCTKLQ7InOzfamyCzO_pvI0o-RaUcyi0JsdyZJ5F1_v5Fo
44. QIAGEN. DNeasy ® Blood & Tissue Handbook. July 2020. Tilgjengelig fra: <https://www.qiagen.com/lu/resources/resourcedetail?id=68f29296-5a9f-40fa-8b3d-1c148d0b3030&lang=en>
45. Mitochondria Isolation Kit for Tissue. Thermo Fisher Scientific. [Internett]. [hentet 15. mai 2021]; Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/89801?SID=srch-srp-89801#/89801?SID=srch-srp-89801>

Vedlegg 1: Reagensliste

Tabell 11: Oversikt over benyttede reagenser

Prosedyre	Reagens	Produsent	Land	Artikkelnummer
Algetelling	Lugol's jodløsning	BDH Laboratory Supplies	England	7.6029 - 250
DNA-isolering	DNeasy Blood & Tissue Kit	QIAGEN	Tyskland	-----
	RNase-fritt vann	QIAGEN	Tyskland	1017979
	Buffer ATL	QIAGEN	Tyskland	1063369
	Proteinkinase K	QIAGEN	Tyskland	-----
	Buffer AL	QIAGEN	Tyskland	1014594
	DNeasy Mini Spin Column	QIAGEN	Tyskland	1113885
	Collection Tube	QIAGEN	Tyskland	1016810
	Buffer AW1	QIAGEN	Tyskland	1014790
	Buffer AW2	QIAGEN	Tyskland	1014790
	Buffer AE	QIAGEN	Tyskland	1914572
Qubit	Qubit™ dsDNA HS Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	USA	Q33231
	Working solution	Thermo Fisher Scientific	USA	Q33231
	Standard 1	Thermo Fisher Scientific	USA	Q33231
	Standard 2	Thermo Fisher Scientific	USA	Q33231
qPCR analyser	RNase-fritt vann	QIAGEN	Tyskland	1017979
	PerfeCTa SYBR Green FastMix ROX	Quantabio	USA	-----

Vedlegg 2: Forsøkets forløp

Tabell 12: Oversikt over forsøksforløp

Forsøk	Dato	Beskrivelse
DNA-isolering av lakselus	18.02	Lakseluslarver ble telt. DNA ble isolert med DNeasy kit.
DNA volumoptimalisering	25.02	Volum ble optimalisert ved 58 °C
Primeroptimalisering	26.02	Primerkonsentrasjoner for FWD og RWD ble optimalisert.
Standardkurve og deteksjonsgrense	04.03	Standardkurve ble laget og deteksjonsgrense observert.
DNA-isolering av alger	11.03	Algeprøver ble tatt ut og telt. DNA-et til telte prøver ble isolert.
Analyse 1	16.03	Algeforsøk med høy konsentrasjon av alger.
Analyse 2	23.03	Algeforsøk med lav konsentrasjon av alger.

Vedlegg 3: Primerdesign

Tabell 13: Oversikt over målgener benyttet i forsøket, med designede primersekvenser.

Gen Navn	Gen ID	Beskrivelse	Primer sekvens
Cytochrome c oxidase subunit I	ID: 3523614	Cytochrome c oxidase subunit 1 er et enzym som er med på å katalysere den respiratoriske prosessen der oksygen reduseres til vann (1).	<p>Primerpar 1: Forward: TTCGGGAGTTTTTCACTCCG Reverse: ATTGGCATTGCCCCACTAA</p> <p>Primerpar 2: Forward: GGGCTTCAGTAGATTTTGCG Reverse: CTAAAAGTCCCAAGCACCG T</p>
Cytochrome b	ID: 3523617	Cytochrome b er en subenhet av cytokrom bc1. Det er et mitokondrielt respiratorisk enzym som spenner over den mitokondrielle membranen med 8 transmembran-spiraler hos eukaryote celler (2).	<p>Primerpair 3: Forward: CCGCATGATATGGTCTACG G Reverse: GGGTGGAACCTTTGGGTCTTT</p>
ATP synthase F0 subunit 6	ID: 3523613	ATP-synthase F0, subenhet 6 er en subenhet av F0, som er en subenhet av enzymkomplekset ATP-synthase som syntetiserer ATP fra ADP (3).	<p>Primerpair 4: Forward: TAGTGAAGGGGCAGGGTTT A Reverse: CACACAGATGTGCCTACTCC</p>

Tabell 14: Oversikt over teoretiske parametere til ferdigdesignede primere.

Gennavn	Lengde på amplikon	Sekvens (5`->3`)	T _m - verdi	Antall nukleotid	GC %
Primerpar 1					
Cytochrome c oxidase subunit I	170	Forward: TTCGGGAGTTTTTCACTCCG	58,13 °C	20	50%
		Reverse: ATTGGCATTGCCCCACTAA	58,05 °C	20	45%
Primerpar 2					
Cytochrome c oxidase subunit I	114	Forward: GGGCTTCAGTAGATTTGCG	57,17 °C	19	50%
		Reverse: CTAAAAGTCCCAAGCACCGT	58,11 °C	20	50%
Primerpar 3					
Cytochrome b	126	Forward: CCGCATGATATGGTCTACGG	58,00 °C	20	55%
		Reverse: GGGTGGAAC TTTGGGTCTTT	57,92 °C	20	50%
Primerpar 4					
ATP synthase F0 subunit 6	109	Forward: TAGTGAAGGGGCAGGGTTTA	57,95 °C	20	50%
		Reverse: CACACAGATGTGCCTACTCC	57,98 °C	20	55%

Kilder:

1. Conserved domains on [gi|71647024|ref|YP_271852|]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology. Accession No. YP_271852.1, cytochrome c oxidase subunit I [*Lepeophtheirus salmonis*]. [Internett]. [hentet januar 2021]; Tilgjengelig fra:
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?seqinput=YP_271852.1

2. Conserved domains on [gi|71647027|ref|YP_271856|]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology. Accession No. YP_271856.1, cytochrome b [Lepeophtheirus salmonis]. [Internett]. [hentet januar 2021]; Tilgjengelig fra:
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?seqinput=YP_271856.1
3. Walker J. SUBUNIT COMPOSITION OF ATP SYNTHASE. Mitochondrial Biology Unit. [Internett]. 2015 [hentet januar 2021]; <http://www.mrc-mbu.cam.ac.uk/projects/2679/subunit-composition>

Vedlegg 4: Resultater

Tabell 15: volum og temperaturoptimalisering

Prøve	Cq-verdi	T_m -verdi
P1 - 1 µl	No Cq	67.5
P1 - 1 µl (parallell)	No Cq	67.5
P1 - 1 µl (parallell)	No Cq	65
P1 - 2 µl	16.23	78.5
P1 - 2 µl (parallell)	No Cq	67.5
P1 - 2 µl (parallell)	15.17	79
P1 - 3 µl	No Cq	67.5
P1 - 3 µl (parallell)	14.89	79
P1 - 3 µl (parallell)	14.98	79
P2 - 1 µl	14.5	79.5
P2 - 1 µl (parallell)	18.59	77
P2 - 1 µl (parallell)	21.78	77.5
P2 - 2 µl	No Cq	78.5
P2 - 2 µl (parallell)	17.68	77
P2 - 2 µl (parallell)	17.76	77.5
P2 - 3 µl	24.43	77.5
P2 - 3 µl (parallell)	17.1	77
P2 - 3 µl (parallell)	37.26	78.5
P3 - 1 µl	17.44	77
P3 - 1 µl (parallell)	22.56	78
P3 - 1 µl (parallell)	16.3	77.5
P3 - 2 µl	35.5	78
P3 - 2 µl (parallell)	15.71	77.5
P3 - 2 µl (parallell)	15.18	77.5
P3 - 3 µl	15.58	77
P3 - 3 µl (parallell)	15.03	77
P3 - 3 µl (parallell)	No Cq	73
P4 - 1 µl	15	77
P4 - 1 µl (parallell)	No Cq	84.5
P4 - 1 µl (parallell)	24	76.5
P4 - 2 µl	37.72	83
P4 - 2 µl (parallell)	15.41	76
P4 - 2 µl (parallell)	No Cq	77
P4 - 3 µl	15.4	76
P4 - 3 µl (parallell)	34.56	82.5
P4 - 3 µl (parallell)	35.92	81.5
NTC	30.65	76
NTC	No Cq	71.5
NTC	No Cq	72
NTC	No Cq	67.5
NTC	No Cq	86
NTC	No Cq	86

NTC	No Cq	71.5
NTC	No Cq	95
NTC	No Cq	86.5
NTC	No Cq	84
NTC	34.72	76.5
NTC	No Cq	73.5
NTC	No Cq	92
NTC	No Cq	67.5
NTC	No Cq	67
NTC	No Cq	87
NTC	No Cq	83
NTC	No Cq	67
NTC	No Cq	65
NTC	No Cq	73
NTC	33.24	75.5
NTC	No Cq	84.5
NTC	No Cq	83.5
NTC	17.83	75

Tabell 16: Oversikt over optimalisering av primerkonsentrasjoner for primerpar 2

Prøve	Konsentrasjon forward primer	Konsentrasjon reverse primer	Cq- verdi	T_m - verdi
1	300	300	20.76	75.0
1 (parallell)	300	300	19.91	77.0
2	300	400	26.64	73.5
2 (parallell)	300	400	No Cq	74.5
3	300	500	No Cq	77.0
3 (parallell)	300	500	19.07	76.5
4	300	600	18.73	76.5
4 (parallell)	300	600	20.00	76.0
5	400	300	19.94	77.0
5 (parallell)	400	300	19.59	77.0
6	400	400	17.92	77.0
6 (parallell)	400	400	20.02	77.0
7	400	500	18.69	77.0
7 (parallell)	400	500	18.60	77.0
8	400	600	17.69	77.0
8 (parallell)	400	600	25.32	77.0
9	500	300	19.91	77.0
9 (parallell)	500	300	19.85	77.0
10	500	400	18.54	77.0
10 (parallell)	500	400	18.61	77.0
11	500	500	17.92	77.0
11 (parallell)	500	500	17.81	77.0
12	500	600	17.69	77.0
12 (parallell)	500	600	17.10	77.0
13	600	300	19.81	77.0
13 (parallell)	600	300	19.58	77.0
14	600	400	17.74	77.0
14 (parallell)	600	400	22.98	77.0
15	600	500	No Cq	78.5
15 (parallell)	600	500	No Cq	92.5
16	600	600	No Cq	88.0
16 (parallell)	600	600	No Cq	77.5
NTC	300	300	No Cq	90.0
NTC	300	300	No Cq	76.5
NTC	400	400	No Cq	81.5
NTC	400	400	No Cq	87.0
NTC	500	500	No Cq	76.5
NTC	500	500	No Cq	85.0
NTC	600	600	No Cq	73.0
NTC	600	600	No Cq	86.5

Tabell 17: Oversikt over optimalisering av primerkonsentrasjoner for primerpar 3

Prøve	Konsentrasjon forward primer	Konsentrasjon rwd primer	Cq-verdi	T_m - verdi
1	300	300	No Cq	77.5
1 (parallell)	300	300	16.67	81.0
2	300	400	17.14	77.5
2 (parallell)	300	400	17.15	77.5
3	300	500	16.73	77.5
3 (parallell)	300	500	16.01	77.5
4	300	600	16.03	77.5
4 (parallell)	300	600	16.40	77.0
5	400	300	No Cq	77.5
5 (parallell)	400	300	15.78	78.0
6	400	400	No Cq	77.5
6 (parallell)	400	400	15.92	77.5
7	400	500	15.76	77.5
7 (parallell)	400	500	No Cq	79.0
8	400	600	No Cq	77.5
8 (parallell)	400	600	15.26	77.5
9	500	300	15.16	77.0
9 (parallell)	500	300	20.24	77.5
10	500	400	No Cq	77.0
10 (parallell)	500	400	No Cq	84.0
11	500	500	15.65	77.5
11 (parallell)	500	500	No Cq	77.0
12	500	600	15.27	77.0
12 (parallell)	500	600	15.40	77.5
13	600	300	15.24	75.5
13 (parallell)	600	300	15.54	77.0
14	600	400	16.15	75.5
14 (parallell)	600	400	15.55	77.0
15	600	500	14.92	77.0
15 (parallell)	600	500	15.01	77.0
16	600	600	15.25	77.0
16 (parallell)	600	600	14.88	77.0
NTC	300	300	No Cq	87.0
NTC	300	300	No Cq	87.0
NTC	400	400	No Cq	86.5
NTC	400	400	No Cq	88.0
NTC	500	500	No Cq	88.0
NTC	500	500	No Cq	86.0
NTC	600	600	No Cq	95.0
NTC	600	600	No Cq	95.0

Tabell 18: Oversikt over standardkurve (P = Primerpar, F = Fortynning)

Prøve	C_q-verdi	T_m-verdi
DNA - P2	18.12	77
DNA - P2	18.71	77
DNA - P2	19.76	77.5
DNA - P3	15.78	77.5
DNA - P3	15.78	77.5
DNA - P3	15.67	77.5
F1 - P2	20.6	78
F1 - P2	20.39	78
F1 - P2	20.79	78
F1 - P3	18.74	78.5
F1 - P3	18.6	78.5
F1 - P3	18.71	78.5
F2 - P2	25.55	77.5
F2 - P2	24.78	77
F2 - P2	No C _q	83
F2 - P3	22.91	77.5
F2 - P3	22.67	77.5
F2 - P3	22.57	77.5
F3 - P2	29.38	78
F3 - P2	29.79	78
F3 - P2	29.03	78
F3 - P3	27.29	78
F3 - P3	27.28	78
F3 - P3	27.29	78
F4 - P2	33.93	78
F4 - P2	33.97	78
F4 - P2	34.82	70
F4 - P3	30.9	78.5
F4 - P3	30.59	78.5
F4 - P3	30.72	78.5
F5 - P2	No C _q	78.5
F5 - P2	No C _q	78
F5 - P2	No C _q	81
F5 - P3	No C _q	78.5
F5 - P3	No C _q	81.5
F5 - P3	No C _q	78.5
NTC - P2	No C _q	85
NTC - P2	No C _q	85.5
NTC - P2	No C _q	85.5
NTC - P3	No C _q	86.5
NTC - P3	No C _q	86.5
NTC - P3	No C _q	83

Tabell 19: Prøveoversikt over analyse 1, primerpar 2

Prøve	Algeart	Cq-verdi	T_m - verdi
Prøve 1 (2 lus, 1 107 000 alger)	<i>T. subcordiformis</i>	22.92	77.0
Prøve 1, parallell	<i>T. subcordiformis</i>	23.13	77.5
Prøve 2 (10 lus, 1 107 000 alger)	<i>T. subcordiformis</i>	20.97	77.5
Prøve 2, parallell	<i>T. subcordiformis</i>	20.86	77.5
Prøve 3 (2 lus, 1 111 600 alger)	50% <i>T. subcordiformis</i> + 50% <i>I. galbana</i>	23.16	77.0
Prøve 3, parallell	50% <i>T. subcordiformis</i> + 50% <i>I. galbana</i>	23.11	77.0
Prøve 4 (10 lus, 1 111 600 alger)	<i>I. galbana</i>	20.82	77.5
Prøve 4, parallell	<i>I. galbana</i>	20.79	77.5
Prøve 5 (2 lus, 11 003 200 alger)	<i>I. galbana</i>	22.83	77.5
Prøve 5, parallell	<i>I. galbana</i>	22.80	77.5
Prøve 6 (2 lus, 11 003 200 alger)	50% <i>T. subcordiformis</i> + 50% <i>I. galbana</i>	23.75	77.5
Prøve 6, parallell	50% <i>T. subcordiformis</i> + 50% <i>I. galbana</i>	23.90	77.5
Negativ kontroll (0 lus, 11 116 000 alger)	50% <i>T. subcordiformis</i> + 50% <i>I. galbana</i>	No Cq	85.0
Negativ kontroll, parallell	50% <i>T. subcordiformis</i> + 50% <i>I. galbana</i>	No Cq	74.0
Positiv kontroll (20 lus, 11 116 000 alger)	Ingen	18.65	77.5
Positiv kontroll, parallell	Ingen	18.49	77.0
NTC 1	Ingen	No Cq	85.5
NTC 2	Ingen	No Cq	86.5

Tabell 20: Prøveoversikt over analyse 1, primerpar 3

Prøve	Algeart	Cq-verdi	T_m - verdi
Prøve 1 (2 lus, 1 107 000 alger)	<i>T. subcordiformis</i>	19.91	77.0
Prøve 1, parallell	<i>T. subcordiformis</i>	19.92	77.0
Prøve 2 (10 lus, 1 107 000 alger)	<i>T. subcordiformis</i>	17.34	77.0
Prøve 2, parallell	<i>T. subcordiformis</i>	17.73	77.0
Prøve 3 (2 lus, 1 111 600 alger)	50% <i>T. subcordiformis</i> + 50% <i>I. galbana</i>	19.84	77.0
Prøve 3, parallell	50% <i>T. subcordiformis</i> + 50% <i>I. galbana</i>	19.82	77.0
Prøve 4 (10 lus, 1 111 600 alger)	<i>I. galbana</i>	17.83	77.5
Prøve 4, parallell	<i>I. galbana</i>	17.82	77.5
Prøve 5 (2 lus, 11 003 200 alger)	<i>I. galbana</i>	19.83	77.0
Prøve 5, parallell	<i>I. galbana</i>	19.85	77.0
Prøve 6 (2 lus, 11 003 200 alger)	50% <i>T. subcordiformis</i> + 50% <i>I. galbana</i>	20.64	77.0
Prøve 6, parallell	50% <i>T. subcordiformis</i> + 50% <i>I. galbana</i>	20.61	77.0
Negativ kontroll (0 lus, 11 116 000 alger)	50% <i>T. subcordiformis</i> + 50% <i>I. galbana</i>	No Cq	85.0
Negativ kontroll, parallell	50% <i>T. subcordiformis</i> + 50% <i>I. galbana</i>	No Cq	79.5
Positiv kontroll (20 lus, 11 116 000 alger)	Ingen	15.42	77.0
Positiv kontroll, parallell	Ingen	15.35	77.0
NTC 1	Ingen	No Cq	83.5
NTC 2	Ingen	No Cq	84.0

Tabell 21: Prøveoversikt over analyse 2, primerpar 2

Prøve	Algeart	Cq-verdi	T_m - verdi
Prøve 1 (2 lus, 10 000 alger)	<i>T. subcordiformis</i>	21.61	77.5
Prøve 1, parallell	<i>T. subcordiformis</i>	21.66	77.5
Prøve 2 (10 lus, 10 000 alger)	<i>T. subcordiformis</i>	19.55	77.5
Prøve 2, parallell	<i>T. subcordiformis</i>	19.34	77.5
Prøve 3 (2 lus, 200 000 alger)	50% <i>T. subcordiformis</i> + 50% <i>I. galbana</i>	17.76	77.5
Prøve 3, parallell	50% <i>T. subcordiformis</i> + 50% <i>I. galbana</i>	17.69	77.0
Prøve 4 (10 lus, 200 000 alger)	<i>I. galbana</i>	20.98	77.0
Prøve 4, parallell	<i>I. galbana</i>	21.76	77.0
Prøve 5 (2 lus, 100 000 alger)	<i>I. galbana</i>	21.31	77.5
Prøve 5, parallell	<i>I. galbana</i>	20.73	77.5
Prøve 6 (2 lus, 100 000 alger)	50% <i>T. subcordiformis</i> + 50% <i>I. galbana</i>	22.75	77.5
Prøve 6, parallell	50% <i>T. subcordiformis</i> + 50% <i>I. galbana</i>	22.73	77.5
Negativ kontroll (0 lus, 100 000 alger)	50% <i>T. subcordiformis</i> + 50% <i>I. galbana</i>	31.13	78.0
Negativ kontroll, parallell	50% <i>T. subcordiformis</i> + 50% <i>I. galbana</i>	31.03	78.0
Positiv kontroll (20 lus, 0 alger)	Ingen	17.92	77.0
Positiv kontroll, parallell	Ingen	17.80	77.5
NTC 1	Ingen	No Cq	82.5
NTC 2	Ingen	No Cq	87.0
NTC 3	Ingen	No Cq	81.0

Tabell 22: Prøveoversikt over analyse 2, primerpar 3

Prøve	Algeart	Cq-verdi	T_m - verdi
Prøve 1 (2 lus, 10 000 alger)	<i>T. subcordiformis</i>	19.30	77.5
Prøve 1, parallell	<i>T. subcordiformis</i>	18.86	77.5
Prøve 2 (10 lus, 10 000 alger)	<i>T. subcordiformis</i>	16.03	77.5
Prøve 2, parallell	<i>T. subcordiformis</i>	16.80	77.5
Prøve 3 (2 lus, 200 000 alger)	50% <i>T. subcordiformis</i> + 50% <i>I. galbana</i>	15.94	77.5
Prøve 3, parallell	50% <i>T. subcordiformis</i> + 50% <i>I. galbana</i>	15.86	77.5
Prøve 4 (10 lus, 200 000 alger)	<i>I. galbana</i>	18.53	77.0
Prøve 4, parallell	<i>I. galbana</i>	18.82	77.5
Prøve 5 (2 lus, 100 000 alger)	<i>I. galbana</i>	18.89	77.5
Prøve 5, parallell	<i>I. galbana</i>	18.05	77.5
Prøve 6 (2 lus, 100 000 alger)	50% <i>T. subcordiformis</i> + 50% <i>I. galbana</i>	19.86	77.5
Prøve 6, parallell	50% <i>T. subcordiformis</i> + 50% <i>I. galbana</i>	20.08	77.5
Negativ kontroll (0 lus, 100 000 alger)	50% <i>T. subcordiformis</i> + 50% <i>I. galbana</i>	28.66	76.5
Negativ kontroll parallell	50% <i>T. subcordiformis</i> + 50% <i>I. galbana</i>	28.49	78.0
Positiv kontroll (20 lus, 0 alger)	Ingen	15.50	77.5
Positiv kontroll, parallell	Ingen	15.50	77.5
NTC 1	Ingen	No Cq	82.0
NTC 2	Ingen	No Cq	79.5
NTC 3	Ingen	No Cq	85.0

Vedlegg 5: Prosedyre for telling av alger med mikroskop

1. Hensikt

Hensikten med denne prosedyren er å gi et estimat på konsentrasjonen av alger i en prøve.

2. Omfang

I denne prosedyren skal algeprøver tas ut fra hovedkultur, drepes og telles på mikroskop for benyttelse i forsøket.

3. Bakgrunnsinformasjon

For at forsøket skal ha en mest mulig nøyaktig representasjon av forholdet mellom lakseluslarver og alger er det viktig at algene telles på riktig måte. Et tellekammer gir et estimat på antallet alger i prøven, som benyttes i vurderingen av sensitiviteten og spesifisiteten til metoden. Metoden som benyttes for telling i dette forsøket er telling med Bürker tellekammer.

4. Utstyr og reagenser

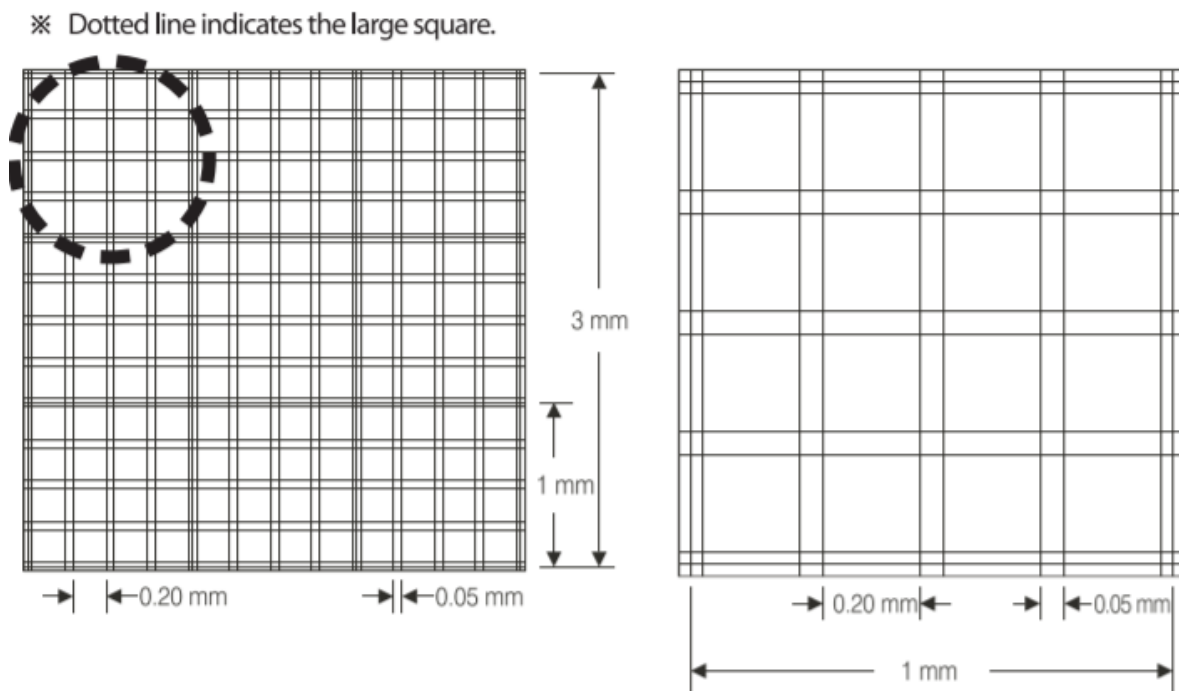
- Lugols jodløsning
- Algeprøver
- Erlenmeyerkolbe eller begerglass
- Glasspipette/automatpipette
- Pipettespisser
- Bürker tellekammer (C-chip DHC-B01)
- Mikroskop
- Håndteller
- Aluminiumsfolie
- Gassbrenner

- Hansker

5. Analyseprinsipp

Det er i hovedsak 2 prinsipper som benyttes i forsøket. Lugols jodløsning er et mye brukt reagens både i medisinsk sammenheng og fikseringssammenheng. Løsningen immobiliserer alger og andre mikroorganismer ved å gjøre de tyngre (1 s. 220). Lugols jodløsning vil farge mikroorganismer med stivelse i membranen som er viktig når det skal utføres identifisering (2). Et alternativ til Lugols er blant annet formaldehyd, men dette anvendes hovedsakelig ikke grunnet potensielle helseskader (3).

C-chipen består av 2 separate tellekammer. Hvert tellekammer har en hovedrute på 3*3 mm som er delt inn i ni ruter på 1*1 mm hver. Dybden til kammeret er på 0,1 mm. En rute vil derfor være $1*1*0,1 \text{ mm} = 0,1\text{mm}^3 = 0,0001\text{mL}$. Antallet celler multipliseres derfor med 10 000 for endelig utregning (antall celler per mL) (4). Se figur 9.



Grid pattern of DHC-B01

Figur 10: oversikt over Bürker tellekammer. (5).

6. Kvalitetskontroll

Kvalitetssikring i dette forsøket kan utføres ved at det telles flere ganger og eventuelt flere personer. Dette bekrefter at tallene stemmer overens. Hver hovedrute deles inn i ni der tre av rutene telles. Gjennomsnittet til rutene beregnes. Om noen av rutene mistenkes å ikke være representative for algepopulasjonen, justeres dette ved å telle flere ruter eller unngå å telle gjeldende rute.

7. Formler

Fortynningsformelen:

$$\text{Formel 1: } C1 * V1 = C2 * V2$$

$$C1 = 1000 \text{ alger}$$

$$V1 = 1 \text{ mL}$$

$$C2 = \text{Telt mengde alger}$$

$$V2 = \text{Nødvendig mengde}$$

Utrekning av konsentrasjon:

En rute har et volum på $0,1 \text{ mm}^3$. Dette tilsvarer $0,0001 \text{ mL}$. Volumefaktor settes opp som $\frac{\text{Original volume (ml)}}{\text{New volume (ml)}}$ og blir da 1 mL delt på $0,0001 \text{ mL}$ som gir oss en volume factor på $10\,000$.

$$\text{Formel 2: } \frac{\text{Gjennomsnitt av 3 ruter}}{0.0001\text{ml}}$$

8. Fremgangsmåte

Forberedelser:

1. Algekulturer oppbevares på rister med tilgang til oksygen
2. Mikroskop må testes og kjølerinnstilles om nødvendig.
3. Jobb så sterilt som mulig da algeprøvene skal være med videre i forsøket. Brenn av åpningen på kolben/glasset ved hver overføring dersom gassbrenner er tilgjengelig.

Metode:

1. Ta ut algeprøver (en fra grønnalger, en fra gulalger og en med blanding) i erlenmeyerkolber/begerglass
2. Homogeniser og hent ut x mL av prøvene over i tre nye erlenmeyerkolber/begerglass.
3. Plasser aluminiumsfolie over de tre første løsningene til bruk i DNA-isolering.
4. Deretter benyttes følgende steg for hver av de nye løsningene:
 - a. Tilsett et par dråper jodløsning til algeløsningen
 - b. Homogeniser løsningen ved lett sirkulær bevegelse av kolben/glasset.
 - c. Benytt glasspipette eller automatpipette til å ekstrahere et lite volum av løsningen. Her er det viktig å jobbe raskt etter homogenisering, slik at algene ikke sedimenterer.
 - d. Plasser volumet på åpningene av Bürker tellekammeret slik at volumet fyller kammeret.
 - e. Plasser tellekammeret i mikroskopet.
 - f. Finn en passende ansamling av alger innenfor rutenettet og benytt håndteller til å telle 3-4 ruter. Skriv ned tallet for hver rute.
 - g. Regn ut gjennomsnittet av rutene telt og multipliser med 10 000 for alger per mL.
5. Regn ut hvor stort volum som trengs, ved hjelp av fortynningsformelen, for ønsket antall alger. Pipetter dette volumet over i eppendorfrør sammen med lakseluslarvene, som nå er klare for DNA-isolering.

9. Feilkilder

- Feil ved pipettering
- Forurensning/Kontaminering
- Ufullstendig homogenisering eller aggregering i prøveløsningen
- Menneskelige feil ved telling
- Inhomogent uttak og overføring av alger

10. Resultatvurdering

Det er viktig at tellingen blir utført etter fastsatt prosedyre, da resultatet benyttes til blant annet å vurdere spesifisiteten til metoden. Om mengden alger virker mistenkelig bør prosedyren gjentas, eventuelt av en tredjepart. Dette utelukker menneskelige feil.

11. Kilder

1. Bartram J, Rees G, red. Monitoring Bathing Waters - A Practical Guide to the Design and Implementation of Assessments and Monitoring Programmes. 11 New Fetter Lane, London: E & FN Spon; 2000
2. Graham L. PRESERVATION OF ALGAL SAMPLES [Internett]. Wisconsin: University of Wisconsin-Madison; 1976 [hentet 15. April 2021]. Tilgjengelig fra: https://courses.botany.wisc.edu/botany_330/preservation.html
3. Williams O, Beckett R, Maxwell D. Marine phytoplankton preservation with Lugol's: a comparison of solutions. Journal of Applied Phycology. 2016/06/01; 28(3):3.
4. C-Chip Instructions. [Internett] Sør-Korea: NanoEntek; 2013 [Hentet 15. April 2021]. Tilgjengelig fra: http://nanoentek.com/bbs/file_download.php?it_id=1547539282&wr_id=140&bf_no=1

Vedlegg 6: Prosedyre for DNA-isolering

1. Hensikt

Hensikten med denne prosedyren er å isolere ut mest mulig DNA fra lakseluslarver og/eller alger.

2. Omfang

I denne prosedyren skal DNA isoleres, amplifiseres og renses fra lakseluslarver og/eller alger for å resultere i rent DNA i buffer.

3. Bakgrunnsinformasjon

For at det skal kjøres PCR, må vi ha tilgang til DNA som befinner seg i cellene. For å isolere dette DNA-et, må først cellemembranen brytes opp. Dette fører til at cellene lyses og DNA blir tilgjengelig. Det er også viktig å bryte ned proteinene i cellene. Dette gjør at proteinene i cellen ikke degraderer det frigjorte DNA-et. Til slutt må uønskede kontaminanter fra cellen vaskes ut, slik at resultatet er rent DNA. Dette DNA-et må oppbevares i en stabil løsning (1).

4. Utstyr og reagens

- Lakseluslarver
- Eppendorfsentrifuge
- Mikrosentrifuge
- Vortexer
- Pipettespisser
- Automatpipetter
- Eppendorf-rør
- RNase-fritt vann

DNeasy kit (2):

- Buffer ATL
- Proteinkinase K
- AL buffer
- Etanol 96%
- DNeasy Mini Spin Column
- Collection Tubes
- Buffer AW1
- Buffer AW2
- Buffer AE

5. Analyseprinsipp

Ved lysering av cellene vil DNA-et felle ut. Samtidig vil komponenter og organeller i cellen brytes ned (3). Det benyttes ATL-buffer i kombinasjon med proteinkinase K for å gjøre dette. ATL-buffer er en buffer som inneholder natriumdodecylsulfat (SDS). Dette er en detergent som reduserer overflatespenningen ved å bryte de ikke-kovalente bindingene i proteinene, slik at disse kan hjelpe til med optimalisering av lysering (4). Proteinase K ødelegger proteiner som kan forurense. Når ATL-bufferen og proteinkinase K jobber sammen, vil disse gi optimal lysering av cellemembranen (5). Videre brukes AL-buffer, en annen lyseringsbuffer som bryter ned lipidlaget i cellemembranen. Bufferen inneholder det kaotropiske middelet guanidiniumklorid (CH_6ClN_3), en veldig sterk denaturant (6). Den degraderer proteiner og andre komponenter i cellen, som for eksempel endoplasmatisk retikulum (ER) og membranlipider (7).

Hovedsakelig fungerer etanol som et vaskemiddel, for å fjerne salter. Etanol fungerer også som et løsemiddel. Etanol gjør at DNA-et ikke løser seg opp i blandingen. Dette skjer fordi etanol har dårlig evne til å skille positive og negative ladninger. I tillegg har etanol evnen til å danne binding med vann, som reduserer vannmolekyler som DNA-et kan løse seg i. Siden DNA er negativt fører til at DNA-et aggregerer i bunnen med de positive ionene, som natrium og kalium. Dette konsentrerer DNA-et og skiller det fra andre kontaminanter i løsningen (8).

For at DNA-isolasjonen skal gi optimale resultater må det gjennom en renseprosess. En spinkolonne inneholder en silicamembran, der negativt ladet DNA-et absorberes av membranens positive ladning. DNA-et blir holdt igjen i spinkolonnen, mens mulige kontaminanter passerer gjennom filteret og blir samlet opp i et samlerør (9). I vasketrinnene benyttes AW1 og AW2 buffer, vaskebufferer som denaturerer proteiner (4).

For at DNA-et skal løsne fra spinkolonmembranen benyttes AE-buffer, en elueringsbuffer. Denne inneholder etylendiamintetaacetat (EDTA). EDTA har lav ionisk styrke for at DNA-et skal slippe tak i membranen. EDTA binder seg også til metallioner i enzymer, slik at disse deaktiveres, som reduserer aktiviteten til DNase og RNase (10).

6. Kvalitetskontroll

Kvalitetssikring gjøres ved å sjekke om prøvene inneholder DNA. Dette kan gjøres på ulike måter. Eksempelvis kan resultatet sammenlignes med en positiv og negativ kontroll i et qPCR-assay. Det kan også benyttes Qubit, som måler kvantitativt mengden av DNA i prøven.

7. Fremgangsmåte

Forberedelser:

1. Lakseluslarvene oppbevares i fryseren. Disse tines i ca. 1 time før bruk. Unngå mye tining og frysing.
2. Vaskebuffer AW1 og AW2 kommer konsentrert i DNeasy kitet. Ved første bruk må disse fortynnes med etanol (96%) etter standarden til kitet.
3. Vær obs på at ATL-buffer og AL-buffer kan danne utfelling. Ved utfelling må disse varmes opp til 56 grader til utfellingen har løst seg opp igjen.

Metode(2):

1. Tilsett kjent antall lus (det ble benyttet 2, 10 og 20 lus) og/eller kjent konsentrasjon av alger i eppendorfrør.
2. Sentrifuger prøvene i 3,5 minutter ved 16,4 rcf og fjern eventuell supernatant.
3. Tilsett 180 µl ATL buffer og 20 µl proteinase K. Vortex miksen godt i rundt 15 sek.

4. Inkuber ved 56 grader i 1,5 time. Vortex rørene innimellom for å gi mekanisk belastning.
5. Tilsett 200 µl med AL buffer og vortex godt. Inkuberes i 10 min på 56 grader.
6. Tilsett 200 µl etanol (96%) og vortex godt.
7. Tilsett mixen i DNeasy Mini Spin Column og plasser i en collection tube. Sentrifuger i 1 min på 8000 rpm. Ta vare på spinkolonnen og kast collection tube med væske.
8. Sett DNeasy Mini Spin Column i en ny collection tube og tilsett 500 µl AW1 buffer. Sentrifuger i 1 min på 8000 rpm. Ta vare på spinkolonnen og kast collection tube med væsken.
9. Sett DNeasy Mini Spin Column i en ny collection tube og tilsett 500 µl AW2 buffer. Sentrifuger i 3 min på 14 000 rpm. Ta vare på spinkolonnen og kast collection tube med væsken.
10. Sett DNeasy Mini spin column i et eppendorfrør med lokk og tilsett 100 µl AE buffer. Inkuber i 1 minutt i romtemperatur. Sentrifuger i 1 min på 8000 rpm.
11. Gjenta trinn 10 med samme spinkolonne og eppendorfrør.

8. Feilkilder

- Feil ved pipettering
- Feil fortykning av vaskebuffer
- Forurensning/Kontaminering
- Utfelling i ATL og AL buffer

9. Resultatvurdering

Det er viktig at de ulike trinnene i DNA-isoleringen følges for å få optimale resultater. Lyseringen må ha nok tid til å bryte opp og degradere det nødvendige, slik at DNA gjøres tilgjengelig. Under pipettering er det viktig å bruke riktige volum. Når DNA er ferdig eluert kan resultatet testes med Qubit og/eller i PCR mot kontroller.

10. Kilder

1. Heikrujam J., Kishor R., Mazumder P. B. The Chemistry Behind Plant DNA Isolation Protocols. Biochemical Analysis Tools - Methods for Bio-Molecules Studies. [Internett]. 19. mai 2009 [hentet 19 april 2021]; Tilgjengelig fra: <https://www.intechopen.com/books/biochemical-analysis-tools-methods-for-bio-molecules-studies/the-chemistry-behind-plant-dna-isolation-protocols>
2. QIAGEN. DNeasy ® Blood & Tissue Handbook. July 2020. Tilgjengelig fra: <https://www.qiagen.com/lu/resources/resourcedetail?id=68f29296-5a9f-40fa-8b3d-1c148d0b3030&lang=en>
3. DNA extraction. Science Learning Hub. [Internett]. 18 juni 2009 [hentet 18 april 2021]. Tilgjengelig fra: <https://www.sciencelearn.org.nz/resources/2036-dna-extraction>
4. DNA extraction lab. Vanderbilt University. [Internett]. 19 juni 2019 [hentet 18 april 2021]. Tilgjengelig fra: https://cdn.vanderbilt.edu/vu-wp0/wp-content/uploads/sites/267/2019/06/19164057/Lab2_DNA_19June2019.pdf
5. Proteinkinase K. Sigma-Aldrich Inc. Merck. [Internett]. [hentet 18 april 2021]. Tilgjengelig fra: <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/analytical-enzymes/proteinase-k.html>
6. Laboratory Safety Guideline. Harvard Campus Services. [Internett]. 2019 [oppdatert 28 februar 2020; hentet 18 april 2021]. Tilgjengelig fra: https://www.ehs.harvard.edu/sites/default/files/lab_safety_guideline_qiagen_kits_0.pdf
7. Guanidium chloride. Sigma-Aldrich Inc. Merck [Internett]. [hentet 18 april 2021]. Tilgjengelig fra: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/mm/104220?lang=en®ion=NO>
8. John Brennan. What Does Ethanol Do in a DNA Extraction?. Sciencing. [Internett]. 26. april 2018 [hentet 18 april 2021]. Tilgjengelig fra: <https://sciencing.com/ethanol-do-dna-extraction-8336005.html>
9. Vandeventer PE, Mejia J, Nadim A, Johal MS, Niemz A. DNA adsorption to and elution from silica surfaces: influence of amino acid buffers. NCBI. [Internett]. 4. september 2013 [hentet 18 april 2021];117(37):10742-10749. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1021/jp405753m>
10. Dr Tushar Chauhan. Importance of Tris-EDTA (TE) Buffer in DNA Extraction. Genetic education. [Internett]. 23 desember 2018 [hentet 18 april 2021]. Tilgjengelig fra: <https://geneticeducation.co.in/importance-of-tris-edta-te-buffer-in-dna-extraction/>

Vedlegg 7: Prosedyre for DNA-konsentrasjonsmåling med Qubit

1. Hensikt

Hensikten med denne prosedyren er å kvantitativt måle og påvise dsDNA isolert fra lakseluslarver og/eller alger.

2. Omfang

I denne prosedyren skal Qubit 2.0 fluorometer kalibreres og dsDNA fra lakseluslarver og/eller alger skal måles.

3. Bakgrunnsinformasjon

For å sikre at DNA-isoleringen har gitt resultater, vil måling med Qubit fungere som en kvalitetskontroll. Kvalitetssikring kan gjøres ved å sjekke om resultatene inneholder DNA.

For å måle andelen dsDNA benyttes Qubit 2.0 fluorometer. Qubit måler mengden DNA ved å detektere fluorescerende fargestoff (1).

4. Utstyr og reagens

- Qubit 1x dsDNA HS Assay kit:
 - Working solution
 - Standard 1
 - Standard 2
- Qubit 2.0 fluorometer
- Qubitrør
- Prøvemateriale
- Automatpipette
- Pipettespisser

5. Analyseprinsipp

Prinsippet går ut på å benytte fluorescerende fargestoff som er spesifikt bundet til molekyler (DNA, RNA, cDNA osv) og som vil emittere fluorescerende signal. Ved kvantifisering av DNA benyttes Qubit-fluorometere med detektorer som detekterer dette lyset (1).

Qubit 2.0 fluorometeret måler blant annet dsDNA og kan også brukes som en påvisningsmetode for DNA. Da benyttes for eksempel Quant-iT 1x dsDNA HS Assay kit. Dette er et høyt sensitivt kit for dsDNA. Dette kitet inneholder standard 1 og standard 2 som brukes til kalibrering av Qubit-fluorometeret. Standardene er kjente konsentrasjoner av DNA. Working solution er en buffer og benyttes sammen med DNA, standard 1 og standard 2 (2).

6. Kvalitetskontroll

Det kalibreres med standard 1 og standard 2 før prøvene blir målt.

7. Fremgangsmåte

Kalibrering:

1. Tilsett 190 μL working solution i 2 qubitrør
2. Tilsett 10 μL av standard 1 i det ene qubitrøret, vortex røret, inkuber i 2 minutt og plasser i Qubit.
3. På displayet på Qubit trykk “Quant-iT dsDNA HS”, “run new calibration” og “GO”
4. Tilsett 10 μL av standard 2 i det andre qubitrøret, vortex røret, inkuber i 2 minutt og plasser i Qubit. Trinn 3 gjentas.

Måling av DNA-prøvene:

1. Tilsett 198 μL working solution i qubitrør
2. Tilsett 2 μL av DNA fra prøverør. Vortex og plasser i Qubit. Trykk “GO”

3. Regn om konsentrasjonen ved å ta QF-verdien $\cdot 200/x$, der QF-verdien er verdien fra Qubit-fluorometeret, og x er mengden prøve i μL (3).

8. Feilkilder

- Feil ved pipettering
- Forurensning/Kontaminering
- Feil konsentrasjon
- Feil ved DNA-isolering
- Instrumentelle feil

9. Resultatvurdering

Resultatene leses av på instrumentets display. Inkuberingen må skje i romtemperatur slik at reaksjonen får tid til å virke. Det er viktig at standard 1 og standard 2 benyttes i kalibreringen.

10. Kilder

1. Qubit Assays. ThermoFischer Scientific [Internett]. Waltham; 2011 [hentet 10 april 2021]. Tilgjengelig fra:
<https://www.thermofisher.com/no/en/home/references/newsletters-and-journals/bioprobes-journal-of-cell-biology-applications/bioprobes-issues-2011/bioprobes-64-april-2011/the-qubit-2-0-fluorometer-april-2011.html>
2. Qubit dsDNA HS Assay. Thermofischer Scientific [Internett]. Waltham; 5 mars 2015 [hentet 23 april 2021]. Tilgjengelig fra: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/Qubit_dsDNA_HS_Assay_UG.pdf
3. Qubit Fluorometer. Invitrogen [Internett] Carlsbad; 2007 [hentet 22 april 2021]. Tilgjengelig fra:
http://fg.cns.utexas.edu/fg/research_archive_of_manuals_files/qubit.pdf?fbclid=IwAR1_r2HwmajAwpCTKLQ7InOzfamyCzO_pvI0o-RaUcyi0JsdyZJ5F1_v5Fo

Vedlegg 8: Prosedyre for optimalisering av volum- og temperatur for qPCR

1. Hensikt

Hensikten med prosedyren er å optimalisere volum av templat-DNA og annealingtemperatur.

2. Omfang

Prosedyren består av fortykning av primere, pipettering i qPCR-plate og analysering på instrumentet.

3. Bakgrunnsinformasjon

Teknikk for å undersøke hvilke verdier som er optimale for analysen og for primerne som benyttes. Optimalisering av qPCR sørger for en robust og effektiv analyse.

Ved primerdesign filtreres primere etter annealingtemperaturen. På tross av dette kan det være nødvendig å optimalisere temperaturen. Dette gjøres ut ifra primerne.

I dette forsøket var det også nødvendig med optimalisering av prøvevolumet. Templat-DNA justeres etter konsentrasjon, hvor lavere konsentrasjoner krever større volum. RNase-fritt vann justeres med utgangspunkt i templat-DNA-ets volum for å oppnå gunstig totalt reaksjonsvolum.

4. Utstyr og reagens

- Hansker
- Eppendorfrør
- Eppendorfsentrifuge
- Vortexer
- Minisentrifuge

- Automatpipette
- Pipettespisser
- Primer forward
- Primer reverse
- RNase-fritt vann
- SYBR Green Master MIX
- Templat-DNA
- qPCR-plate med 96 brønner
- qPCR-plastfilm til 96 brønner
- Isoporkasse med is

5. Analyseprinsipp

Henviser til teori om qPCR (ref. 2.2 Real-time PCR (qPCR)), fargestoff (ref. 2.3 Fargestoff) og standardkurve og deteksjonsgrense (ref. 2.4.2 Metodeoptimalisering).

6. Kvalitetskontroll

Kvalitetskontroll av analysen er benyttelse av No Template Control (NTC). Dette er en kontroll for bakgrunnsstøy og DNA-kontaminering. Det benyttes også paralleller.

7. Primere

Primerpar 1:

Primer 1 (FWD)

CYTC1fwd 5' - 3' TTCGGGAGTTTTTCACTCCG

Primer 2 (RWD)

CYTC1rwd 5' - 3' ATTGGCATTGCCCCACTAA

Primerpar 2:

Primer 3 (FWD)

CYTC2fwd 5'- 3' GGGCTTCAGTAGATTTGCG

Primer 4 (RWD)

CYTC2rwd 5'- 3' CTAAAAGTCCCAAGCACCGT

Primerpar 3:

Primer 5 (FWD)

CYTBfwd 5'- 3' CCGCATGATATGGTCTACGG

Primer 6 (RWD)

CYTBfwd 5'- 3' GGGTGGAACCTTTGGGTCTTT

Primerpar 4:

Primer 7 (FWD)

ATPAfwd 5'- 3' TAGTGAAGGGGCAGGGTTTA

Primer 8 (RWD)

ATPAfwd 5'- 3' CACACAGATGTGCCTACTCC

8. Fremgangsmåte

Forberedelser:

1. Primere ankommer med konsentrasjonen 100 µM, som fortynnes til en 10 µM bruksløsning. Tilsett 90 µL RNase-fritt vann og 10 µL 100 µM primer.
2. Kalibrer AriaMx Real-Time PCR System ved førstegangsbruk. Dette kan være nødvendig om det oppstår problemer med instrumentet. Tilsett 20 µL Milli-Q vann i alle brønnene til PCR-platen. Sett plastfilm på og kjør kalibrering; Trykk på

«settings», «system settings», deretter «background calibration». Velg 1 av fargestoffene, trykk «calibrate» og «ok». Gjøres for alle 5 fargestoffene.

Metode:

Tabell 23: Oversikt over reagenser og volumer til pipettering for volumoptimalisering

Reagens	Volum
RNase-fritt vann	6 μL /5 μL /4 μL /3 μL
FWD-primer	0.750 μL
RWD-primer	0.750 μL
SYBR Green Mastermiks	7.5 μL
Templat-DNA	1 μL /2 μL /3 μL

1. Tilsett RNase-fritt vann til brønnene:
 - a. 6 μL til No Template Control (NTC)
 - b. 5 μL til brønn merket med DNA volum 1 μL
 - c. 4 μL til brønn merket med DNA volum 2 μL
 - d. 3 μL til brønn merket med DNA volum 3 μL
2. Tilsett 0,750 μL av FWD- og RWD-primer til respektive brønner
3. Tilsett 7,5 μL SYBR Green
4. Tilsett templat-DNA til brønnene (ikke NTC)
 - a. 1 μL til brønn merket med DNA volum 1 μL
 - b. 2 μL til brønn merket med DNA volum 2 μL
 - c. 3 μL til brønn merket med DNA volum 3 μL
5. Sett på en plastfilm på brettet
6. Analyser med følgende program:

Tabell 24: Oversikt over analyseprogram for volumoptimalisering

Reaksjon	Temperatur	Tid	Antall sykluser
Hot start: Innledende denaturering	95 °C	3 min	1
Amplification:			40
Denaturering	95 °C	10 sek	
Annealing	58 °C	30 sek	
Elongering	72 °C	30 sek	
Melt: Smeltepunktsanalyse	95 °C	30 sek	1
	65 °C	30 sek	
	95 °C	30 sek	

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		NTC P1 - 1	P1 - 1	P1 - 1	P1 - 1	NTC P1 - 1	NTC P1 - 2	P1 - 2	P1 - 2	P1 - 2	NTC P1 - 2	
C		NTC P2 - 1	P2 - 1	P2 - 1	P2 - 1	NTC P2 - 1	NTC P2 - 2	P2 - 2	P2 - 2	P2 - 2	NTC P2 - 2	
D		NTC P3 - 1	P3 - 1	P3 - 1	P3 - 1	NTC P3 - 1	NTC P3 - 2	P3 - 2	P3 - 2	P3 - 2	NTC P3 - 2	
E		NTC P4 - 1	P4 - 1	P4 - 1	P4 - 1	NTC P4 - 1	NTC P4 - 2	P4 - 2	P4 - 2	P4 - 2	NTC P4 - 2	
F		NTC P1 - 3	P1 - 3	P1 - 3	P1 - 3	NTC P1 - 3	NTC P3 - 3	P3 - 3	P3 - 3	P3 - 3	NTC P3 - 3	
G		NTC P2 - 3	P2 - 3	P2 - 3	P2 - 3	NTC P2 - 3	NTC P4 - 3	P4 - 3	P4 - 3	P4 - 3	NTC P4 - 3	
H												
	Oversikt over forkortelser											
	NTC	No Template Controll										
	P1	Primerpar 1										
	P2	Primerpar 2										
	P3	Primerpar 3										
	P4	Primerpar 4										
	1	Volum 1										
	2	Volum 2										
	3	Volum 3										

Figur 11: Plateoppsett for optimalisering av volum

Om nødvendig gjentas forsøket med en annen annealingtemperatur.

9. Feilkilder

- Feil ved pipettering
- Forurensning/Kontaminering
- Instrumentelle feil
- Kanteffekt for brønner i ytterkanter.

10. Resultatvurdering

Resultatene tolkes ut ifra amplifiseringskurven og smeltepunktsskurven. Det er lønnsomt å bruke bearbeidingssoftware, som ofte følger med instrumentet. NTC sjekkes for kontaminering, og paralleller settes opp mot hverandre. Er det lite optimale resultater, kan annealingtemperaturen endres. Observeres et tydelig mønster innenfor de ulike volumene, kan dette bestemme hvilket volum som er optimalt.

Vedlegg 9: Prosedyre for optimalisering av primerkonsentrasjon for qPCR

1. Hensikt

Hensikten med prosedyren er å optimalisere konsentrasjonen av primer og konsentrasjonsforholdet mellom forward- (FWD) og reverse- (RWD) primer.

2. Omfang

Prosedyren består av fortynning av primere, tillaging av mastermiks, pipettering i qPCR-plate og analysering på instrumentet.

3. Bakgrunnsinformasjon

Teknikk for å undersøke hvilke verdier som er optimale for analysen og primerne som benyttes. Optimalisering av qPCR sørger for en robust og effektiv analyse.

Det er viktig å optimalisere konsentrasjonen av primerparet som brukes. Dette er fordi ulike primere fungerer best ved ulike konsentrasjoner. Det kan forekomme tilfeller hvor det er nødvendig med forskjellige konsentrasjoner av FWD og RWD. Forholdet må dermed optimaliseres (1).

Ut fra optimalisering av volum og annealingtemperatur, ble det bestemt følgende; annealingtemperaturen var optimal ved 58 °C og volumet var optimalt ved 2 µL. Det var tydelige primer-dimere mot slutten av analysen, og derfor ble antall sykluser under amplifiseringen endret fra 40 til 35 sykluser. Etter resultater fra første qPCR-forsøk ble det konkludert å fortsette kun med primerpar 2 og 3 da disse viste de beste resultatene (ref. 4.1.2 Optimalisering av templatvolum og annealingtemperatur).

4. Utstyr og reagens

- Hansker
- Eppendorfrør
- Eppendorfsentrifuge
- Vortexer
- Minisentrifuge
- Automatpipette
- Pipettespisser
- Primere (forward og reverse)
- RNase-fritt vann
- SYBR Green Master MIX
- Templat-DNA
- qPCR-plate med 96 brønner
- qPCR-plastfilm til 96 brønner
- Isoporkasse med is

5. Analyseprinsipp

Henviser til teori om qPCR (ref. 2.2 Real-time PCR (qPCR)), fargestoff (ref. 2.3 Fargestoff) og standardkurve og deteksjonsgrense (ref. 2.4.2 Metodeoptimalisering).

6. Kvalitetskontroll

Kvalitetskontroll av analysen er benyttelse av No Template Control (NTC) som er en kontroll for bakgrunnsstøy og DNA-kontaminering. Paralleller benyttes.

7. Primere

Primerpar 2:

Primer 3 (FWD)

CYTC2fwd 5'- 3' GGGCTTCAGTAGATTTGCG

Primer 4 (RWD)

CYTC2rwd 5'- 3' CTAAAAGTCCCAAGCACCGT

Primerpar 3:

Primer 5 (FWD)

CYTBfwd 5'- 3' CCGCATGATATGGTCTACGG

Primer 6 (RWD)

CYTBrwd 5'- 3' GGGTGGAAC TTTGGGTCTTT

8. Fremgangsmåte

Forberedelser:

1. Primere ankommer med konsentrasjonen 100 µM, som fortynnes til en 10 µM bruksløsning. Tilsett 90 µL RNase-fritt vann og 10 µL 100µM primer.
2. Kalibrer av AriaMx Real-Time PCR System ved førstegangsbruk, og kan være nødvendig om det oppstår problemer med instrumentet. Tilsett 20 µL Milli-Q vann i alle brønnene til PCR-platen. Sett plastfilm på og kjør kalibrering; Trykk på «settings», «system settings», deretter «background calibration». Velg 1 av fargestoffene, trykk «calibrate» og «ok». Gjøres for alle 5 fargestoffene.

Fortynne primere:

1. Fortynn alle primere i primerpar 2 og 3 som i tabell 1. Dette gjøres i eppendorfrør med tydelig markering av innhold. Alle 4 fortynningene må gjøres for alle fire primere.

Tabell 25: Oppskrift på fortynning av primere

Primerpar 2 og 3				
Konsentrasjon	300 nM	400 nM	500 nM	600 nM
Reagens				
RNase-fritt vann	97 µL	96 µL	95 µL	94 µL
Primer (10 µM)	3 µL	4 µL	5 µL	6 µL

Lage til mastermiks:

Tabell 26: Oppskrift på mastermiks for primeroptimalisering

Reagens	Volum per brønn	X antall brønner
SYBR Green Master MIX	7,5 µL	x*7,5 µL
RNase-fritt vann	4 µL	x*4 µL
Volum:	11,5 µL	x*11,5 µL

Pipettering av plate:

Tabell 27: Oversikt over reagenser og volumer til pipettering for primeroptimalisering

Reagens	Volum
FWD-primer	0,750 µL
RWD-primer	0,750 µL
Templat-DNA	2 µL
RNase-fritt vann	2 µL (NTC)

1. Tilsett 11,5 µL mastermiks til alle brønnene:
2. Tilsett 0,750 µL av FWD- og RWD-primer til respektive brønner. Følg plateoppsettet i figur 11.
3. Tilsett templat-DNA til brønnene (ikke til NTC)
4. Sett på plastfilm på brettet
5. Analyser med følgende program:

Tabell 28: Oversikt over analyseprogram for primeroptimalisering

Reaksjon	Temperatur	Tid	Antall sykluser
Hot start: Innledende denaturering	95 °C	3 min	1
Amplification:			35
Denaturering	95 °C	10 sek	
Annealing	58 °C	30 sek	
Elongering	72 °C	30 sek	
Melt: Smeltepunktanalyse	95 °C	30 sek	1
	65 °C	30 sek	
	95 °C	30 sek	

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC P2 - 300/300	P2 - 300/300	P2 - 300/400	P2 - 300/500	P2 - 300/600	P2 - 300/300	P2 - 300/400	P2 - 300/500	P2 - 300/600	NTC P2 - 300/300		
B	NTC P2 - 400/400	P2 - 400/300	P2 - 400/400	P2 - 400/500	P2 - 400/600	P2 - 400/300	P2 - 400/400	P2 - 400/500	P2 - 400/600	NTC P2 - 400/400		
C	NTC P2 - 500/500	P2 - 500/300	P2 - 500/400	P2 - 500/500	P2 - 500/600	P2 - 500/300	P2 - 500/400	P2 - 500/500	P2 - 500/600	NTC P2 - 500/500		
D	NTC P2 - 600/600	P2 - 600/300	P2 - 600/400	P2 - 600/500	P2 - 600/600	P2 - 600/300	P2 - 600/400	P2 - 600/500	P2 - 600/600	NTC P2 - 600/600		
E	NTC P3 - 300/300	P3 - 300/300	P3 - 300/400	P3 - 300/500	P3 - 300/600	P3 - 300/300	P3 - 300/400	P3 - 300/500	P3 - 300/600	NTC P3 - 300/300		
F	NTC P3 - 400/400	P3 - 400/300	P3 - 400/400	P3 - 400/500	P3 - 400/600	P3 - 400/300	P3 - 400/400	P3 - 400/500	P3 - 400/600	NTC P3 - 400/400		
G	NTC P3 - 500/500	P3 - 500/300	P3 - 500/400	P3 - 500/500	P3 - 500/600	P3 - 500/300	P3 - 500/400	P3 - 500/500	P3 - 500/600	NTC P3 - 500/500		
H	NTC P3 - 600/600	P3 - 600/300	P3 - 600/400	P3 - 600/500	P3 - 600/600	P3 - 600/300	P3 - 600/400	P3 - 600/500	P3 - 600/600	NTC P3 - 600/600		
	Oversikt over forkortelser											
	NTC	No Template Controll										
	P2	Primerpar 2										
	P3	Primerpar 3										
	300	300 nM										
	400	400 nM										
	500	500 nM										
	600	600 nM										
	300/300	FWD/RWD										

Figur 12: Plateoppsett for optimalisering av primerkonsentrasjon

9. Feilkilder

- Feil ved pipettering
- Forurensning/Kontaminering
- Instrumentelle feil
- Kanteffekt for brønner i ytterkanten

10. Resultatvurdering

Resultatene tolkes ut ifra amplifiseringskurven og smeltepunktsskurven. Det er lønnsomt å bruke et analyseprogram, som ofte følger med instrumentet. NTC sjekkes for kontaminering, og paralleller settes opp mot hverandre. Konsentrasjonene bestemmes ut ifra om begge parallellene har gode resultater og de mest optimale velges.

11. Kilde

1. PCR Troubleshooting. BIO-RAD. [Internett]. 2021 [hentet 26. mars 2021]; Tilgjengelig fra:<https://www.bio-rad.com/en-no/applications-technologies/pcr-troubleshooting?ID=LUSO3HC4S>

Vedlegg 10: Prosedyre for deteksjonsgrense og standardkurve med qPCR

1. Hensikt

Hensikten med prosedyren er å bestemme deteksjonsgrense og lage standardkurve.

2. Omfang

Prosedyren består av tillaging av fortynningsrekke, tillaging av mastermiks, pipettering i qPCR-plate og analysering på instrumentet.

3. Bakgrunnsinformasjon

Et av de mest brukte verktøyene for å observere effektiviteten og reproduserbarheten til et qPCR-assay er en standardkurve. En standardkurve produseres ved å sette opp en fortynningsrekke og analysere denne. Deteksjonsgrensen blir bestemt ut ifra standardkurven.

Ut ifra optimalisering av volum og annealingtemperatur (Vedlegg 5), ble det bestemt følgende; annealingtemperaturen var optimal ved 58 °C og volumet var optimalt ved 2 µL. Det var tydelige primer-dimere mot slutten av amplifiseringen etter 40 sykluser, og derfor ble dette redusert til 35. Det ble også bestemt å kun fortsette optimaliseringen med primerpar 2 og 3. Ut ifra primeroptimaliseringen ble det bestemt følgende: Primerpar 2 med konsentrasjon 500 nM/500 nM (FWD/RWD) og primerpar 3 med konsentrasjon 500 nM/600 nM (FWD/RWD) (ref. 4.1.2 Optimalisering av templatvolum og annealingtemperatur og 4.1.3 Optimalisering av primerkonsentrasjon).

4. Utstyr og reagens

- Hansker
- Eppendorfrør

- Eppendorfsentrifuge
- Vortexer
- Minisentrifuge
- Automatpipette
- Pipettespisser
- Primere (forward og reverse)
- RNase-fritt vann
- SYBR Green Master MIX
- Templat-DNA
- qPCR-plate med 96 brønner
- qPCR-plastfilm til 96 brønner
- Isoporkasse med is

5. Analyseprinsipp

Henviser til teori om qPCR (ref. 2.2 Real-time PCR (qPCR)), fargestoff (ref. 2.3 Fargestoff) og standardkurve og deteksjonsgrense (ref. 2.4.3 Standardkurve og deteksjonsgrense).

6. Kvalitetskontroll

Kvalitetskontroll av analysen er benyttelsen av No Template Control (NTC) som er en kontroll for bakgrunnsstøy og DNA-kontaminering. Det benyttes paralleller i flere brønner.

7. Formler

Utrekning av effektivitet:

Ved utregning av effektivitet benyttes slope-verdien som utgangspunkt og følgende formel benyttes:

$$\text{Formel 3(1): } E\% = 10^{\frac{-1}{\text{slope}}} - 1$$

8. Primere

Primerpar 2:

Primer 3 (FWD)

CYTC 2fwd 5'- 3' GGGCTTCAGTAGATTTGCG

Primer 4 (RWD)

CYTC2rwd 5'- 3' CTAAAAGTCCCAAGCACCGT

Primerpar 3:

Primer 5 (FWD)

CYTBfwd 5'- 3' CCGCATGATATGGTCTACGG

Primer 6 (RWD)

CYTBrwd 5'- 3' GGGTGGAAC TTTGGGTCTTT

9. Fremgangsmåte

Forberedelser:

1. Primere ankommer med konsentrasjonen 100 μM , som fortynnes til en 10 μM bruksløsning. Tilsett 90 μL RNase-fritt vann og 10 μL 100 μM primer.
2. Kalibrering av AriaMx Real-Time PCR System er nødvendig ved førstegangsbruk, og kan være nødvendig om det oppstår problemer med instrumentet. Tilsett 20 μL Milli-Q vann i alle brønnene til PCR-platen. Sett plastfilm på og kjør kalibrering; Trykk på «settings», «system settings», deretter «background calibration». Velg én av de fem fargestoffene, trykk «calibrate» og «ok». Dette gjøres for alle 5 fargestoffene.

Lage fortynningsrekke:

1. Pipetter 90 μL RNase-fritt vann i 5 eppendorfrør. Merk rørene med F1, F2, F3, F4 og F5.

2. Tilsett 10 µL av original DNA-prøve til rør F1. Vortex godt.
3. Tilsett 10 µL av F1 til F2. Vortex godt.
4. Tilsett 10 µL av F2 til F3 og vortex godt.
5. Tilsett 10 µL av F3 til F4 og vortex godt.
6. Tilsett 10 µL av F4 til F5 og vortex godt.
7. Ta ut 10 µL av F5 over i spillbeger.

Lage til mastermiks:

Tabell 29: Oppskrift på mastermiks for standardkurve og deteksjonsgrense

Reagens	Volum	Totalt volum (x antall brønner)
Primerpar 2		
SYBR Green	7,5 µL	x * 7,5 µL
FWD-primer (nr. 3, 500 nM)	0,75 µL	x * 0,750 µL
RWD-primer (nr. 4, 500 nM)	0,75µL	x * 0,750 µL
RNase-fritt vann	4 µL	x * 4 µL
Totalt volum	13 µL	x * 13 µL
Primerpar 3		
SYBR Green	7.5 µL	x * 7,5 µL
FWD-primer (nr 5, 500 nM)	0,75 µL	x * 0,750 µL
RWD-primer (nr 6, 600 nM)	0,75µL	x * 0,750 µL
RNase-fritt vann	4 µL	x * 4 µL
Totalt volum	13 µL	x * 13 µL

Pipettering av plate:

1. Tilsett 13 µL mastermiks til alle brønnene
2. Tilsett 2 µL templat-DNA til brønnene, utenom NTC som tilsettes RNase-fritt vann som erstatning. Følg plateoppsettet i figur 12.
3. Sett på plastfilm på brettet
4. Analyser med følgende program:

Tabell 30: Oversikt over analyseprogram for standardkurve og deteksjonsgrense

Reaksjon	Temperatur	Tid	Antall sykluser
Hot start: Innledende denaturering	95 °C	3 min	1
Amplification:			35
Denaturering	95 °C	10 sek	
Annealing	58 °C	30 sek	
Elongering	72 °C	30 sek	
Melt: Smeltepunktsanalyse	95 °C	30 sek	1
	65 °C	30 sek	
	95 °C	30 sek	

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B			NTC - P2	F1 - P2	F2 - P2	F3 - P2	F4 - P2	F5 - P2	P - P2			
C			NTC - P2	F1 - P2	F2 - P2	F3 - P2	F4 - P2	F5 - P2	P - P2			
D			NTC - P2	F1 - P2	F2 - P2	F3 - P2	F4 - P2	F5 - P2	P - P2			
E			NTC - P3	F1 - P3	F2 - P3	F3 - P3	F4 - P3	F5 - P3	P - P3			
F			NTC - P3	F1 - P3	F2 - P3	F3 - P3	F4 - P3	F5 - P3	P - P3			
G			NTC - P3	F1 - P3	F2 - P3	F3 - P3	F4 - P3	F5 - P3	P - P3			
H												
	Oversikt over forkortelser											
	NTC	No Template Controll										
	P2	Primerpar 2										
	P3	Primerpar 3										
	F1	Fortynning 1										
	F2	Fortynning 2										
	F3	Fortynning 3										
	F4	Fortynning 4										
	F5	Fortynning 5										
	P	Ufortynnet prøve										

Figur 13: Plateoppsett for standardkurve.

10. Feilkilder

- Feil ved pipettering
- Forurensning/Kontaminering
- Instrumentelle feil
- Kanteffekt for de ytterste brønnene

11. Resultatvurdering

Resultatene tolkes ut ifra amplifiseringskurven og smeltepunktsskurven. Det er lønnsomt å bruke et analyseprogram, som ofte følger med instrumentet. NTC sjekkes for kontaminering, og paralleller settes opp mot hverandre. Gjennomsnittet av parallellene regnes ut, og det settes opp en standardkurve ved hjelp av Excel. To verdier er av interesse ved vurdering av standardkurven. R^2 -verdien indikerer hvor lineær kurven er, med en optimal verdi nær 1. Slope-verdien viser hvor effektiv amplifikasjonen til assayet er. Den ideelle verdien er så nærme -3,32 som mulig, som gir en effektivitet på rundt 100 %. Ved denne verdien vil det være dobbelt så mange kopier av målsekvensen for hver syklus. Unormale verdier kan revurderes, og eventuelt utelukkes (1).

12. Kilder

1. Important Parameters of Quantitative PCR (qPCR) Analysis. Thermo Fisher. [Internett]. [hentet 27. mars 2021]; Tilgjengelig fra: http://tools.thermofisher.com/content/sfs/appendix/pcr_rtpcr/important%20parameters%20of%20qpcr.pdf

Vedlegg 11: Teste ferdig optimalisert prosedyre for deteksjon av *Lepeophtheirus salmonis* nauplier (lakseluslarver) i vannprøver med bruk av real-time PCR (qPCR)

1. Hensikt

Hensikten med prosedyren er å teste ferdig optimalisert metode for identifisering av lakseluslarver i en vannprøve med plankton til stede.

2. Omfang

Prosedyren består av telling av alger (ref. vedlegg 5), telling av lakseluslarver, DNA-isolering (ref. vedlegg 6), qubit-måling (ref. vedlegg 7) og tillaging av mastermiks. Avsluttes med pipettering i qPCR-plate og analysering på instrumentet.

3. Bakgrunnsinformasjon

Med bakgrunn fra optimalisering av volum og annealingtemperatur, ble det bestemt følgende: Annealingtemperaturen var optimal ved 58 °C og volumet var optimalt ved 2 µL. Det var tydelige primer-dimere mot slutten av analysen, og derfor ble antall sykluser under amplifisering endret fra 40 til 35 sykluser. Det ble også bestemt å fortsette optimaliseringen med primerpar 2 og 3. Ut ifra primeroptimaliseringen ble det bestemt følgende: Primerpar 2 med konsentrasjon 500 nM/500 nM (FWD/RWD) og primerpar 3 med konsentrasjon 500 nM/600 nM (FWD/RWD) (ref. 4.1.2 Optimalisering av templatvolum og annealingtemperatur og 4.1.3 Optimalisering av primerkonsentrasjon).

4. Utstyr og reagens

- Hansker
- Eppendorfrør
- Eppendorfsentrifuge

- Vortexer
- Minisentrifuge
- Automatpipette
- Pipettespisser
- Primere (forward og reverse)
- RNase-fritt vann
- SYBR Green Master MIX
- Templat-DNA
- qPCR-plate med 96 brønner
- qPCR-plastfilm til 96 brønner
- Isoporkasse med is

5. Analyseprinsipp

Henviser til teori om qPCR (ref. 2.2 Real-time PCR (qPCR)), fargestoff (ref. 2.3 Fargestoff), DNA-isolering og Qubit (ref. 2.5 DNA-isolering og Qubit).

6. Kvalitetskontroll

Kvalitetskontroll av analysen er benyttelse av No Template Control (NTC) som er en kontroll for bakgrunnsstøy og DNA-kontaminering. I tillegg benyttes paralleller av negativ kontroll med kun alger og positiv kontroll med kun lakseluslarver.

7. Primere

Primerpar 2:

Primer 3 (FWD)

CYTC2fwd 5' - 3' GGGCTTCAGTAGATTTGCG

Primer 4 (RWD)

CYTC2rwd 5' - 3' CTAAAAGTCCCAAGCACCGT

Primerpar 3:

Primer 5 (FWD)

CYTBfwd 5' - 3' CCGCATGATATGGTCTACGG

Primer 6 (RWD)

CYTBrwd 5' - 3' GGGTGGAAC TTTGGGTCTTT

8. Fremgangsmåte

Forberedelser:

1. Primere ankommer med konsentrasjonen 100 µM, som fortynnes til en 10 µM bruksløsning. Tilsett 90 µL RNase-fritt vann og 10 µL 100µM primer.
2. Kalibrering av AriaMx Real-Time PCR System er nødvendig ved førstegangsbruk, og kan være nødvendig dersom det oppstår problemer med instrumentet. Tilsett 20 µL Milli-Q vann i alle brønnene til PCR-platen. Sett plastfilm på og kjør kalibrering; Trykk på «settings», «system settings», deretter «background calibration». Velg 1 av fargestoffene, trykk «calibrate» og «ok». Gjøres for alle 5 fargestoffene.
3. Preparere prøver:
 - a. Følg prosedyre for algetelling (ref. vedlegg 5). Tell i tillegg lakseluslarvene. Bruk tabell 31.
 - b. Følg prosedyre for DNA-isolering (ref. vedlegg 6) for positiv kontroll, negativ kontroll og feltprøver.
 - c. Følg prosedyre for Qubit (ref. vedlegg 7) på prøverørene fra DNA-isoleringen som en kvalitetskontroll.

Tabell 31: Oversikt over x antall lus og x antall alger som tilsettes i de ulike eppendorfrørene. Testing av optimalisert prosedyre.

Eppendorfrør nr.	Antall lus	Algeart	Antall alger	Volum alger tilsatt
1	x	<i>T. Subcordiformis</i>	x	x µl
2	x	<i>T. Subcordiformis</i>	x	x µl
3	x	<i>I. galbana</i> <i>T. Subcordiformis</i>	x	x µl
4	x	<i>I. galbana</i>	x	x µl
5	x	<i>I. galbana</i>	x	x µl
6	x	<i>I. galbana</i> <i>T. Subcordiformis</i>	x	x µl
7 (negativ kontroll)	0	<i>I. galbana</i> <i>T. Subcordiformis</i>	x	x µl

Lage til mastermiks:

Tabell 32: Oppskrift på mastermiks for test av optimalisert prosedyre.

Reagens	Volum	Totalt volum (x antall brønner)
Primerpar 2		
SYBR Green	7,5 µL	x * 7,5 µL
FWD-primer (nr 3, 500 nM)	0,75 µL	x * 0,750 µL
RWD-primer (nr 4, 500 nM)	0,75µL	x * 0,750 µL
RNase-fritt vann	4 µL	x * 4 µL
Totalt volum	13 µL	x * 13 µL
Primerpar 3		
SYBR Green	7,5 µL	x * 7,5 µL
FWD-primer (nr 5, 500 nM)	0,750 µL	x * 0,750 µL
RWD-primer (nr 6, 600 nM)	0,750µL	x * 0,750 µL
RNase-fritt vann	4 µL	x * 4 µL
Totalt volum	13 µL	x * 13 µL

Pipettering av plate:

1. Tilsett 13 μ L mastermiks til alle brønnene
2. Tilsett 2 μ L templat-DNA (1 – 6) til brønnene (RNase-fritt vann i NTC). Følg plateoppsettet i figur 13.
3. Sett på en plastfilm på brettet
4. Analyser med følgende program:

Tabell 33: Oversikt over analyseprogram for test av optimalisert prosedyre.

Reaksjon	Temperatur	Tid	Antall sykluser
Hot start: Innledende denaturering	95 °C	3 min	1
Amplification:			35
Denaturering	95 °C	10 sek	
Annealing	58 °C	30 sek	
Elongering	72 °C	30 sek	
Melt: Smeltepunktsanalyse	95 °C	30 sek	1
	65 °C	30 sek	
	95 °C	30 sek	

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B					NTC - P2	NTC - P2	NTC - P3	NTC - P3				
C			NK - P2	P2 - 1	P2 - 1	P2 - 2	P2 - 2	P2 - 3	P2 - 3	PK (7) - P2		
D			NK - P2	P2 - 4	P2 - 4	P2 - 5	P2 - 5	P2 - 6	P2 - 6	PK (7) - P2		
E			NK - P3	P3 - 1	P3 - 1	P3 - 2	P3 - 2	P3 - 3	P3 - 3	PK (7) - P3		
F			NK - P3	P3 - 4	P3 - 4	P3 - 5	P3 - 5	P3 - 6	P3 - 6	PK (7) - P3		
G												
H												
	Oversikt over forkortelser											
	NTC	No Template Controll										
	P2	Primerpar 2										
	P3	Primerpar 3										
	NK	Negativ kontroll (kun alger)										
	PK (7)	Positiv kontroll (kun lakseluslarve)										
	1 - 6	Prøver av alger og lakseluslarver med ulike konsentrasjoner										

Figur 14: Plateoppsett for test av optimalisert prosedyre.

9. Feilkilder

- Feil ved pipettering
- Forurensning/Kontaminering
- Instrumentelle feil
- Kanteffekt på ytterste brønner

10. Resultatvurdering

Resultatene tolkes ut ifra amplifiseringskurven, smeltepunktskurven, C_q-verdier og T_m-verdier. C_q-verdien bør være under 30 og T_m-verdiene bør være jevne. Det er lønnsomt å bruke et analyseprogram, som ofte følger med instrumentet. NTC sjekkes for kontaminering, og paralleller settes opp mot hverandre. Negativ kontroll skal ikke ha utslag og positiv kontroll skal ha utslag.

Vedlegg 12: Prosedyre for deteksjon av *Lepeophtheirus salmonis* nauplier (lakseluslarver) i vannprøver med bruk av real-time PCR (qPCR)

1. Hensikt

Hensikten med prosedyren er å identifisere lakseluslarver i en vannprøve med andre dyreplankton til stede.

2. Omfang

Prosedyren består av innsamling av feltprøver, DNA-isolering (ref. vedlegg 6), qubit-måling (ref. vedlegg 7) og tillaging av mastermiks. Avsluttes med pipettering i qPCR-plate og analysering på instrumentet.

3. Bakgrunnsinformasjon

Henviser til teori om lakselus (ref. 2.1 *Lepeophtheirus salmonis* - Lakselus).

4. Utstyr og reagens

- Hansker
- Eppendorfrør
- Eppendorfsentrifuge
- Vortexer
- Minisentrifuge
- Automatpipette
- Pipettespisser
- Primere (forward og reverse)
- RNase-fritt vann
- SYBR Green Master MIX

- Templat-DNA
- qPCR-plate med 96 brønner
- qPCR-plastfilm til 96 brønner
- Isoporkasse med is

5. Analyseprinsipp

Henviser til teori om qPCR (ref. 2.2 Real-time PCR (qPCR)), fargestoff (ref. 2.3 Fargestoff), DNA-isolering og Qubit (ref. 2.5 DNA-isolering og Qubit).

6. Kvalitetskontroll

Kvalitetskontroll av analysen er benyttelse av No Template Control (NTC) som er en kontroll for bakgrunnsstøy og DNA-kontaminering. I tillegg benyttes paralleller av negativ kontroll med kun alger og positiv kontroll med kun lakseluslarver.

7. Primere

Primerpar 2:

Primer 3 (FWD)

CYTC2fwd 5'- 3' GGGCTTCAGTAGATTTGCG

Primer 4 (RWD)

CYTC2rwd 5'- 3' CTAAAAGTCCCAAGCACCGT

Primerpar 3:

Primer 5 (FWD)

CYTBfwd 5'- 3' CCGCATGATATGGTCTACGG

Primer 6 (RWD)

CYTBrwd 5'- 3' GGGTGGAACCTTTGGGTCTTT

8. Fremgangsmåte

Forberedelser:

1. Primere ankommer med konsentrasjonen 100 μM , som fortynnes til en 10 μM bruksløsning. Tilsett 90 μL RNase-fritt vann og 10 μL 100 μM primer.
2. Kalibrering av AriaMx Real-Time PCR System er nødvendig ved førstegangsbruk, og kan være nødvendig dersom det oppstår problemer med instrumentet. Tilsett 20 μL Milli-Q vann i alle brønnene til PCR-platen. Sett plastfilm på og kjør kalibrering:
Trykk på «settings», «system settings», deretter «background calibration». Velg 1 av fargestoffene, trykk «calibrate» og «ok». Gjøres for alle 5 fargestoffene.
3. Preparere prøver:
 - a. Preparer negativ og positiv kontroll til DNA-isolering. Positiv kontroll er kun alger, mens negativ kontroll inneholder ikke DNA. Her kan det brukes DNA fra andre akvatiske organismer, som for eksempel alger.
 - b. Følg prosedyre for DNA-isolering (ref. vedlegg 6) for positiv kontroll, negativ kontroll og feltprøver.
 - c. Følg prosedyre for Qubit (ref. vedlegg 7) på prøverørene fra DNA-isoleringen som en kvalitetskontroll.

Lage til mastermiks:

Tabell 34: Oppskrift på mastermiks for ferdig prosedyre.

Reagens	Volum	Totalt volum (x antall brønner)
Primerpar 2		
SYBR Green	7,5 µL	x * 7,5 µL
FWD-primer (nr 3, 500 nM)	0,75 µL	x * 0,750 µL
RWD-primer (nr 4, 500 nM)	0,75µL	x * 0,750 µL
RNase-fritt vann	4 µL	x * 4 µL
Totalt volum	13 µL	x * 13 µL
Primerpar 3		
SYBR Green	7,5 µL	x * 7,5 µL
FWD-primer (nr 5, 500 nM)	0,750 µL	x * 0,750 µL
RWD-primer (nr 6, 600 nM)	0,750 µL	x * 0,750 µL
RNase-fritt vann	4 µL	x * 4 µL
Totalt volum	13 µL	x * 13 µL

Pipettering av plate:

1. Tilsett 13 µL mastermiks til alle brønnene. (ref. figur 14)
2. Tilsett 2 µL templat DNA (1 – 6) til brønnene (RNase-fritt vann i NTC). Følg plateoppsettet i figur 14
3. Sett på plastfilm på brettet
4. Analyser med følgende program:

Tabell 35: Oversikt over analyseprogram for ferdig prosedyre.

Reaksjon	Temperatur	Tid	Antall sykluser
Hot start: Innledende denaturering	95 °C	3 min	1
Amplification:			35
Denaturering	95 °C	10 sek	
Annealing	58 °C	30 sek	
Elongering	72 °C	30 sek	
Melt: Smeltepunktsanalyse	95 °C	30 sek	1
	65 °C	30 sek	
	95 °C	30 sek	

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B					NTC - P2	NTC - P2	NTC - P3	NTC - P3				
C			NK - P2	P2 - 1	P2 - 1	P2 - 2	P2 - 2	P2 - 3	P2 - 3	PK (7) - P2		
D			NK - P2	P2 - 4	P2 - 4	P2 - 5	P2 - 5	P2 - 6	P2 - 6	PK (7) - P2		
E			NK - P3	P3 - 1	P3 - 1	P3 - 2	P3 - 2	P3 - 3	P3 - 3	PK (7) - P3		
F			NK - P3	P3 - 4	P3 - 4	P3 - 5	P3 - 5	P3 - 6	P3 - 6	PK (7) - P3		
G												
H												
	Oversikt over forkortelser											
	NTC	No Template Controll										
	P2	Primerpar 2										
	P3	Primerpar 3										
	NK	Negativ kontroll (kun alger)										
	PK (7)	Positiv kontroll (kun lakseluslarve)										
	1 - 6	Prøver av alger og lakseluslarver med ulike konsentrasjoner										

Figur 15: Plateoppsett for ferdig prosedyre.

9. Feilkilder

- Feil ved pipettering
- Forurensning/Kontaminering
- Instrumentelle feil
- Kanteffekt på ytterste brønner

10. Resultatvurdering

Resultatene tolkes ut ifra amplifiseringskurven, smeltepunktsskurven, C_q-verdier og T_m-verdier. C_q-verdien bør være under 30 og T_m-verdiene bør være jevne. Det er lønnsomt å bruke et analyseprogram, som ofte følger med instrumentet. NTC sjekkes for kontaminering, og paralleller settes opp mot hverandre. Negativ kontroll skal ikke ha utslag og positiv kontroll skal ha utslag.

