

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

ZAKLJUČNA NALOGA
RAZVOJ METODE LAMP ZA POTRJEVANJE
PRISTNOSTI ŽIVIL IZ LIGNJEV VRSTE
Loligo vulgaris (Lamarck, 1798)

GREGOR GRBEC

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

Zaključna naloga

**Razvoj metode LAMP za potrjevanje pristnosti živil iz lignjev
vrste *Loligo vulgaris* (Lamarck, 1798)**

(Development of a LAMP method for authenticating foodstuff consisting of
species *Loligo vulgaris* (Lamarck, 1798))

Ime in priimek: Gregor Grbec
Študijski program: Bioinformatika
Mentor: doc. dr. Matjaž Hladnik
Somentor: doc. dr. Andreja Ramšak

Koper, september 2020

Ključna dokumentacijska informacija

Ime in PRIIMEK: Gregor GRBEC

Naslov zaključne naloge: Razvoj metode LAMP za potrjevanje pristnosti živil iz lignjev vrste *Loligo vulgaris* (Lamarck, 1798)

Kraj: Koper

Leto: 2020

Število listov: 42

Število slik: 13

Število tabel: 4

Število prilog: 3

Št. strani prilog: 3

Število referenc: 29

Mentor: doc. dr. Matjaž Hladnik

Somentor: doc. dr. Andreja Ramšak

Ključne besede: LAMP, začetni oligonukleotid, DNA, lignji, *Loligo vulgaris*, identifikacija vrste

Izvleček: Zaradi povečevanja prebivalstva, se izjemno povečuje tudi povpraševanje po morski hrani, zaradi česar prihaja do čezmernega, nereguliranega in ilegalnega lova. Pri potvarjanju se soočamo z dvema vidikoma – nenamerno zamenjavo vrst, ter namerno zavajanje za pridobitev ekonomske koristi. Zaradi predelave morske hrane ter velikega števila ribolovnih vrst, se je potrošniku izjemno težko prepričati katera vrsta je naprodaj, kar ima številne posledice (ekonomske in zdravstvene). Zaključna naloga opisuje razvoj metode LAMP za identifikacijo vrste *Loligo vulgaris* (Lamarck, 1798) v živilih. Vrsta *Loligo vulgaris* je avtohtona v Jadranskem morju in na tržišču dosega visoko ceno. Za razvoj metode smo uporabili več bioinformacijskih orodij: Clustal Omega, MEGA, MorphoCatcher, PrimerExplorer, itd. Končni rezultat predstavlja set začetnih oligonukleotidov za detekcijski test, ki temelji na metodi LAMP. Specifičnost pomnoževanja razvitih začetnih oligonukleotidov bo potrebno preveriti še v laboratoriju na referenčnih vzorcih lignjev.

Key words documentation

Name and SURNAME: Gregor GRBEC

Title of the final project paper: Development of a LAMP method for authenticating foodstuff consisting of species *Loligo vulgaris* (Lamarck, 1798)

Place: Koper

Year: 2020

Number of pages: 42

Number of figures: 13

Number of tables: 4

Number of appendix: 3

Number of appendix pages: 3

Number of references: 29

Mentor: Assist. Prof. Matjaž Hladnik, PhD

Co-Mentor: Assist. Prof. Andreja Ramšak, PhD

Keywords: LAMP, primer, DNA, squid, *Loligo vulgaris*, species identification

Abstract: With the rise of global population, seafood demands are getting bigger and bigger, which sometimes results in overfishing, unregulated fishing and illegal fishing. Misidentification of species occurs in two ways – accidental due to morphological similarities and on purpose for economical gain. Consumers often find it extremely hard to identify species, especially after the product has been processed and that can sometimes also result in health related issues. In this project paper we have presented the development of a LAMP method for detecting *Loligo vulgaris* (Lamarck, 1798) species in processed seafood. *Loligo vulgaris* is autochthonous in the Adriatic Sea and is highly valued internationally. During the development of the method we used several bioinformatic tools such as Clustal Omega, MEGA, MorphoCatcher, Primer Explorer, etc. Final result is primer set that can be used for the LAMP method. To confirm the reliability of primers further laboratory tests on seafood products are needed.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju Matjažu za vso predano znanje in pomoč tekom študija in projekta, še posebej pa se ti zahvaljujem za usmerjanje in pomoč med pisanjem naloge, ter za zelo hitro odzivnost in predanost.

Zahvaljujem se somentorici Andreji za dano priložnost za sodelovanje pri projektu »Uporaba tehnologije DNA za ugotavljanje poneverb v ribiških proizvodih z vrednotenjem socio ekonomskih vidikov« (št. projekta VI-1808 iz sheme Ciljni raziskovalni program (CRP) Zagotovimo.si hrano za jutri), za uvedbo na področje poneverb živil in lignjev, nudenje rezultatov projekta, ki so služili za osnovo te naloge ter za strokovne popravke dispozicije in zaključne naloge.

Zahvaljujem se doc. dr. Michaelu Burnardu za nasvete pri analizi v programu R.

Še posebej bi se rad zahvalil mami, očetu, nonotu in noni. Hvala, ker ste mi pomagali, me spodbujali in mi vedno stali ob strani skozi študij in ob pisanju zaključne naloge.

Nazadnje bi se rad zahvalil še vsem ostalim, ki so bili z mano tekom študija in mi lepšali študentske dni.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	1
2	PREGLED LITERATURE.....	2
2.1	Markerji za barkodiranje	2
2.1.1	Citokrom c oksidaza podenota I (<i>COI</i>).....	2
2.1.2	Citokrom b oksidaza (<i>cyt b</i>)	3
2.1.3	18S rDNA.....	3
2.1.4.	16S rDNA	3
2.2	Lastnosti LAMP metode.....	3
2.2.1	Opis metode LAMP	4
2.2.2	Primeri uporabe metode LAMP za identifikacijo rib	5
2.3	Opis vrste <i>Loligo vulgaris</i>	6
3	MATERIAL IN METODE.....	8
3.1	Identifikacija vrst lignjev za vključitev v analizo ter izbor referenčnih nukleotidnih zaporedij	8
3.1.1	Prenos zaporedij in metapodatkov z orodjem EDirect	8
3.1.2	Pravilna usmeritev in poravnava zaporedij z orodjem MAFFT ter identifikacija haplotipov	10
3.1.3	Priprava konsenznega zaporedja <i>L. vulgaris</i> za razvoj LAMP začetnih oligonukleotidov	11
3.2	Razvoj začetnih oligonukleotidov.....	11
3.2.1	Vnos datotek v MorphoCatcher	11
3.2.2	Vnos datotek v orodje PrimerExplorer in razvoj začetnih oligonukleotidov	12
3.2.4	Vstavljanje večpomenskih IUPAC oznak za nukleotide na znotrajvrstnih variabilnih mestih.....	16
3.2.5	Ponovitev z obratnim komplementom.....	16
3.3	Preverjanje specifičnosti pomnoževanja DNA z razvitimi začetnimi oligonukleotidi	16
4	REZULTATI IN DISKUSIJA	18
4.1	Izbor, prenos in urejanje nukleotidnih zaporedij	18
4.2	Identifikacija haplotipov in krajšanje zaporedij.....	20
4.3	Priprava zaporedij za vnos v Primer Explorer.....	20
4.4	Določitev začetnih oligonukleotidov z orodjem Primer Explorerjem v5 in končni izbor setov začetnih oligonukleotidov	22
4.5	Preverjanje prileganja na nukleotidna zaporedja ostalih vrst lignjev.....	25
5	ZAKLJUČEK	27
6	LITERATURA IN VIRI.....	28

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Število prenesenih zaporedij glede na vrsto in gen	18
Preglednica 2: Število zaporedij in haplotipov gena <i>COI</i> po odstranitvi neustreznih zaporedij.....	20
Preglednica 3: Set začetnih oligonukleotidov z oznako ID23.....	24
Preglednica 4: Končno nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov z oznako ID23 z IUPAC oznakami	24

KAZALO SLIK IN GRAFIKONOV

Slika 1: Grafični prikaz pomnoževanja DNA z LAMP metodo [16].....	5
Slika 2: Primerik lignja <i>Loligo vulgaris</i> [17].....	6
Slika 3: Geografska razširjenost vrste <i>Loligo vulgaris</i> [20]	7
Slika 4: Postopki pri uporabi orodja PrimerExplorer za uvoz datoteke, pridobljene z orodjem MorphoCatcher (a) in določitev razvoja specifičnih začetnih oligonukleotidov (b). V kategoriji »Design Option« smo izbrali »Specific«, saj smo želeli pridobiti začetne oligonukleotide specifične za pomnoževanje konsenznega zaporedja <i>Loligo vulgaris</i> in nadaljevali z »Generate«. V spodnjem okencu se prikaže število setov začetnih oligonukleotidov, ki jih je PrimerExplorer določil. S klikom na »Display« se odpre grafični prikaz, ki prikaže kako začetni oligonukleotidi iz različnih setov prilegajo na tarčno zaporedje.	13
Slika 5: Postopki pri uporabi orodja PrimerExplorer za pregled ponujenih setov začetnih oligonukleotidov: a) Obkljukamo vse sete začetnih oligonukleotidov in potrdimo s »Confirm«. b) Po zaključenem postopku prikazanem v delu a se prikažejo preglednice s podrobnejšimi podatki o začetnih oligonukleotidih za vsak set posebej.	14
Slika 6: Prikaz naleganja štirih začetnih oligonukleotidov v oknu orodja PrimerExplorer po vnosu PrimerInfo datoteke. S klikom na »Generate« PrimerExplorer preveri, če je možno med mestom F1 in B2c določiti mesto za prileganje dodatnega začetnega oligonukleotida.	15
Slika 7: Rezultat orodja MAFFT v primeru, ko je med analiziranimi zaporedji tudi nasprotno orientirano zaporedje, takrat so točke v točkovnem grafu so prikazane z modro črto. V nastavitvah smo določili, da orodje v takem primeru samodejno prepíše zaporedje v komplementarno.	19
Slika 8: Primer vhodne datoteke za MorphoCatcher.....	21
Slika 9: Graf povprečnega mutacijskega indeksa za vrsto <i>D. gigas</i> in konsenzno zaporedje <i>L. vulgaris</i>	21
Slika 10: Primer vhodne datoteke za PrimerExplorer v5, ki jo pripravi orodje MorphoCatcher. Zvezdica označuje enak nukleotid med konsenznim zaporedjem <i>L. vulgaris</i> in vsemi haplotipi <i>D. gigas</i> , črtice pa so na mestih, kjer se zaporedja med vrstama razlikujejo.....	22
Slika 11: Primer grafičnega prikaza regij, identificiranih za prileganje začetnih oligonukleotidov. Z zelenimi velikimi tiskanimi črkami je prikazan začetni oligonukleotid F3, z malimi B3. Z modrimi velikimi tiskanimi je prikazana regija F2, z malimi pa B2. S črnimi velikimi tiskanimi je prikazana regija B1c, z malimi pa F1c.....	23
Slika 12: Primer izpisa podatkov za set ID23 z orodjem PrimerExplorer v5.....	23
Slika 13: Graf pomnoženih zaporedij za začetne oligonukleotide seta ID23. a) F3 in B3, b) F2 in B2, c) F1c in B1c, d) F3 in B2, e) F2 in B3.....	25

KAZALO PRILOG

Priloga A: Metapodatki prenesenih zaporedij vrste <i>Loligo vulgaris</i> , pridobljenih z EDirect orodjem.....	30
Priloga B: Skripta za R paket primerTree za testiranje specifičnosti prileganja z začetnimi oligonukleotidi F3 in B3 iz seta ID23.....	31
Priloga C: Primer rezultatov (prikazanih je le prvih 30 vrstic) analize v R s primerTree z začetnima oligonukleotidoma F3 in B3 iz seta ID 23.....	32

SEZNAM KRATIC

B1c – regija začetnega oligonukleotida BIP

B2 – regija začetnega oligonukleotida BIP

B3 – protismerni zunanji začetni oligonukleotid 3 (*angl. backward outer primer 3*)

BIP – protismerni notranji začetni oligonukleotid (*angl. backward inner primer*)

bp – bazni par

COI – citokrom c oksidaza podenota 1 (*angl. cytochrome c oxidase subunit 1*)

cyt b – citokrom b oksidaza

DNA – deoksiribonukleinska kislina (*angl. deoxyribonucleic acid*)

F1c – regija začetnega oligonukleotida FIP

F2 – regija začetnega oligonukleotida FIP

F3 – smerni zunanji začetni oligonukleotid 3 (*angl. forward outer primer 3*)

FIP – smerni notranji začetni oligonukleotid (*angl. forward inner primer*)

LAMP – metoda izotermalnega pomnoževanja z zanko (*angl. Loop-mediated Isothermal Amplification*)

LoopA – smerni začetni oligonukleotid zanke (*angl. forward loop primer*)

LoopB – protismerni začetni oligonukleotid zanke (*angl. backward loop primer*)

NCBI – Ameriški Nacionalni center za biotehnološke podatke (*angl. National Center for Biotechnology Information*)

rRNA – ribosomska RNA

XML – razširljivi označevalni jezik (*angl. Extensible Markup Language*)

1 UVOD

Zaradi naraščanja prebivalstva se povečuje tudi povpraševanje po morski hrani, hkrati so številni ribolovni viri ogroženi zaradi čezmernega ribolova in številnih pritiskov v morskem okolju kot so onesnaženje, segrevanje morij zaradi podnebnih sprememb, itd. [1]. Poleg čezmernega ribolova se v nekaterih delih sveta še vedno pojavlja nereguliran in ilegalen ribolov, ki čezmerno izkorišča morske vire. Zaradi predelave (npr. filetiranje) ter velikega števila ribolovnih vrst, se je potrošniku izjemno težko prepričati, katera vrsta ribe je na prodaj. Pri potvarjanju se soočamo z dvema vidikoma – nenamerno zamenjavo vrst (vrste, ki so težko določljive ali so lahko prilov) ter namerno zavajanje za pridobitev ekonomske koristi (prikrivanje ilegalnega ribolova, prodajanje manj kakovostnih vrst pod imeni bolj cenjenih vrst) [1]. Potrošnik je zato nemočen in nepravilna identifikacija vrst lahko povzroči, da je kupljeni proizvod preplačan, ali celo predstavlja grožnjo za zdravje (nekateri vrste povzročajo alergije, ribe iz onesnaženih območij, ki imajo višje koncentracije onesnažil v telesu, itd.).

Lignji so zelo cenjena konzumna vrsta, še posebej vrsta *Loligo vulgaris* (Lamarck, 1798), ki je pri nas avtohtona vrsta. Ko so ulovljeni osebkci očiščeni ali že pripravljeni, je zelo težko prepoznati vrsto, zato je za potrjevanje pristnosti živil nujno potreben zanesljiv laboratorijski test. Poleg tega so nekatere vrste lignjev tudi zelo alergene in lahko povzročijo hude alergijske reakcije pri ljudeh [1].

V okviru projekta »Uporaba tehnologije DNA za ugotavljanje poneverb v ribiških proizvodih z vrednotenjem socio ekonomskih vidikov« (št. projekta V1-1808 iz sheme Ciljni raziskovalni program (CRP) Zagotovimo.si hrano za jutri) med drugimi aktivnostmi poteka razvoj metod za natančno identifikacijo vrst v izbranih ribiških proizvodih. V zaključni nalogi smo predstavili protokol za razvoj vrstno specifičnih začetnih oligonukleotidov za metodo z zanko posredovanega izotermalnega pomnoževanja (LAMP) na primeru DNA zaporedij, ki kodirajo mitohondrijski encim citokrom c oksidazo podenoto I (*COI*) iz vrste lignjev *Loligo vulgaris*. Test bo omogočal hitro in natančno identifikacijo vrste lignjev *Loligo vulgaris*, zato bo primerno orodje za odkrivanje morebitnih poneverb.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 Markerji za barkodiranje

Za identifikacijo vrst so v uporabi različne regije jedrne ali mitohondrijske molekule DNA, ki se med vrstami dovolj razlikujejo, da omogočajo zanesljivo identifikacijo. Tovrstne regije imenujemo tudi barkode [2]. Najpogosteje uporabljene jedrne regije za barkodiranje lignjev so: notranja prepisana regija 1 in 2 (*angl. internal transcribed spacer*) oz. ITS1 in ITS2, gen za citokrom c oksidazo podenota I (*COI*), geni za 18S ribosomsko RNA, 16S ribosomsko RNA, 12S ribosomsko RNA, aktin in še nekateri geni z jedrne DNA [3]. Markerji za barkodiranje so v uporabi za različne vrste rastlin, živali, bakterij, itd., vendar se bomo v nadaljevanju osredotočili na markerje za barkodiranje vrst iz razreda glavonožci.

2.1.1 Citokrom c oksidaza podenota I (*COI*)

Gen za citokrom c oksidazo podenota I (*COI*) je bil večkrat potrjen kot zanesljiv marker za identifikacijo vrst lignjev [4] in na splošno velja za enega najbolj ohranjenih genov v mitohondrijskem genomu živali [5]. Znotrajvrstna variabilnost gena je občutno manjša od medvrstne, kar pomeni, da je primeren za barkodiranje [6]. Za identifikacijo se najpogosteje uporablja 710 bp dolgo zaporedje, pomnoženo s t.i. Folmerjevimi začetnimi oligonukleotidi [5].

Ye in sodelavci [1] so za razvoj vrstno specifičnih LAMP začetnih oligonukleotidov za vrsto *Dosidicus gigas* (d'Orbigny, 1835) uporabili marker *COI*. Za določanje začetnih oligonukleotidov so uporabili Primer Explorer v4. Uspešnost pomnoževanja začetnih oligonukleotidov so testirali na 20 različnih vzorcih morskih živil, od katerih je 15 vzorcev vsebovalo lignje *D. gigas*, *O. bartramii* (Lesueur, 1821), *I. argentinus* (Castellanos, 1960), *T. pacificus* (Steenstrup, 1880), ostalih pet pa je vsebovalo hobotnico *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) in sipo *Sepia pharaonis* (Ehrenberg, 1831). V desetih vzorcih se potrdili prisotnost vrste *D. gigas*, za ostalih pet vzorcev, pa so bili rezultati po 30 minutah negativni. Ko so postopek ponovili s klasično PCR reakcijo so dobili enak rezultat, s čimer so potrdili zanesljivost metode LAMP na osnovi gena *COI*.

Gebhardt in Knebelsberger [6] sta preverjala uporabnost genov *COI* in 18S rDNA za barkodiranje glavonožcev. Rezultati barkodiranja so pokazali, da je gen *COI* primeren za ločevanje sorodnih vrst.

2.1.2 Citokrom b oksidaza (*cyt b*)

Gen za citokrom b oksidazo se nahaja na mitohondrijski DNA in ima pomembno vlogo pri oksidativni fosforilaciji [7]. Zaradi velikega števila kopij gena v vsaki celici in medvrstne variabilnosti je primerna regija za filogenetske študije in potrjevanje vrste [8].

V preteklosti je gen za citokrom b oksidaza že bil uporabljen za barkodiranje vrst rib [9] in za potrjevanje živil iz polenovke [10]. Saull in sod. [8] so uporabili gen *cyt b* za potrjevanje vrste *Gadus morhua* (Linnaeus, 1758). Zaporedja so prenesli iz podatkovne zbirke GenBank. Začetni oligonukleotidi za metodo LAMP so se izkazali za zelo specifične, saj niso pomnožili nobene druge vrste iz rodu *Gadus*.

2.1.3 18S rDNA

Gen za 18S rRNA je eden od najpogostejše uporabljenih markerjev za filogenetske študije in za identifikacijo vrst. Večje število kopij v jedrnem genomu in zelo ohranjene regije omogočajo uporabo univerzalnih začetnih oligonukleotidov in s tem enostavno pomnoževanje [6]. V prej omenjeni študiji znanstvenikov Gebhardtove in Knebelsbergerja [6] je bila poleg gena *COI* za potrjevanje vrst uporabljena tudi 18S rDNA. Tako kot s *COI*, so tudi z 18S rDNA uspešno ločili vrste, a pri tem glede na nižje bootstrap vrednosti ni bila tako zanesljiva. Tudi pri pomnoževanju in sekvenciranju je bilo več težav kot pri pomnoževanju regije *COI* [6].

2.1.4. 16S rDNA

Mitohondrijska 16S rDNA je pomemben marker v filogenetskih in evolucijskih študijah bakterij in evkariontskih organizmov [11]. 16S rDNA je bila uporabljena v študiji Sina s sod. [4], kjer so preverili genetsko raznolikost med vrstama *Uroteuthis edulis* (Hoyle, 1885) in *Uroteuthis chinensis* (Gray, 1849). Ugotovili so, da je na genetski osnovi razlika med vrstama očitna.

2.2 Lastnosti LAMP metode

Metodo LAMP je razvil Notomi s sod. (2000). Prednost te metode je, da pomnoževanje DNA poteka pri stalni temperaturi. Metoda omogoča specifično pomnoževanje DNA in je v primerjavi z drugimi molekularnimi metodami manj zahtevna za izvedbo. Za pomnoževanje DNA so potrebni štirje začetni oligonukleotidi (F3, B3, FIP in BIP) ali še dodatna dva, ki

priležeta na zanko (LoopA, LoopB), posebna DNA-polimeraza (*Bst* DNA polimeraza), ki učinkovito odstranjuje nastalo verigo od matrične verige, gradniki DNA deoksinukleotidi (dNTP-ji). Reakcija pomnoževanja poteka ves čas pri isti temperaturi med 60 in 65 °C. Danes poznamo številna preoblikovanja metode LAMP [12].

Zaradi visoke specifičnosti pomnoževanja in hitre izvedbe je metoda zelo uveljavljena za identifikacijo mikroorganizmov v različnih vedah od medicinske mikrobiologije do kmetijstva. Kogovšek in sod. [13] so razvili metodo LAMP za potrjevanje prisotnosti fitoplazme, ki v vinski trti povzroča zlato trsno rumenico [14]. Metodo LAMP so uporabili za dokazovanje katere vrsta mesa vsebujejo močno predelani izdelki iz perutnine, svinjine in govedine.

2.2.1 Opis metode LAMP

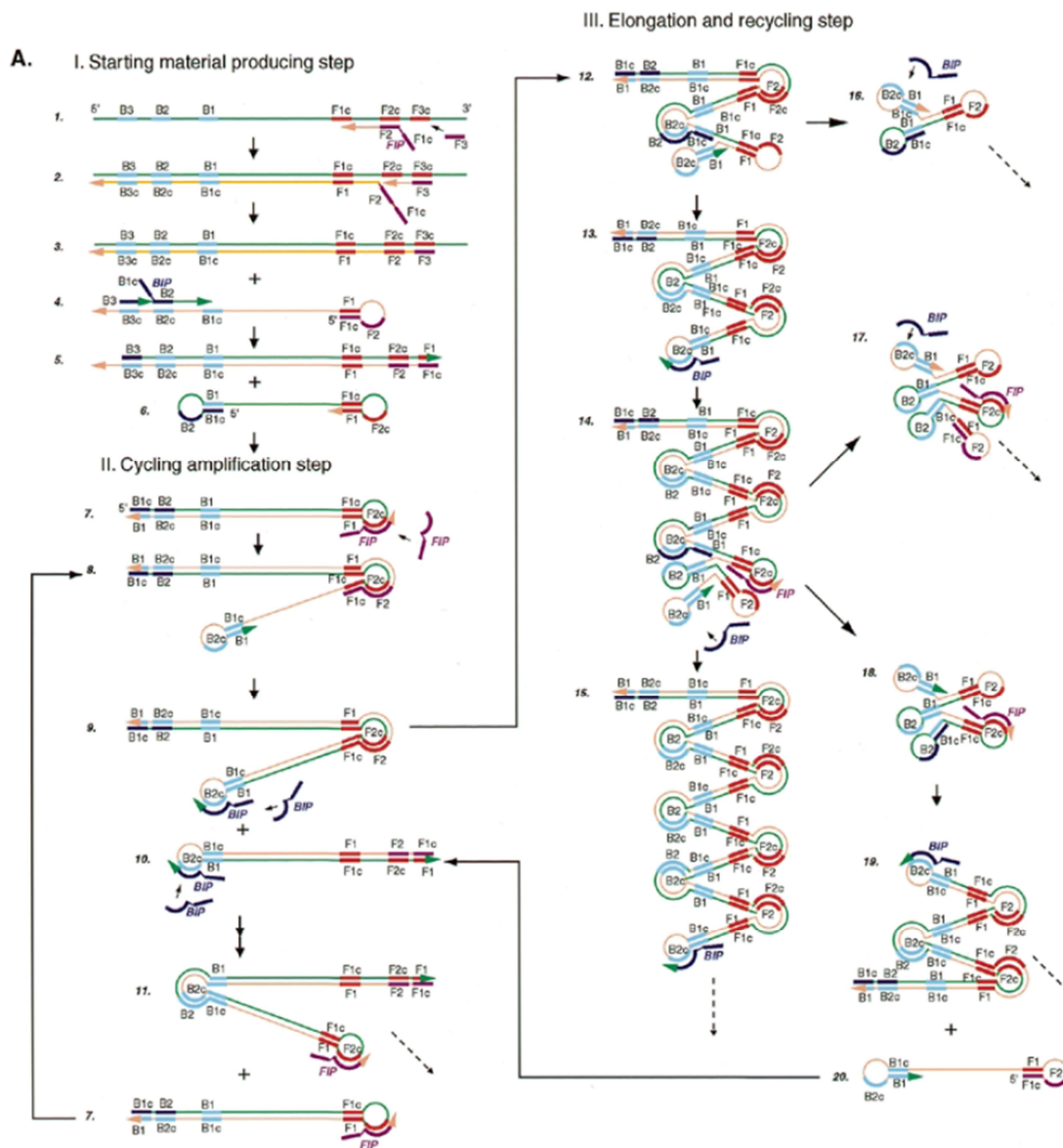
Metoda LAMP temelji na izpodrivanju verige DNA z DNA polimerazo in dveh specifično oblikovanih zunanjih ter dveh notranjih začetnih oligonukleotidov. V zgodnji fazi reakcije LAMP so uporabljeni vsi štirje začetni oligonukleotidi, v kasnejši fazi, ko pride do cikličnega pomnoževanja, pa je najpomembnejše prileganje notranjih začetnih oligonukleotidov, ki omogočata sintezo DNA s pomočjo izpodrivanja. Notranja začetna oligonukleotida se imenujeta notranji smerni začetni oligonukleotid (FIP) in notranji protismerni začetni oligonukleotid (BIP). Vsak od njiju prilega na dve mesti tarčne DNA. FIP je sestavljen iz zaporedja F1c, TTTT povezovalne DNA in zaporedja F2, BIP pa iz zaporedja B1c, TTTT povezovalne DNA in zaporedja B2. Zunanja začetna oligonukleotida sta F3 in B3.

Postopek poteka metode je prikazan na sliki 1. FIP začetni oligonukleotid prileže na mesto F2c tarčne DNA, F3 pa na mesto F3c in tako se začne izpodrivajoča sinteza komplementarne verige (DNA, ki se sintetizira od začetnega oligonukleotida F3 izpodriva DNA, ki nastaja od začetnega oligonukleotida FIP in na 5' koncu se ustvari struktura zanke (slika 1, zap. št. 4)). Ta enojna veriga DNA služi kot matrica za sintezo s protismernim začetnim oligonukleotidom BIP, kar vodi v nastanek strukture v obliki ročice (slika 1, zap. št. 6). Na sliki 1, zap. št. 7 vidimo strukturo produkta reakcije LAMP, ki se v nadaljevanju ciklično pomnožuje z začetnima oligonukleotidoma FIP in BIP.

Pri cikličnem pomnoževanju nastane veliko dvojnih vijačnic z večjim številom kopij v obliki ročice, kar pomeni več primernih mest za nastajanje novih struktur (slika 1 oznaka 8-18). Pomnoževanje DNA poteka izredno hitro, zato ga je mogoče zaznati z različnimi tehnikami.

Da bi reakcijo še bolj pohitrili, lahko dodamo smerni začetni oligonukleotid zanke LoopA in protismerni začetni oligonukleotid zanke LoopB, ki ustvarita dodatna začetna mesta za sintezo DNA. LoopA prileže na regijo med F1 in F2, LoopB pa na regijo med B1 in B2.

Poskusi so pokazali, da lahko z uporabo smernega in protismernega začetnega oligonukleotida zanke reakcijo skrajšamo za polovico ali celo za dve tretjini [15].



Slika 1: Grafični prikaz pomnoževanja DNA z LAMP metodo [16]

2.2.2 Primeri uporabe metode LAMP za identifikacijo rib

Saull in sod. [8] so uporabili metodo LAMP za potrjevanje vrste trske *Gadus morhua*. Nukleotidna zaporedja gena za citokrom b oksidazo so prenesli s spletne podatkovne zbirke GenBank. Za določitev štirih začetnih oligonukleotidov (F3, B3, FIP in BIP) so uporabili PrimerExplorer v4, za določitev dodatnih dveh začetnih oligonukleotidov, ki prilegata na strukturo zanke, pa se niso odločili.

Začetni oligonukleotidi niso pomnožili DNA dveh sorodstveno najbližjih trsk *G. morhua* (pacifiška trska *G. macrocephalus* (Tilesius, 1810) in aljaška trska *G. chalcogrammus* (Pallas, 1814)), kar potrjuje specifično prileganje začetnih oligonukleotidov. Raziskovalci so specifičnost pomnoževanja dosegli z izbiro regije prileganja, ki je vsebovala osem variabilnih mest med vrstami. Z metodo je bilo mogoče potrditi prisotnost trske *G. morhua* že pri 1 mg tkiva med 100 mg tkiva drugih vrst [8].

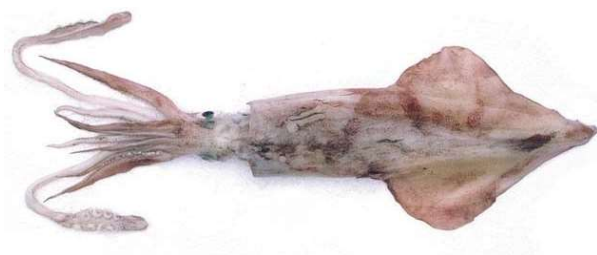
Ye in sod. [1] so razvili metodo LAMP za specifično detekcijo vrste *Dosidicus gigas* z nukleotidnimi zaporedji gena *COI*. Začetne oligonukleotide F3, B3, FIP in BIP so določili z orodjem PrimerExplorer v4 in specifičnost preverili z orodjem BLAST (*angl. Basic Local Alignment Search Tool*).

DNA *D. gigas* se je uspešno pomnožila po 20 minutah. Metoda je bila izjemno natančna, saj je bilo mogoče zaznati 1 g vzorca *D. gigas* v 1000 g mešanici glavonožcev. Rezultati LAMP metode so bili primerljivi z rezultati kvantitativnega PCR-ja [1].

2.3 Opis vrste *Loligo vulgaris*

Lignji tvorijo izjemno vrstno bogato skupino, ki sodi v razred glavonožcev. Ligenj *Loligo vulgaris* sodi v družino lignjev Lolinginidae, ki ima 10 rodov z velikim številom vrst, ki jih je težko ločiti med sabo na podlagi morfoloških znakov.

Telo lignja je dolgo, zmerno ozko in valjaste oblike. Plavut ima obliko romba in meri približno dve tretjini dolžine plašča. Dolžina plašča pri moškem osebkju meri do 42 centimetrov in 32 pri ženskem, navadno pa zrastejo do dolžine 25 oz. 15 centimetrov. Glava lignja je relativno majhna z velikimi očmi. Okoli ust ima 10 lovčkov. Osem jih je relativno kratkih, medtem ko sta preostali dve daljši, saj jih ligenj uporablja za lov.

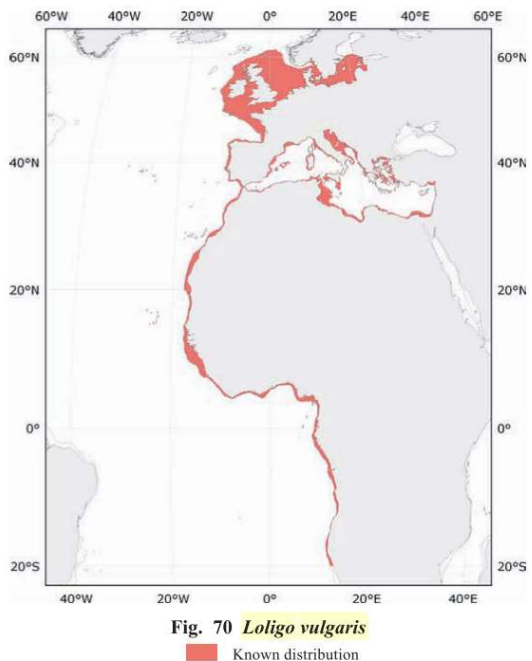


Slika 2: Primerek lignja *Loligo vulgaris* [17]

Lignji *L. vulgaris* so sivkasto ali rdečkasto prozorne barve, odvisno od širitve pigmentnih celic [18]. Običajno tehtajo do 1,5 kilograma [19].

V zahodnem Sredozemskem morju je *L. vulgaris* ekonomsko ena od najpomembnejših vrst glavonožcev. Na trgu vrsta dosegla najvišje cene. Največja lovišča so na Portugalskem, v

zahodnem delu Afrike in zahodnem Sredozemskem morju [20]. V Jadranskem morju vsako leto ulovijo med 1000 in 1500 ton lignjev vrste *L. vulgaris* [18].



Slika 3: Geografska razširjenost vrste *Loligo vulgaris* [20]

Prehranjujejo se večinoma z ribami in raki, redkeje se lahko pojavi tudi kanibalizem. Mladi lignji se prehranjujejo predvsem s planktonom in ribjimi jajčeci, pri odraslih pa prevladuje prehranjevanje z ribami. Vrsta je plen za mnoge ribe in kite, še posebno za delfine, mečarice, gofe in ostale.

Pri moških osebkih lahko občasno opazimo črte na prsni strani, kot jih lahko opazimo pri vrsti *Loligo forbesii* (Steenstrup, 1857), a so manjše in manj intenzivno obarvane. V študiji objavljeni leta 1988 sta znanstvenika Augustyn in Grant [21] predlagala, da bi vrsto *Loligo reynaudii* (d'Orbigny, 1841) označili kot podvrsto vrste *L. vulgaris*, a je Vecchione s sodelavci v študiji leta 2005 ponovno vzpostavil mnenje, da gre za dve ločeni vrsti [20].

3 MATERIAL IN METODE

3.1 Identifikacija vrst lignjev za vključitev v analizo ter izbor referenčnih nukleotidnih zaporedij

Različne vrste lignjev je med sabo izjemno težko razlikovati zato si raziskovalci prizadevajo, da bi za potrebe ribiške industrije in nadzornih organov razvili hitre, zanesljive in specifične teste za identifikacijo. Odločili smo se, da bomo naredili set začetnih oligonukleotidov specifičnih za vrsto *Loligo vulgaris*.

Pri izbiri markerjev je potrebno upoštevati, da mora biti izbrana regija čim bolj ohranjena z majhno znotrajvrstno variabilnostjo, ter čim bolj variabilna med vrstami. Tej razliki pravimo tudi »barcoding gap« in je ključna za uspešno izbiro markerjev za barkodiranje [6].

Na osnovi pregleda literature smo se odločili, da bomo proučili možnost za razvoj metode LAMP na osnovi nukleotidnih zaporedij naslednjih genov: 16S rDNA, 18S rDNA, citokrom b oksidaza (*cyt b*) in citokrom c oksidaza podenota I (*COI*). Zaporedja smo prenesli iz podatkovne zbirke GenBank na način, ki je opisan v nadaljevanju. Primerjali smo nukleotidna zaporedja več vrst, da bi zagotovili specifičnost začetnih oligonukleotidov za *L. vulgaris*.

3.1.1 Prenos zaporedij in metapodatkov z orodjem EDirect

Prenos nukleotidnih zaporedij smo izvedli z lokalno nameščenimi orodij iz programskega paketa EDirect [22]. Omenjena orodja omogočajo dostop do podatkovnih zbirk, ki jih ureja ameriški Nacionalni center za biotehnoške podatke (NCBI) preko UNIX-ove ukazne vrstice. Funkcije programa uporabijo iskalne argumente, ki jih uporabnik vpiše v ukazno vrstico.

Primer ukaza za iskanje in shranitev nukleotidnih zaporedij gena *COI* vrste *L. vulgaris*:

```
$ esearch -db nucleotide -query "(Loligo vulgaris[Organism] AND  
coi[Gene Name])" | efetch -format fasta > rezultat.fasta
```

Pomen parametrov [22]:

<code>esearch</code>	ukaz za iskanje po podatkovni zbirki
<code>-db</code>	ukaz za izbor podatkovne zbirke (v našem primeru podatkovna zbirka nukleotidnih zaporedij »nucleotide«)
<code>-query</code>	ukaz za določitev iskalnega gesla

	vmesnik med dvema procesoma (<i>angl. pipe</i>), ki izhod iz prvega procesa preusmeri na vhod naslednjega procesa
-format	ukaz, ki rezultate iskanja pretvori v želeno obliko zapisa
>	ukaz za zapis podatkov v datoteko z določenim imenom

Zgornji ukaz smo izvedli za vsako izmed sedmih vrst (*Loligo vulgaris*, *Loligo forbesii*, *Loligo reynaudii*, *Uroteuthis chinensis*, *Illex coindetii*, *Dosidicus gigas* in *Doryteuthis gahi*), ter za vse izbrane gene in tako pridobili nukleotidna zaporedja v fasta datoteki.

Poleg zaporedij v fasta obliki, smo prenesli tudi metapodatke zaporedij (vrsta lignjev, naslov članka, če so bila zaporedja objavljena v povezavi z znanstveno objavo, avtorji članka, povezava do podatkovne zbirke BOLD in država izvora vzorcev). Rezultate vseh iskanj smo združili v Excelovo preglednico.

Metapodatke smo prav tako kot nukleotidna zaporedja prenesli s funkcijami orodja EDirect.

Primer ukazov za prenos metapodatkov za gen *COI* vrste *Loligo vulgaris*:

```
#Ukaz za prvi set podatkov
$ esearch -db nucleotide -query "Loligo vulgaris[Organism] AND coi[Gene Name]" | efetch -format gpc | xtract -pattern INSDSeq -element INSDSeq_locus INSDSeq_length INSDSeq_accession-version INSDSeq_organism INSDSeq_definition -block INSDReference -if INSDReference_reference -equals 1 -element -first INSDAuthor INSDReference_title INSDReference_journal > rezultati1.txt
```

```
#Ukaz za drugi set podatkov
$ esearch -db nucleotide -query "Loligo vulgaris[Organism] AND coi[Gene Name]" | efetch -format gpc | xtract -pattern INSDSeq -element INSDSeq_locus -block INSDQualifier -if INSDQualifier_value -contains BOLD -element INSDQualifier_value > rezultati2.txt
```

```
#Ukaz za tretji set podatkov
$ esearch -db nucleotide -query "Loligo vulgaris[Organism] AND coi[Gene Name]" | efetch -format gpc | xtract -pattern INSDSeq -element INSDSeq_locus -block INSDQualifier -if INSDQualifier_name -equals isolate -element INSDQualifier_value > rezultati3.txt
```

```
#Ukaz za četrti set podatkov
esearch -db nucleotide -query "Loligo vulgaris[Organism] AND coi[Gene Name]" | efetch -format gpc | xtract -pattern INSDSeq -element INSDSeq_locus -block INSDQualifier -if INSDQualifier_name -equals country -element INSDQualifier_value > rezultati4.txt
```

Pridobljene rezultate (tekstovne datoteke, ki so imele s tabulatorji ločene vrednosti) smo v skupno preglednico združili v programu R.

Pomen posameznih parametrov v zgornjih ukazih:

xtract	ukaz za luščenje podatkov iz XML datoteke
-pattern (<i>angl. vzorec</i>)	ukaz, s katerim omejimo iskanje na en predel XML datoteke in določimo začetek nove vrstice ("pattern" je najvišja oznaka v hierarhični razvrstitvi elementov xml)
-block (<i>angl. celica</i>)	ukaz, s katerim omejimo iskanje na določeno skupino elementov (<i>angl. group</i>)
-element	ukaz, ki zazna in izpiše podatke iz argumenta, ki mu ga podamo

Ker je bilo v nukleotidni podatkovni zbirki GenBank največ nukleotidnih zaporedij gena *COI* smo nadaljnje analize izvedli samo z nukleotidnimi zaporedji gena *COI*.

V analizo smo vključili tudi zaporedja gena *COI* referenčnih osebkov vrste *L. vulgaris*, ki so jih pridobili s sekvenciranjem raziskovalci na Nacionalnem inštitutu za biologijo v okviru projekta CRP (št. projekta V1-1808).

3.1.2 Pravilna usmeritev in poravnava zaporedij z orodjem MAFFT ter identifikacija haplotipov

Pridobljena nukleotidna zaporedja smo poravnali z orodjem MAFFT v. 7 [23] (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) in preverili ali so vsa določena na osnovi iste verige molekule DNA (matrična ali kodirajoča). Nasprotno orientirane, v primerjavi s prvim zaporedjem, ki smo ga določili za referenčno zaporedje, smo prepisali v komplementarno zaporedje v smeri 5'-3'.

Za vsako vrsto smo določili haplotipe, zato da smo lahko izločili redundantna zaporedja in tako zmanjšali število nukleotidnih zaporedij za nadaljnje delo. Za določitev haplotipov smo zaporedja analizirali s programom DnaSP v. 6 [24].

Po vnosu datotek smo izbrali možnost »Generate« in nadalje »Haplotype data...«. Za določitev haplotipov smo uporabili privzete nastavitve.

Zaporedja smo poravnali s programom MEGA v. 6 [25] ter začetni in končni del poravnave odstranili tako, da je bilo pri vseh haplotipih vseh vrst prisotno enako dolgo zaporedje.

Nato smo haplotipe shranili v fasta datoteke ločene po vrstah.

3.1.3 Priprava konsenznega zaporedja *L. vulgaris* za razvoj LAMP začetnih oligonukleotidov

Ker trenutno ni na voljo bioinformacijskega orodja, s katerim bi lahko razvili metodo LAMP z upoštevanjem znotrajvrstne raznolikosti, smo pripravili konsenzno (najpogosteje ugotovljeno) nukleotidno zaporedje vrste *L. vulgaris* na osnovi zaporedij haplotipov, ki smo jih identificirali iz zaporedij DNA pridobljenih v okviru projekta CRP (št. projekta V1-1808).

Haplotipe *L. vulgaris* smo prenesli v CodonCode Aligner v. 9, ki ima možnost določitve konsenznega zaporedja. Program na variabilnih mestih izbere nukleotid, ki je najbolj pogost med zaporedji.

Za zagotovitev pomnoževanja DNA vseh haplotipov *L. vulgaris*, smo pridobljene začetne oligonukleotide, v kolikor so prilegli na znotrajvrstna variabilna mesta, nadomestili z IUPAC oznakami, ki označujejo več nukleotidov (npr. Y pomeni kombinacijo C in T).

3.2 Razvoj začetnih oligonukleotidov

Razvoj metode LAMP smo zastavili tako, da smo na osnovi konsenznega zaporedja pridobili več setov začetnih oligonukleotidov specifičnih za detekcijo konsenznega zaporedja *L. vulgaris* v primerjavi s haplotipi preostalih vrst vključenih v razvoj metode (seti začetnih oligonukleotidov so bili določeni za vsako vrsto posebej). Pridobljene sete smo primerjali in izbrali tiste, ki so bili skupni vsem primerjavam (ti seti so potemtakem glede na orodje PrimerExplorer v5 [26] specifični le za pomnoževanje konsenznega zaporedja *L. vulgaris*). Vhodno datoteko za orodje PrimerExplorer v5 smo pripravili s spletnim orodjem MorphoCatcher [27].

3.2.1 Vnos datotek v MorphoCatcher

MorphoCatcher je spletno bioinformacijsko orodje, ki olajša pripravo vhodne datoteke za orodje PrimerExplorer [27]. Na osnovi predhodne poravnave z orodjem Clustal Omega omogoča samodejno določitev mest v nukleotidnem zaporedju, kjer se referenčno zaporedje (v našem primeru konsenzno zaporedje *L. vulgaris*) razlikuje od haplotipov druge vrste.

Vhodno datoteko za MorphoCatcher smo izdelali tako, da smo konsenzno zaporedje vstavili na začetek prej pripravljenih datotek s haplotipi posamezne vrste. Ker MorphoCatcher zaporedja iste vrste ugotavlja na osnovi imena zaporedji, smo spremenili predpone vseh imen zaporedij tako, da se je predpona začela s prvimi tremi črkami rodu in nadaljevala s

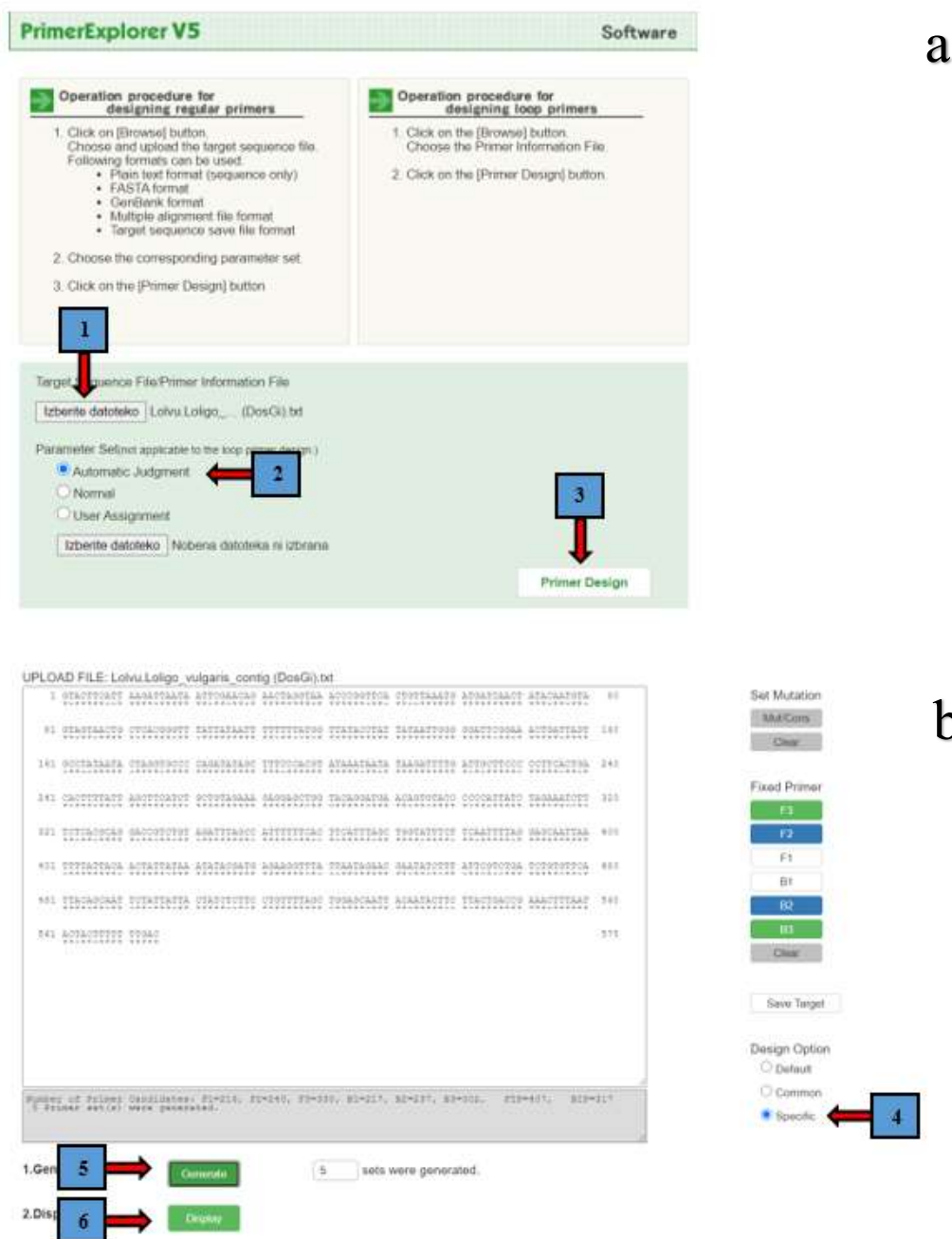
prvima dvema črkama vrste, končala pa se je z znakom »|« (npr. »Dosgi|MH194533.2_Dos_gi«).

Vsako od šestih datotek (za vsako vrsto posebej) smo vnesli v orodje za poravnavo več zaporedij Clustal Omega [28] (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), saj poravnavo pretvori v obliko zapisa, ki jo zna prebrati MorphoCatcher. V nastavitvah smo, kot velevalo navodila za orodje MorphoCatcher, označili, da se po poravnavi ohrani vrstni red nukleotidnih zaporedij ("input" namesto "aligned"), ter da smo vnesli zaporedje DNA (namesto "PROTEIN").

Za vsako primerjavo konsenznega zaporedja *L. vulgaris* z drugimi vrstami smo z orodjem MorphoCatcher pridobili grafični prikaz povprečja mutacijskega indeksa in vhodno datoteko z označenimi mesti, na katerih se je konsenzno zaporedje *L. vulgaris* razlikovalo od haplotipov druge vrste. MorphoCatcher z izračunom mutacijskega indeksa določi najprimernejše regije zaporedja za razvoj metode LAMP. Avtorji orodja MorphoCatcher navajajo, da bi za uspešen razvoj metode LAMP bilo potrebno izbrati regijo z mutacijskim indeksom nad 2 [27].

3.2.2 Vnos datotek v orodje PrimerExplorer in razvoj začetnih oligonukleotidov

V Primer Explorer smo od vsake primerjave posebej vnesli vhodne datoteke, ki smo jih pridobili z orodjem MorphoCatcher. Sete začetnih oligonukleotidov za metodo LAMP smo določili s privzetimi nastavitvami (slika 4).



Slika 4: Postopki pri uporabi orodja PrimerExplorer za uvoz datoteke, pridobljene z orodjem MorphoCatcher (a) in določitev razvoja specifičnih začetnih oligonukleotidov (b). V kategoriji »Design Option« smo izbrali »Specific«, saj smo želeli pridobiti začetne oligonukleotide specifične za pomnoževanje konsenznega zaporedja *Loligo vulgaris* in nadaljevali z »Generate«. V spodnjem okencu se prikaže število setov začetnih oligonukleotidov, ki jih je PrimerExplorer določil. S klikom na »Display« se odpre grafični prikaz, ki prikaže kako začetni oligonukleotidi iz različnih setov prilegajo na tarčno zaporedje.

PrimerExplorer v5 ponudi več setov začetnih oligonukleotidov, ki ustrezajo privzetim nastavitvam za specifično pomnoževanje želenega nukleotidnega zaporedja (slika 5).

a

b

PrimerExplorer V5 Software

1. Turn on the check box to make an order.
2. Push "Confirm" button in order to transfer to page "Order".
3. Push "Save List" button to download Excel format file.

Confirm Save List DesignId 200731023912

7. Set sorting rule [Easy]

Set	Primer (5' to 3')	len	Tm	dG	Sequence			
[23]	CAATATAGCTTTCCACGT	181	200	56.25	-3.48	-6.33	0.45	
[11]	GAAGACACAGCAGGATG	359	381	23	55.74	-3.52	-4.41	0.30
[19]	CTCTCTCTTTCTACAGC	43						
[8]	CAATATAGCTTTCCACGT	47						
[2]	CAATATAGCTTTCCACGT	214	233	20	57.76	-3.17	-6.63	0.45
[1c]	CAATATAGCTTTCCACGT	250	278	23	61.63	-5.93	-4.40	0.48
[B2]	GAAGACACAGCAGGATG	335	358	24	56.00	-3.28	-4.90	0.33
[B1c]	CAATATAGCTTTCCACGT	280	302	23	62.10	-4.23	-5.53	0.52

[outputs: 5 sets] Displayed 1 - 5. DesignId 200731023912

PrimerExplorer V5 Software

1. Push "Primer Information" button to download Primer Information format file for loop primer designing.
2. Push "Save" button to download the primer information in the screen display layout.

Primer Information Save DesignId 200731023912

Set	Primer (5' to 3')	len	Tm	dG	Sequence			
1	CAATATAGCTTTCCACGT	181	200	56.25	-3.48	-6.33	0.45	
B3	GAAGACACAGCAGGATG	359	381	23	55.74	-3.52	-4.41	0.30
F1P	CTCTCTCTTTCTACAGC	43						
B1P	CAATATAGCTTTCCACGT	47						
F2	CAATATAGCTTTCCACGT	214	233	20	57.76	-3.17	-6.63	0.45
F1c	CAATATAGCTTTCCACGT	250	278	23	61.63	-5.93	-4.40	0.48
B2	GAAGACACAGCAGGATG	335	358	24	56.00	-3.28	-4.90	0.33
B1c	CAATATAGCTTTCCACGT	280	302	23	62.10	-4.23	-5.53	0.52

Primer Information Save

Set	Primer (5' to 3')	len	Tm	dG	Sequence			
2	CAATATAGCTTTCCACGT	44	64	21	55.71	-5.79	-4.32	0.38
B3	GAAGACACAGCAGGATG	237	260	24	56.55	-4.15	-4.91	0.33
F1P	CTCTCTCTTTCTACAGC	50						
B1P	CAATATAGCTTTCCACGT	43						
F2	CAATATAGCTTTCCACGT	67	91	25	56.06	-3.12	-5.40	0.32
F1c	CAATATAGCTTTCCACGT	125	149	25	61.27	-5.55	-3.96	0.40

Slika 5: Postopki pri uporabi orodja PrimerExplorer za pregled ponujenih setov začetnih oligonukleotidov: **a)** Obkljukamo vse sete začetnih oligonukleotidov in potrdimo s »Confirm«. **b)** Po zaključenem postopku prikazanem v delu a se prikažejo preglednice s podrobnejšimi podatki o začetnih oligonukleotidih za vsak set posebej.

Kot omenjeno v pregledu literature, lahko za metodo LAMP določimo štiri začetne oligonukleotide ali šest. V predhodno predstavljenem postopku dela z orodjem PrimerExplorer v5 smo pridobili sete s štirimi začetnimi oligonukleotidi. Za določitev dodatnih dveh začetnih oligonukleotidov, ki prilegata na zanko, je potrebno datoteko

PrimerInfo (ki jo pridobimo ob zaključku prvega dela tako, da kliknemo na gumb Primer Information) ponovno uvoziti v PrimerExplorer v5 (slika 6).

UPLOAD FILE: PrimerInfo

1	GTACTTCATT AAGATTAATA ATTGACACAG AAC TAGGTAA ACCCGGTTCA CTGTTAATG ATGATCRACT ATACAATGTA	80
81	TGAGTAACTG CTCACGGGTT TATTATAATT TTTTTTATGG TTATACCTAT TATAATTGGG GGATTGGGAA ACTGATTAGT	160
161	GCTATATAATA CTAGGTGCCG CAGATATAGC TTTCCACAGT ATAATAATA TAAGATTTTG ATTGCCTCCC CCTCAACTGA	240
	<=====F 3=====>	<=======F2===== ==>
241	CACTTTTTAT AGCTTCARCT GCTGTAGAAA GAGGAGCTGG TACAGGATGA ACAGTGTACC CCCCATTTATC TAGAAATCTT	320
	<==== =====F1===== <	===== B1===== =>
321	TCTCACGACG GACCGTCTGT AGATTTAGCC ATTTTTCAC TTCATTTAGC TGGTATTTCT TCAATTTTATG GAGCAATTA	400
	<=====B2===== <=	===== B3===== >
401	TTTTATTACA ACTATTATAA ATATACGATG AGAAGGTTTA TTAATAGAAC GAATATCTTT ATTCTGCTGA TCCTGTGTCA	480
481	TTCAGACAA TCTATTATTA CTATCTCTTC CTGTTTTAGC TGGAGCAATT ACAATACTTC TTAAGTACCC AAACCTTTAAT	560
561	ACTACTTTTT TGAC	575

Number of Primer Candidates: LF=0, LB=13
 Filtering by dimer-dg.
 13 Primer piece(s) were generated.

1.Generate

Generate

13 sets were generated.

2.Display

Display

Page 1 Displayed.

Slika 6: Prikaz naleganja štirih začetnih oligonukleotidov v oknu orodja PrimerExplorer po vnosu PrimerInfo datoteke. S klikom na »Generate« PrimerExplorer preveri, če je možno med mestom F1 in B2c določiti mesto za prileganje dodatnega začetnega oligonukleotida.

3.2.3 Preverjanje stabilnosti koncev začetnih oligonukleotidov in končni izbor setov

Z orodjem PrimerExplorer v5 smo pridobili več setov začetnih oligonukleotidov za specifično pomnoževanje konsenznega zaporedja na osnovi primerjave s haplotipi za vsako vrsto posebej. Za izbor najprimernejših setov avtorji [26] navajajo več parametrov. Konci začetnih oligonukleotidov (3' konci) so začetna mesta sinteze DNA, zato morajo biti posebej stabilni. Potrebno je preveriti stabilnost 3' konca regije F2 in B2, ter 5' konca regije B1c in F1c za vsak set začetnih oligonukleotidov. Vrednost ΔG , ki ponazarja stabilnost, mora biti -4.0 kcal/mol ali nižja (npr. konec z $\Delta G = -6.5$ kcal/mol je bolj stabilen od konca z $\Delta G = -4.0$ kcal/mol) [26].

Pripravili smo seznam setov začetnih oligonukleotidov, ki so bili skupni vsem primerjavam in nadalje proučili, katera mesta začetnih oligonukleotidov je potrebno zamenjati z večpomensko IUPAC oznako.

3.2.4 Vstavljanje večpomenskih IUPAC oznak za nukleotide na znotrajvrstnih variabilnih mestih

Da bi začetni oligonukleotidi nalegli na nukleotidna zaporedja vseh haplotipov *L. vulgaris*, smo identificirali na katera znotrajvrstna variabilna mesta prilegajo in ta mesta zamenjali z IUPAC oznakami, ki ponazarjajo prileganje na dva ali več različnih nukleotidov (npr. oznaka Y pomeni C in T, začetni oligonukleotid na mestu z oznako Y prileže na G ali A). Med zaporedji F2 in F1c (FIP) ter B2 in B1c (BIP) smo vrinili povezovalno DNA (*angl. linker*) s petimi timini, saj naj bi po nekaterih virih le-to olajšalo oblikovanje zanke in pohitrilo reakcijo [29]. Uporabili so jo tudi Notomi in sod. [16], ko so razvili metodo LAMP.

3.2.5 Ponovitev z obratnim komplementom

Celoten postopek smo ponovili na način, da smo haplotipe prepisali v komplementarno zaporedje (v smeri 5' proti 3') in ponovno izvedli vse prej opisane postopke. Komplementarno zaporedje smo pridobili z orodjem na spletni strani <http://arep.med.harvard.edu/labgc/adnan/projects/Utilities/revcomp.html>.

3.3 Preverjanje specifičnosti pomnoževanja DNA z razvitimi začetnimi oligonukleotidi

Za konec smo preverili še specifičnost začetnih oligonukleotidov oz. njihovo prileganje na nukleotidna zaporedja različnih vrst lignjev s pomočjo paketa za R – primerTree. PrimerTree paket omogoča proučevanje specifičnosti naleganja začetnih oligonukleotidov z iskanjem po izbrani podatkovni zbirki z nukleotidnimi zaporedji (v našem primeru GenBank) z orodjem Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>). V primeru, da je v začetnem oligonukleotidu prisotna tudi oznaka IUPAC za več nukleotidov lahko primerTree določi vse različne kombinacije začetnih oligonukleotidov.

Za delovanje paketa smo morali na računalnik namestiti tudi orodje Clustal Omega. Skripta, ki smo jo uporabili, je priložena v prilogi (Priloga A).

Za funkcijo »search_primer_pair()« smo uporabili zaporedja v smeri 5'-3' (t.j. zaporedje mesta F3, F2, B3 in B2), v primeru testiranja kombinacije F1c in B1c pa smo morali uporabiti komplementarno zaporedje.

Zgornjo mejo števila permutacij smo nastavili na 100, čeprav število kombinacij začetnih oligonukleotidov z IUPAC oznakami v nobenem primeru ni preseglo števila 100, saj smo

imeli največ tri variabilna mesta na enem začetnem oligonukleotidu, tako da so se izvedle vse možne permutacije.

Pri testiranju specifičnosti naleganja smo določili podatkovno bazo »nucleotide«. Za iskalni ukaz smo našli vrste, ki se pojavljajo na slovenskem tržišču. Sedmim začetnim vrstam smo dodali še *Loligo patagonica*, *Uroteuthis duvaucelli* in *Todarodes sagittatus*. Vključili smo tudi stara imena nekaterih vrst, ki se danes ne uporabljajo več, v primeru da katero izmed novih imen v podatkovni zbirki ni samodejno povezano s starim.

Funkcija »search_primer_pair()« poda objekt primerTree iskanja.

S funkcijo png() smo ustvarili sliko v katero se je kasneje shranil graf.

Funkcija »plot.primerTree()« (ali samo »plot()«) izriše graf na podlagi objekta, ki ga vrne funkcija »search_primer_pair()«. Funkciji smo podali objekt in izbrali »species« oz. vrsta, ker smo želeli preveriti rezultat na grafu zgolj na nivoju vrste.

Funkcija »dev.off()« zapre okno »Plot«.

Izpisali smo tudi druge rezultate primerTree shranjene na listih »taxonomy« in »BLAST_results«, kot npr. dolžina pomnoženega zaporedja, akcesijska oznaka zaporedja iz GenBank, informacijo o taksonomski klasifikaciji, itd.

4 REZULTATI IN DISKUSIJA

4.1 Izbor, prenos in urejanje nukleotidnih zaporedij

S spletne podatkovne zbirke GenBank smo prenesli vsa zaporedja štirih genov (*COI*, *cyt b*, *16S rDNA*, *18S rDNA*) sedmih vrst lignjev (*Loligo vulgaris*, *Loligo forbesii*, *Loligo reynaudii*, *Dosidicus gigas*, *Doryteuthis gahi* (d'Orbigny, 1835), *Illex coindetii* (Vérany, 1837) in *Uroteuthis chinensis*) v fasta obliki. Število vseh pridobljenih nukleotidnih zaporedij je bilo 439.

Preglednica 1: Število prenesenih zaporedij glede na vrsto in gen

	<i>Doryteuthis gahi</i>	<i>Dosidicus gigas</i>	<i>Illex coindetii</i>	<i>Loligo forbesii</i>	<i>Loligo reynaudii</i>	<i>Loligo vulgaris</i>	<i>Uroteuthis chinensis</i>	Skupno
<i>COI</i>	8	72	18	29	20	67	59	273
<i>cyt b</i>	8	26	16	8	4	6	8	76
18S	/	1	3	5	/	4	1	14
16S	13	18	2	4	3	6	30	76
Skupno	29	117	39	46	27	83	98	439

Z orodjem EDirect smo pripravili tudi preglednico z metapodatki prenesenih nukleotidnih zaporedij, ki nam je bila v pomoč pri izboru najbolj zanesljivih zaporedij. Primer preglednice z metapodatki, ki se nanašajo na nukleotidna zaporedja *L. vulgaris*, se nahaja v prilogi B. Ker je bilo v podatkovni zbirki GenBank največ zaporedij za gen *COI*, smo se odločili, da za metodo LAMP uporabimo le zaporedja *COI*. Najprej smo zaporedja z orodjem MAFFT poravnali in preverili ali so določena na osnovi matrične ali kodirajoče verige DNA. Slika 7 prikazuje rezultat v primeru, če je med zaporedji tudi primer zaporedja komplementarne verige.

LAST hits (score>39)
between the top sequence
and the others.

Open all plots

Be careful if there are **blue lines**. By default, MAFFT considers similarities in forward strands (**red**) only, but ignores similarities in reverse strands (**blue**). If **blue lines** are seen around

Clustal format | [Fasta format](#) | MAFFT result | [View](#) | [Tree](#) | [Refine dataset](#) | [Return to home](#)

View

Reformat to GCG, PHYLIP, MSF, NEXUS, uppercase/lowercase, etc. with Readseq

GUIDANCE2 computes the residue-wise confidence scores and extracts well-aligned residues.

Refine dataset

Phylogenetic tree

MAFFT-FFT-NS-i Result

```

CLUSTAL format alignment by MAFFT (v7.471)

MH194533.2 -----
MH194427.1 -----
MH194426.1 -----
MF980606.1 -----
MF980605.1 -----
MF980604.1 -----
MF980603.1 -----
MF980600.1 -----
KX591661.1 -----
EU735374.1 -----
FJ153075.1 ATGAATAACAAATTTTTCCTCCAACTTCCTATTATTTTATCATGATTATAGGACG
FJ153074.1 ATGG-----TACTATTATTAT-----
FJ153073.1 ATGAATAACAAATTTTTCCTCCAACTTCCTATTATTTTATCATGATTATAGGACG
FJ153072.1 ATGG-----TACTATTATTAT-----
FJ153071.1 ATGAATAACAAATTTTTCCTCCAACTTCCTATTATTTTATCATGATTATAGGACG
FJ153070.1 ATGG-----TACTATTATTAT-----
KJ879303.1 -----
KJ879302.1 -----
KJ879301.1 -----
KJ879300.1 -----
KJ879299.1 -----
KC353413.1 -----
KC353412.1 -----
KC353411.1 -----
KC353410.1 -----
KC353409.1 -----
KC353408.1 -----
KC353407.1 -----

```

LAST hits (score>39)
between the top sequence
and the others.

Open all plots

Be careful if there are **blue lines**. By default, MAFFT considers similarities in forward strands (**red**) only, but ignores similarities in reverse strands (**blue**). If **blue lines** are seen around

Clustal format | [Fasta format](#) | MAFFT result | [View](#) | [Tree](#) | [Refine dataset](#) | [Return to home](#)

View

Reformat to GCG, PHYLIP, MSF, NEXUS, uppercase/lowercase, etc. with Readseq

GUIDANCE2 computes the residue-wise confidence scores and extracts well-aligned residues.

Refine dataset

Phylogenetic tree

Direction of nucleotide sequences was inferred approximately. Reverse complementary sequences are marked with **_R_** in the alignment below.

The program for direction inference was updated, 2016/Jun/23. If you notice any problems that may be related to this, [please let us know](#).

MAFFT-FFT-NS-i Result

```

CLUSTAL format alignment by MAFFT (v7.471)

MH194533.2 -----
MH194427.1 -----
MH194426.1 -----
_R MF980606.1 -----
MF980605.1 -----
MF980604.1 -----
MF980603.1 -----
MF980600.1 -----
KX591661.1 -----
EU735374.1 -----
FJ153075.1 ATGAATAACAAATTTTTCCTCCAACTTCCTATTATTTTATCATGATTATAGGACG
FJ153074.1 ATGG-----TACTATTATTAT-----
FJ153073.1 ATGAATAACAAATTTTTCCTCCAACTTCCTATTATTTTATCATGATTATAGGACG
FJ153072.1 ATGG-----TACTATTATTAT-----
FJ153071.1 ATGAATAACAAATTTTTCCTCCAACTTCCTATTATTTTATCATGATTATAGGACG
FJ153070.1 ATGG-----TACTATTATTAT-----
KJ879303.1 -----
KJ879302.1 -----
KJ879301.1 -----
KJ879300.1 -----
KJ879299.1 -----
KC353413.1 -----
KC353412.1 -----
KC353411.1 -----

```

Slika 7: Rezultat orodja MAFFT v primeru, ko je med analiziranimi zaporedji tudi nasprotno orientirano zaporedje, takrat so točke v točkovnem grafu so prikazane z modro črto. V nastavitvah smo določili, da orodje v takem primeru samodejno prepiše zaporedje v komplementarno.

Po pregledu zaporedij in metapodatkov v programu MEGA, smo se odločili, da bomo nekatera zaporedja odstranili iz nabora zaradi neustreznosti. Odstranili smo zaporedja, ki so

bila v primerjavi z drugimi zaporedji iste vrste bolj variabilna in zaporedja, ki so vsebovala veliko nedoločenih nukleotidov. Odstranili smo tudi nekaj takih, kjer je manjkal večji del *COI* regije.

Pri vrsti *Loligo vulgaris* smo odstranili 34 zaporedij, tako da nam jih je ostalo še 33, naknadno pa smo dodali še šest nukleotidnih zaporedij, ki so jih pridobili raziskovalci iz referenčnega materiala. Pri vrsti *Uroteuthis chinensis* smo odstranili pet zaporedij, tako da jih je ostalo še 54, pri vrsti *Illex coindetii* smo izbrisali eno zaporedje, tako da jih je ostalo 17 in pri vrsti *Dosidicus gigas* smo odstranili 49 zaporedij, tako da jih je ostalo 21.

4.2 Identifikacija haplotipov in krajšanje zaporedij

Z orodjem DnaSP smo prepoznali unikatne haplotipe gena *COI* za sedem izbranih vrst (poleg vrste *L. vulgaris*).

Preglednica 2: Število zaporedij in haplotipov gena *COI* po odstranitvi neustreznih zaporedij

Vrsta	Št. nukleotidnih zaporedij	Št. unikatnih haplotipov
<i>Doryteuthis gahi</i>	8	5
<i>Dosidicus gigas</i>	21	7
<i>Illex coindetii</i>	17	3
<i>Loligo forbesii</i>	29	1
<i>Loligo reynaudii</i>	20	9
<i>Loligo vulgaris</i>	39	21
<i>Uroteuthis chinensis</i>	54	20
<i>Doryteuthis gahi</i>	8	5
Skupno	188	66

Vse haplotipe vseh vrst smo nato prenesli v eno fasta datoteko in jih poravnali v programu MEGA. Vsa zaporedja smo skrajšali na končno dolžino 575 baznih parov in vse haplotipe shranili v fasta datoteke ločene po vrstah.

4.3 Priprava zaporedij za vnos v Primer Explorer

Z orodjem CodonCode Aligner smo na osnovi nukleotidnih zaporedij gena *COI*, pridobljenih iz vzorcev lignjev, določili konsenzno zaporedje, ki smo ga v nadaljevanju uporabili kot osnovo za razvoj začetnih oligonukleotidov za metodo LAMP.

Z orodjema Clustal Omega in MorphoCatcher smo pripravili vhodne datoteke za PrimerExplorer v5. Primer vhodne datoteke za MorphoCatcher prikazuje slika 8.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

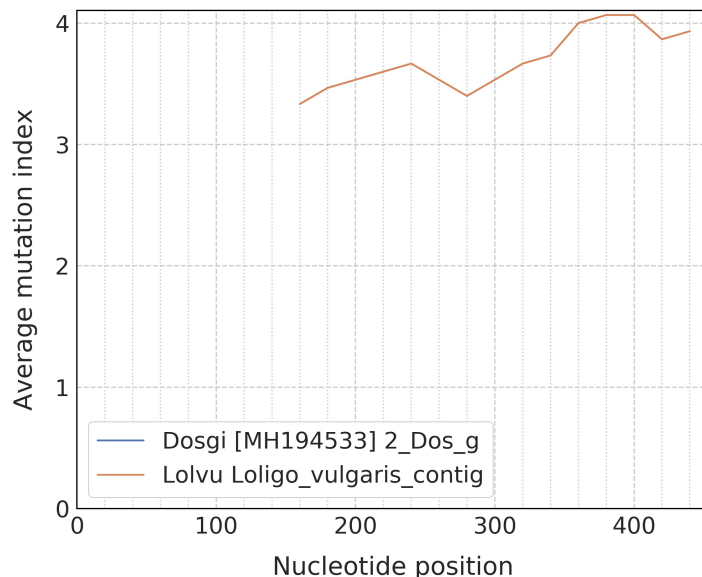
```
Dosgi|MH194533.2_Dos_gi      GAAC TTC TCTAAGACTAATAATCCGTACCGAACTAGGTCAACCCGGATCGCTACTAAATG 60
Dosgi|MH194426.1_Dos_gi      GAAC TTC TCTAAGACTAATAATCCGTACCGAACTAGGTCAACCCGGATCGCTACTAAATG 60
Dosgi|MF980605.1_Dos_gi      GAAC TTC TCTAAGACTAATAATCCGTACCGAACTAGGTCAACCCGGATCGCTACTAAATG 60
Dosgi|MF980604.1_Dos_gi      GAAC TTC TCTAAGACTAATAATCCGTACCGAACTAGGTCAACCCGGATCGCTACTAAATG 60
Dosgi|EU735374.1_Dos_gi      GAAC TTC TCTAAGACTAATAATCCGTACCGAACTAGGTCAACCCGGATCGCTACTAAATG 60
Dosgi|FJ153073.1_Dos_gi      GAAC TTC TCTAAGACTAATAATCCGTACCGAACTAGGTCAACCCGGATCGCTACTAAATG 60
Dosgi|GU324203.1_Dos_gi      GAAC TTC TCTAAGACTAATAATCCGTACCGAACTAGGTCAACCCGGATCGCTACTAAATG 60
Lolvu|Loligo_vulgaris_contig GTACTTCATTAAGATTAATAATTCGAACAGAAGTAGGTAAACCCGGTTCAGTGTAAATG 60
* * * * *

Dosgi|MH194533.2_Dos_gi      ATGATCAACTATATAACGTGGTGGTCACTGCACACGGTTTCATTATAATTTCTTCTTAG 120
Dosgi|MH194426.1_Dos_gi      ATGATCAACTATATAACGTGGTGGTCACTGCACACGGTTTCATTATAATTTCTTCTTAG 120
Dosgi|MF980605.1_Dos_gi      ATGATCAACTATATAACGTGGTGGTCACTGCACACGGTTTCATTATAATTTCTTCTTAG 120
Dosgi|MF980604.1_Dos_gi      ATGATCAACTATATAACGTGGTGGTCACTGCACACGGTTTCATTATAATTTCTTCTTAG 120
Dosgi|EU735374.1_Dos_gi      ATGATCAACTATATAACGTGGTGGTCACTGCACACGGTTTCATTATAATTTCTTCTTAG 120
Dosgi|FJ153073.1_Dos_gi      ATGATCAACTATATAACGTGGTGGTCACTGCACACGGTTTCATTATAATTTCTTCTTAG 120
Dosgi|GU324203.1_Dos_gi      ATGATCAACTATATAACGTGGTGGTCACTGCACACGGTTTCATTATAATTTCTTCTTAG 120
Lolvu|Loligo_vulgaris_contig ATGATCAACTATACAATGATAGTAGTAAGTGCACACGGTTTATTATAATTTTATATG 120
* * * * *

Dosgi|MH194533.2_Dos_gi      TTATACCTATTATAATTGGAGGATTTGGTAACGACTAGTTCCTTAATATTAGGAGCCC 180
Dosgi|MH194426.1_Dos_gi      TTATACCTATTATAATTGGAGGATTTGGTAACGACTAGTTCCTTAATATTAGGAGCCC 180
Dosgi|MF980605.1_Dos_gi      TTATACCTATTATAATTGGAGGATTTGGTAACGACTAGTTCCTTAATATTAGGAGCCC 180
Dosgi|MF980604.1_Dos_gi      TTATACCTATTATAATTGGAGGATTTGGTAACGACTAGTTCCTTAATATTAGGAGCCC 180
Dosgi|EU735374.1_Dos_gi      TTATACCTATTATAATTGGAGGATTTGGTAACGACTAGTTCCTTAATATTAGGAGCCC 180
Dosgi|FJ153073.1_Dos_gi      TTATACCTATTATAATTGGAGGATTTGGTAACGACTAGTTCCTTAATATTAGGAGCCC 180
Dosgi|GU324203.1_Dos_gi      TTATACCTATTATAATTGGAGGATTTGGTAACGACTAGTTCCTTAATATTAGGAGCCC 180
Lolvu|Loligo_vulgaris_contig TTATACCTATTATAATTGGGGGATTCGAAAGTATTAGTGCCTATAATACTAGGTGCC 180
* * * * *
```

Slika 8: Primer vhodne datoteke za MorphoCatcher

Z orodjem MorphoCatcher smo pridobili vhodno datoteko za PrimerExplorer v5 (slika 8) in graf s povprečnim mutacijskim indeksom za primerjavo *L. vulgaris* z vsako od sedmih vrst posebej (primer na sliki št. 9).



Slika 9: Graf povprečnega mutacijskega indeksa za vrsto *D. gigas* in konsenzno zaporedje *L. vulgaris*.

Glede na literaturo [27], povprečne vrednosti mutacijskega indeksa nad vrednostjo dve omogočajo uspešen razvoj začetnih oligonukleotidov za metodo LAMP.

[illegible]

Slika 10: Primer vhodne datoteke za PrimerExplorer v5, ki jo pripravi orodje MorphoCatcher. Zvezdica označuje enak nukleotid med konsenznim zaporedjem *L. vulgaris* in vsemi haplotipi *D. gigas*, črtice pa so na mestih, kjer se zaporedja med vrstama razlikujejo.

4.4 Določitev začetnih oligonukleotidov z orodjem Primer Explorerjem v5 in končni izbor setov začetnih oligonukleotidov

Po vnosu vhodne datoteke iz orodja MorphoCatcher v PrimerExplorer v5, smo pridobili grafični pregled naleganja začetnih oligonukleotidov na tarčno zaporedje (konsenzno zaporedje *L. vulgaris*) od vseh ponujenih setov (slika 11).

Z vsemi seti smo preverili ali je mogoče poleg primarno določenih štirih začetnih oligonukleotidov razviti še dodatna dva za prileganje na zanko, vendar to s privzetimi nastavitvami ni bilo mogoče.

Pri vseh sedmih setih smo preverili parameter, ki določa stabilnost 3' konca za začetne oligonukleotide F2 in B2, ter 5' konca za F1c in B1c. Vse vrednosti ΔG so bile manjše od -4 za vse sete, kar pomeni da so vsi začetni oligonukleotidi ustrezali priporočenim pogojem [26].

V nadaljevanju bomo predstavili rezultate le za en set začetnih oligonukleotidov, označen z oznako ID 23. Nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov iz omenjenega seta je prikazano v preglednici 4.

Preglednica 3: Set začetnih oligonukleotidov z oznako ID23

label	5'pos	3'pos	len	Tm	5'dG	3'dG	GCrate	Sequence
F3	181	200	20	56.25	-3.48	-6.33	0.45	CAGATATAGCTTTCCACGT
B3	359	381	23	55.74	-3.52	-4.41	0.30	AAGAAATACCAGCTAAATGAAGT
FIP			43					AGCTCCTCTTTCTACAGCAGATG- GATTTTGATTGCTTCCCCCT
BIP			47					GTACAGGATGAACAGTGTACCCC- GAAAAAATGGCTAAATCTACAGAC
F2	214	233	20	57.76	-3.17	-6.63	0.45	GATTTTGATTGCTTCCCCCT
F1c	256	278	23	61.63	-5.93	-4.40	0.48	AGCTCCTCTTTCTACAGCAGATG
B2	335	358	24	56.00	-3.29	-4.90	0.33	GAAAAAATGGCTAAATCTACAGAC
B1c	280	302	23	62.10	-4.23	-5.53	0.52	GTACAGGATGAACAGTGTACCCC

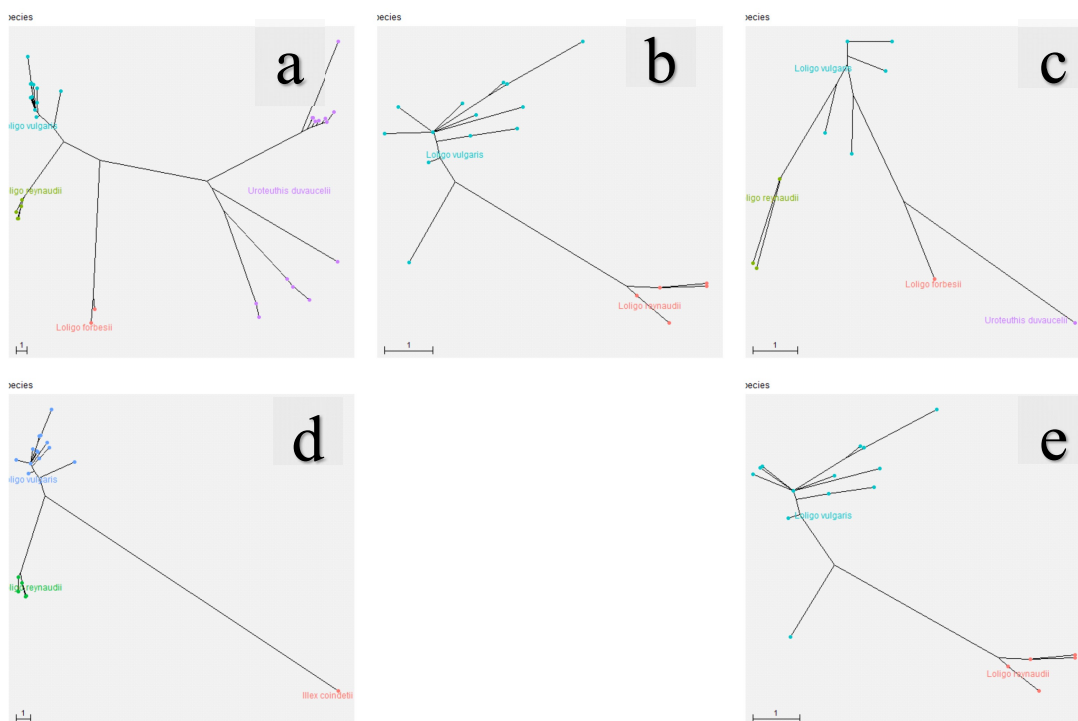
Na mestih začetnih oligonukleotidov, ki so prilegla na znotrajvrstna variabilna mesta pri *L. vulgaris*, smo namesto oznake za nukleotid vstavili IUPAC oznako za dva ali več nukleotidov. Prikaz končnega seta ID23 z IUPAC oznakami in »poli T« povezovalno DNA med zaporedjema F2 in F1c (FIP), ter B2 in B1c (BIP) je predstavljeno v preglednici 5.

Preglednica 4: Končno nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov z oznako ID23 z IUPAC oznakami

F3	CAGATATAGCTTTCCACGT
B3	AAGAAATACCAGCTAAATGRAGT
FIP	AGCYCCTCTTTCTACAGCAGATGttttGATTTGATTCTYCCCCCT
BIP	GTACAGGATGAACAGTGTACCCCttttGAAAAAATGGCTAAATCTACAGAC

4.5 Preverjanje prileganja na nukleotidna zaporedja ostalih vrst lignjev

Za konec smo še preverili specifičnost prileganja začetnih oligonukleotidov oz. ali prilegajo tudi na regijo *COI* ostalih vrst lignjev. Analizo smo izvedli z R paketom primerTree. Kot rezultat smo pridobili dendrogram, ki prikazuje podobnosti med zaporedji, ki bi se s testiranimi kombinacijami začetnih oligonukleotidov oz. kombinacijami nukleotidnih zaporedij posameznih delov začetnih oligonukleotidov (v primeru FIP in BIP) pomnožila (slika 13). Test specifičnosti je bil izveden s privzetimi nastavitvami (primerTree s privzetimi nastavitvami dovoljuje do tri neujemanja na vsakem začetnem oligonukleotidu). Pridobili smo tudi preglednico s seznamom akcesijskih oznak nukleotidnih zaporedij in informacijo o taksonomski klasifikaciji (primer v prilogi C).



Slika 13: Graf pomnoženih zaporedij za začetne oligonukleotide seta ID23. **a)** F3 in B3, **b)** F2 in B2, **c)** F1c in B1c, **d)** F3 in B2, **e)** F2 in B3

Za razvoj specifičnih oligonukleotidov bi bilo optimalno, da se pomnožijo vsa zaporedja *L. vulgaris* in nobena od ostalih vrst. V našem primeru je bilo privzeto število variabilnih mest na začetni oligonukleotid tri, zato smo s primerTree pridobili podatek, da bi se lahko pomnožila tudi DNA drugih vrst (predvsem DNA vrste iz rodu *Loligo* – *L. reynaudii* in *L. forbesii*). Upoštevajoč podatek, da sta pri cikličnem pomnoževanju najpomembnejša začetna oligonukleotida FIP in BIP, ki imata na 3' koncu zaporedje B2 in F2 regije ter glede na to, da je rezultat testiranja s primerTree najbolj specifičen ravno pri tej kombinaciji, menimo,

da lahko pričakujemo specifično pomnoževanje DNA *L. vulgaris* pri laboratorijskem testiranju tega seta začetnih oligonukleotidov.

5 ZAKLJUČEK

Povpraševanje po morski hrani se iz dneva v dan povečuje. Ekonomski pritiski in morfološke podobnosti med določenimi vrstami glavonožcev lahko privedejo do namernih oz. nenamernih potvorb pri imenovanju vrst. V takem primeru je potrošnik ogoljufan, lahko pa je tudi resneje ogroženo njegovo zdravje. Testi na osnovi DNA omogočajo lažje razlikovanje med vrstami, kot je to na podlagi morfoloških znakov, še posebej če je živilo že predelano. V sklopu zaključne naloge smo razvili postopek določitve vrstno specifičnih oligonukleotidov za potrjevanje vrste *Loligo vulgaris* z metodo LAMP. Čeprav smo se osredotočili na lignje vrste *L. vulgaris*, se lahko postopek za razvoj metode uporabi tudi za druge taksonomske skupine. V nalogi smo uporabili gen *COI*, ki velja za enega najzanesljivejših markerjev DNA za barkodiranje evkariontov.

S postopkom, ki smo ga izvedli bo mogoče zaključiti tudi karakterizacijo ostalih setov začetnih oligonukleotidov, poleg seta z oznako ID23, ki smo ga predstavili v zaključni nalogi. Razvoj začetnih oligonukleotidov je temeljil na nukleotidnih zaporedjih iz referenčnih osebkov lignjev *L. vulgaris*, ki so bili ulovljeni in identificirani kot *L. vulgaris* iz slovenskega morja.

Pri metodi LAMP je tako kot tudi pri reakciji PCR z dvema začetnima oligonukleotidoma, težko zgolj »in silico« potrditi uspešnost začetnih oligonukleotidov. Za potrditev specifičnosti razvitih začetnih oligonukleotidov bo v prihodnje treba izvesti še laboratorijski preizkus s testiranjem pomnoževanja DNA različnih vrst lignjev.

Delo je bilo opravljeno v sklopu projekta: »Uporaba tehnologije DNA za ugotavljanje poneverb v ribiških proizvodih z vrednotenjem socio ekonomskih vidikov« (št. projekta V1-1808 iz sheme Ciljni raziskovalni program (CRP) Zagotovimo si hrano za jutri).

6 LITERATURA IN VIRI

- [1] J. Ye, J. Feng, Z. Dai, L. Meng, Y. Zhang, and X. Jiang, "Application of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for Rapid Detection of Jumbo Flying Squid *Dosidicus gigas* (D'Orbigny, 1835)," *Food Anal. Methods*, vol. 10, no. 5, pp. 1452–1459, 2017, doi: 10.1007/s12161-016-0700-6.
- [2] J. J. Wilson, K. W. Sing, and N. Jaturas, "DNA barcoding: Bioinformatics workflows for beginners," *Encycl. Bioinforma. Comput. Biol. ABC Bioinforma.*, vol. 1–3, no. 2012, pp. 985–995, 2018, doi: 10.1016/B978-0-12-809633-8.20468-8.
- [3] G. Sanchez *et al.*, "Genus-level phylogeny of cephalopods using molecular markers: Current status and problematic areas," *PeerJ*, vol. 2018, no. 2, pp. 1–19, 2018, doi: 10.7717/peerj.4331.
- [4] Y. W. Sin, C. Yau, and K. H. Chu, "Morphological and genetic differentiation of two loliginid squids, *Uroteuthis* (Photololigo) *chinensis* and *Uroteuthis* (Photololigo) *edulis* (Cephalopoda: Loliginidae), in Asia," *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*, vol. 369, no. 1, pp. 22–30, 2009, doi: 10.1016/j.jembe.2008.10.029.
- [5] O. Folmer, M. Black, W. Hoeh, R. Lutz, and R. Vrijenhoek, "DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates.," *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, vol. 3, no. 5, pp. 294–299, 1994, doi: 10.1071/ZO9660275.
- [6] K. Gebhardt and T. Knebelsberger, "Identification of cephalopod species from the North and Baltic Seas using morphology, COI and 18S rDNA sequences," *Helgol. Mar. Res.*, vol. 69, no. 3, pp. 259–271, 2015, doi: 10.1007/s10152-015-0434-7.
- [7] Genetics Home Reference, "MT-CYB," 2020. <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MT-CYB#>.
- [8] J. Saull, C. Duggan, G. Hobbs, and T. Edwards, "The detection of Atlantic cod (*Gadus morhua*) using loop mediated isothermal amplification in conjunction with a simplified DNA extraction process," *Food Control*, vol. 59, pp. 306–313, 2016, doi: 10.1016/j.foodcont.2015.05.038.
- [9] A. Ardura, S. Planes, and E. Garcia-Vazquez, "Applications of DNA barcoding to fish landings: Authentication and diversity assessment," *Zookeys*, vol. 365, no. SPEC.ISSUE, pp. 49–65, 2013, doi: 10.3897/zookeys.365.6409.
- [10] T. Akasaki, T. Yanagimoto, K. Yamakami, H. Tomonaga, and S. Sato, "Species identification and PCR-RFLP analysis of cytochrome b gene in cod fish (order Gadiformes) products," *J. Food Sci.*, vol. 71, no. 3, pp. 190–195, 2006, doi: 10.1111/j.1365-2621.2006.tb15616.x.
- [11] W. G. Weisburg, S. M. Barns, D. A. Pelletier, and D. J. Lane, "16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study," vol. 173, no. 2, pp. 697–703, 1991.
- [12] L. Becherer, N. Borst, M. Bakheit, S. Frischmann, R. Zengerle, and F. Von Stetten, "Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)-review and classification of methods for sequence-specific detection," *Anal. Methods*, vol. 12, no. 6, pp. 717–746, 2020, doi: 10.1039/c9ay02246e.
- [13] M. U. Ahmed, Q. Hasan, M. Mosharraf Hossain, M. Saito, and E. Tamiya, "Meat species identification based on the loop mediated isothermal amplification and electrochemical DNA sensor," *Food Control*, vol. 21, no. 5, pp. 599–605, 2010, doi: 10.1016/j.foodcont.2009.09.001.
- [14] P. Kogovšek *et al.*, "LAMP assay and rapid sample preparation method for on-site detection of flavesence dorée phytoplasma in grapevine," *Plant Pathol.*, vol. 64, no. 2, pp. 286–296, 2015, doi: 10.1111/ppa.12266.

- [15] Eiken Genome, "The principle of LAMP method Using Loop Primer," 2020. <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/loop.html>.
- [16] T. Notomi *et al.*, "Loop-mediated isothermal amplification of DNA," *Nucleic Acids Res.*, vol. 28, no. 12, p. e63, 2000, doi: 10.1093/nar/28.12.e63.
- [17] SeaLifeBase, "Loligo vulgaris (Lamarck, 1798)," 2017. <https://www.sealifebase.ca/summary/Loligo-vulgaris.html>.
- [18] ADRIAMED, "Loligo vulgaris (Lamarck, 1798)," 2017. <http://www.faoadriamed.org/html/Species/LoligoVulgaris.html#B>.
- [19] Tree of Life web project, "Loligo vulgaris." http://tolweb.org/Loligo_vulgaris/19866.
- [20] C. F. E. Roper, C. Nigmatullin, and P. Jereb, *Family OMMASTREPHIDAE Steenstrup, 1857*. 2010.
- [21] W. S. Augustyn, C.J.; Grant, "Biochemical and morphological systematics of *Loligo vulgaris* Lamark and *Loligo vulgaris* Reynaudii D'Orbigny Nov. Comb. (Cephalopoda: Myopsida)," *Malacologia*, vol. 29, no. 1, pp. 215–233, 1988.
- [22] J. Kans, "Entrez Direct: E-utilities on the UNIX Command Line. In: Entrez Programming Utilities Help," *Entrez Program. Util. Help*, no. Md, pp. 1–86, 2013, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK179288/>.
- [23] K. Katoh, J. Rozewicki, and K. D. Yamada, "MAFFT online service: Multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization," *Brief. Bioinform.*, vol. 20, no. 4, pp. 1160–1166, 2018, doi: 10.1093/bib/bbx108.
- [24] J. Rozas *et al.*, "DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets," *Mol. Biol. Evol.*, vol. 34, no. 12, pp. 3299–3302, 2017, doi: 10.1093/molbev/msx248.
- [25] K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, and S. Kumar, "MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0," *Mol. Biol. Evol.*, vol. 30, no. 12, pp. 2725–2729, 2013, doi: 10.1093/molbev/mst197.
- [26] Eiken Chemical Co., "How to use PrimerExplorer V5," [Online]. Available: https://primerexplorer.jp/e/v4_manual/pdf/PrimerExplorerV4_Manual_2.pdf.
- [27] F. V. Shirshikov, Y. A. Pekov, and K. A. Miroshnikov, "MorphoCatcher: A multiple-alignment based web tool for target selection and designing taxon-specific primers in the loop-mediated isothermal amplification method," *PeerJ*, vol. 7, 2019, doi: 10.7717/peerj.6801.
- [28] F. Sievers and D. G. Higgins, "Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences," *Protein Sci.*, vol. 27, no. 1, pp. 135–145, 2018, doi: 10.1002/pro.3290.
- [29] C. Torres, E. A. Vitalis, B. R. Baker, S. N. Gardner, M. W. Torres, and J. M. Dzenitis, "LAVA: An Open-Source Approach To Designing LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) DNA Signatures," *BMC Bioinformatics*, vol. 12, 2011, doi: 10.1186/1471-2105-12-240.

PRIOLOGE

Priloga A: Metapodatki prenesenih zaporedij vrste *Loligo vulgaris*, pridobljenih z EDirect orodjem

Accession_oz	Dolžina	Vezja	Organizem	Naslov	Publikator	Naslov_grispeka	Revija	BOLD	Izolat	Evrop
				Loligo wuigars cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) gene, mitochondrial gene encoding mitochondrial protein, partial cds						
1 AF075397	620	AF075397.1	Loligo wuigars	Loligo wuigars isolate TR246EK	Adetson, F. E.	Phylogeny and historical biogeography of the loliginid squids (Mollusca: Cephalopoda) based on mitochondrial DNA sequence data	Mol. Phylogenet. Evol. 15 (2), 191-214 (2000)			
2 J0623949	655	J0623949.1	Loligo wuigars	cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial	Kestin, E.	DNA Barcoding	Commercially important Aquatic Species of Turkey	Unpublished	TR246EK	
3 KC311393	654	KC311393.1	Loligo wuigars	Loligo wuigars isolate TR244EK	Kestin, E.	DNA Barcoding	Commercially important Aquatic Species of Turkey	Unpublished	TR244EK	
4 KC311394	654	KC311394.1	Loligo wuigars	Loligo wuigars isolate TR245EK	Kestin, E.	DNA Barcoding	Commercially important Aquatic Species of Turkey	Unpublished	TR245EK	
5 KC311395	654	KC311395.1	Loligo wuigars	Loligo wuigars isolate TR246EK	Kestin, E.	DNA Barcoding	Commercially important Aquatic Species of Turkey	Unpublished	TR246EK	
6 KC789174	654	KC789174.1	Loligo wuigars	Loligo wuigars isolate TR246EK	Kestin, E.	DNA Barcoding	Commercially important Aquatic Species of Turkey	Unpublished	TR246EK	
7 KC789175	654	KC789175.1	Loligo wuigars	Loligo wuigars isolate TR244EK	Kestin, E.	DNA Barcoding	Commercially important Aquatic Species of Turkey	Unpublished	TR244EK	
8 KC789176	654	KC789176.1	Loligo wuigars	Loligo wuigars isolate TR242EK	Kestin, E.	DNA Barcoding	Commercially important Aquatic Species of Turkey	Unpublished	TR242EK	
9 KC789177	654	KC789177.1	Loligo wuigars	Loligo wuigars isolate TR243EK	Kestin, E.	DNA Barcoding	Commercially important Aquatic Species of Turkey	Unpublished	TR243EK	
10 KC789178	654	KC789178.1	Loligo wuigars	Loligo wuigars isolate TR245EK	Kestin, E.	DNA Barcoding	Commercially important Aquatic Species of Turkey	Unpublished	TR245EK	
11 KC789179	654	KC789179.1	Loligo wuigars	Loligo wuigars isolate TR244EK	Kestin, E.	DNA Barcoding	Commercially important Aquatic Species of Turkey	Unpublished	TR244EK	
12 KC789180	654	KC789180.1	Loligo wuigars	Loligo wuigars isolate TR246EK	Kestin, E.	DNA Barcoding	Commercially important Aquatic Species of Turkey	Unpublished	TR246EK	
13 KC789181	654	KC789181.1	Loligo wuigars	Loligo wuigars isolate TR244EK	Kestin, E.	DNA Barcoding	Commercially important Aquatic Species of Turkey	Unpublished	TR244EK	
14 KC789182	654	KC789182.1	Loligo wuigars	Loligo wuigars isolate TR245EK	Kestin, E.	DNA Barcoding	Commercially important Aquatic Species of Turkey	Unpublished	TR245EK	
15 KC789183	654	KC789183.1	Loligo wuigars	Loligo wuigars isolate TR246EK	Kestin, E.	DNA Barcoding	Commercially important Aquatic Species of Turkey	Unpublished	TR246EK	

Priloga B: Skripta za R paket primerTree za testiranje specifičnosti prileganja z začetnimi oligonukleotidi F3 in B3 iz seta ID23

```
#uvoz paketov
library(doMC)
library(primerTree)
library(gridExtra)
library(directlabels)
library(ggplot2)
registerDoMC(2)

#določitev delovne mape
setwd("~/Documents/primerTree/")

#določitev spremenljivk in vrednosti
#nukleotidna zaporedja so za set zaključnih oligonukleotidov z oznako ID23
F3 <- "CAGATATAGCTTTCCCACGT"
F2 <- "GATTTTGATTRCTYCCCCCT"
B3 <- "AAGAAATACCAGCTAAATGRAGT"
B2 <- "GAAAAATGGCTAAATCTACAGAC"
F1c_reverse <- "CATCTGCTGTRGAAAGAGGRGCT"
B1c_reverse <- "GGGGTASACTGTTTCATCCTGTAC"
apikey <- "uporabniški NCBI api ključ"
org <- "cephalopoda"
searchstr <- '"loligo vulgaris"[Organism] OR "loligo gahi"[Organism] OR "Loligo
patagonica"[Organism] OR "doryteuthis gahi"[Organism] OR "loligo gahi"[Organism] OR
"uroteuthis duvaucelii"[Organism] OR "loligo chinesis"[Organism] OR "loligo
duvaceli"[Organism] OR "dosidicus gigas"[Organism] OR "illex coindetii"[Organism] OR
"uroteuthis chinensis"[Organism] OR "Todarodes sagittatus"[Organism] OR "loligo
reynaudii"[Organism] OR "loligo forbesii" [Organism]"
db <- "nt"
n_perm <- 100
n_align <- 1000

#popravek za curl zaradi možnosti javljanja napake zaradi http2
httr::set_config(httr::config(http_version = 2))

#določitev funkcije
primerAssess <- function(seq1, seq2, name, num_permutations, num_aligns,
                          api_key, organism, primer_specificity_database, entrez_query) {
  #določitev imena za datoteko z rezultati in graf
  csv_name <- paste("rezultati_", name, ".csv", sep="")
  png_name <- paste(name, ".png", sep="")
  primer <- search_primer_pair(seq1, seq2, name, num_permutations = n_perm,
                              num_aligns = n_align,
                              api_key = apikey, organism = org,
                              primer_specificity_database = db,
                              .parallel = TRUE,
                              entrez_query = searchstr)

  #zapis slike
  png(filename = png_name)
  p <- plot(primer, 'species')
  print(p)
  dev.off()

  #priprava R objekta z rezultati
  rezultati_frame <- merge(primer$taxonomy,
                           primer$BLAST_result,
                           by.x="gi", by.y="gi")

  #zapis preglednice z rezultati
  write.csv(rezultati_frame, file = csv_name)
}

#primer za zagon funkcije "primerAssess" za kombinacijo nukleotidnih zaporedij F3 and B3
primerAssess(F3, B3, name="setFB3")
```

Priloga C: Primer rezultatov (prikazanih je le prvih 30 vrstic) analize v R s primerTree z začetnima oligonukleotidoma F3 in B3 iz seta ID23

gi	taxid	species	order	family	genus	X1	accession	product_length	mismatch_	mismatch_	forward_	forward_	reverse_	reverse_	product_	product_
									forward	reverse	start	stop	start	stop	start	stop
1 1050046768	78425	Uroteuthis duvaucelii	Teuthida	Loliginida	Uroteuthis		1 LT604978.1	201	0	1	190	209	390	368	190	390
2 1193824201	78425	Uroteuthis duvaucelii	Teuthida	Loliginida	Uroteuthis		1 KY019114.1	201	2	2	177	196	377	355	177	377
3 1193824203	78425	Uroteuthis duvaucelii	Teuthida	Loliginida	Uroteuthis		1 KY019115.1	201	2	2	177	196	377	355	177	377
4 1193824205	78425	Uroteuthis duvaucelii	Teuthida	Loliginida	Uroteuthis		1 KY019116.1	201	2	2	177	196	377	355	177	377
5 1193824207	78425	Uroteuthis duvaucelii	Teuthida	Loliginida	Uroteuthis		1 KY019117.1	201	1	2	177	196	377	355	177	377
6 1193824209	78425	Uroteuthis duvaucelii	Teuthida	Loliginida	Uroteuthis		1 KY019118.1	201	2	2	177	196	377	355	177	377
7 1193824211	78425	Uroteuthis duvaucelii	Teuthida	Loliginida	Uroteuthis		1 KY019119.1	201	2	2	177	196	377	355	177	377
8 1193824213	78425	Uroteuthis duvaucelii	Teuthida	Loliginida	Uroteuthis		1 KY019120.1	201	2	2	177	196	377	355	177	377
9 1193824215	78425	Uroteuthis duvaucelii	Teuthida	Loliginida	Uroteuthis		1 KY019121.1	201	2	2	177	196	377	355	177	377
10 1193824217	78425	Uroteuthis duvaucelii	Teuthida	Loliginida	Uroteuthis		1 KY019122.1	201	2	2	177	196	377	355	177	377
11 1193824219	78425	Uroteuthis duvaucelii	Teuthida	Loliginida	Uroteuthis		1 KY019123.1	201	2	2	177	196	377	355	177	377
12 1193824221	78425	Uroteuthis duvaucelii	Teuthida	Loliginida	Uroteuthis		1 KY019124.1	201	2	3	177	196	377	355	177	377
13 1193824223	78425	Uroteuthis duvaucelii	Teuthida	Loliginida	Uroteuthis		1 KY019125.1	201	2	2	177	196	377	355	177	377
14 1193824225	78425	Uroteuthis duvaucelii	Teuthida	Loliginida	Uroteuthis		1 KY019126.1	201	2	2	177	196	377	355	177	377
15 1193824227	78425	Uroteuthis duvaucelii	Teuthida	Loliginida	Uroteuthis		1 KY019127.1	201	2	2	177	196	377	355	177	377
16 1193824229	78425	Uroteuthis duvaucelii	Teuthida	Loliginida	Uroteuthis		1 KY019128.1	201	2	2	177	196	377	355	177	377
17 1193824231	78425	Uroteuthis duvaucelii	Teuthida	Loliginida	Uroteuthis		1 KY019129.1	201	2	2	177	196	377	355	177	377
18 1193824233	78425	Uroteuthis duvaucelii	Teuthida	Loliginida	Uroteuthis		1 KY019130.1	201	2	2	177	196	377	355	177	377
19 1216916524	6622	Loligo vulgaris	Teuthida	Loliginida	Loligo		1 MF157725.1	201	0	1	134	153	334	312	134	334
20 1216916526	6622	Loligo vulgaris	Teuthida	Loliginida	Loligo		1 MF157726.1	201	0	1	134	153	334	312	134	334
21 1216916528	6622	Loligo vulgaris	Teuthida	Loliginida	Loligo		1 MF157727.1	201	0	1	134	153	334	312	134	334
22 1216916530	6622	Loligo vulgaris	Teuthida	Loliginida	Loligo		1 MF157728.1	201	0	1	134	153	334	312	134	334
23 1216916532	6622	Loligo vulgaris	Teuthida	Loliginida	Loligo		1 MF157729.1	201	0	1	134	153	334	312	134	334
24 1216916534	6622	Loligo vulgaris	Teuthida	Loliginida	Loligo		1 MF157730.1	201	0	1	134	153	334	312	134	334
25 1216916536	6622	Loligo vulgaris	Teuthida	Loliginida	Loligo		1 MF157731.1	201	0	0	134	153	334	312	134	334
26 1216916538	6622	Loligo vulgaris	Teuthida	Loliginida	Loligo		1 MF157732.1	201	0	1	134	153	334	312	134	334
27 1216916540	6622	Loligo vulgaris	Teuthida	Loliginida	Loligo		1 MF157733.1	201	0	1	134	153	334	312	134	334
28 1216916542	6622	Loligo vulgaris	Teuthida	Loliginida	Loligo		1 MH292979.1	201	0	1	134	153	334	312	134	334
29 1509331008	6622	Loligo vulgaris	Teuthida	Loliginida	Loligo		1 MH292979.1	201	0	0	182	201	382	360	182	382
30 1509331074	6622	Loligo vulgaris	Teuthida	Loliginida	Loligo		1 MH293012.1	201	0	1	182	201	382	360	182	382