



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **324820**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

A01K 61/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20041919	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2002.10.08 PCT/US02/32217
(22)	Inng.dag	2004.05.10	(85)	Videreføringsdag	2004.05.10
(24)	Løpedag	2002.10.08	(30)	Prioritet	2001.10.11, US, 328464
(41)	Alm.tilgj	2004.07.07			
(45)	Meddelt	2007.12.10			
(73)	Innehaver	MariCal Inc, 400 Commercial Street, ME04101 PORTLAND, US			
(72)	Oppfinner	David R Russell, Jordan Springs Road, ME04002 ALFRED, US Jacqueline Nearing, 346 Mill Road, ME04097 NORTH YARMOUTH,, US Steven Jury, 275 Mahoney Road, NY12547 MILTON, US Timothy Linley, P O Box 101, ME04028 PARSONSFIELD, US Edward M Brown, 341 Highland Street, MA02186 MILTON, US William H Harris Jr, 79 Bramhall Street, Apt 6B, ME04102 PORTLAND, US Marlies Betka, 113 Glenwood Avenue, ME04103 PORTLAND, US			
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO			
(54)	Benevnelse	Metoder for oppdrett og innprenting av fisk ved bruk av en odorant			
(56)	Anførte publikasjoner	Ingen			
(57)	Sammendrag				

Foreliggende oppfinnelse angår metoder for innprenting av fisk som skal sensibiliseres med en odorant slik at modulering av PVCR i det olfaktoriske apparatet skjer og deretter eksponering av fisken med samme odorant etter overføring til sjøvann eller ferskvann. Foreliggende oppfinnelse omfatter også metoder for hjemvending eller tiltrekking av fisk, så vel som metoder for frastøting av fisk ved å modulere ekspresjon og/eller sensitivitet av PVCR i det olfaktoriske apparatet til fisken.

Foreliggende oppfinnelse vedrører metoder for oppdrett og innprenting av fisk ved bruk av en odorant.

Selv om store fordeler eksisterer ved å være i stand til å tiltrekke eller frastøte fisk, har slike metoder ennå ikke vært godt utviklet eller
5 forstått. Således er forbedrede metoder for å tiltrekke eller frastøte fisk nødvendig.

Foreliggende oppfinnelse angår en oppdagelse at fisk kan innprentes med en odorant (f.eks. et tiltrekningsmiddel eller frastøtningsmiddel) slik at, når fisken senere blir eksponert for
10 odoranten, kan de reagere på odoranten f.eks. skjelne odoranten eller bli sensibilisert for odoranten gjennom manipulering av fundamentale biologiske mekanismer i fisken. Spesielt omfatter foreliggende oppfinnelse oppdagelsen at et protein, polyvalent kationfølende reseptor betegnet Polyvalent Cation Sensing Receptor (PVCR), har en rolle i å få
15 fisk til å "sanse" ioner og aminosyrer og virker med odorantreseptorer, under visse betingelser til å innprente fisk med en odorant.

PVCR interagerer med odorant-reseptorer for å endre olfaktoriske sansekapabiliteter til fisken.

Foreliggende oppfinnelse gjelder for mange typer av akvatisk
20 arter omfattende ferskvannsfisk, marin fisk og anadrom fisk. I én utførelsesform kan anadrom fisk innprentes under forskjellige faser omfattende larvestadiet (f.eks. plommesekk-larver eller først spisende larver) eller smoltifiseringsstadiet. I naturen lever mange anadrome fisk mesteparten av deres voksne liv i sjøvann, men svømmer oppstrøms til
25 ferskvann for formeringsformål. Som et resultat klekkes anadrom fisk fra deres egg i ferskvann. Ettersom disse fiskene vokser, svømmer de nedstrøms og gradvis tilpasses sjøvannet. For oppdrett av disse fiskene, overfører fiskeoppdrettsanlegg disse fiskene fra ferskvann til sjøvann når de gjennomgår smoltifisering. Smoltifisering er stadiet ved
30 hvilket fisk blir i stand til å tilpasse seg fra ferskvann til sjøvann. Følgelig, mens fiskene blir innprentet med en odorant, blir de holdt i ferskvann og deretter overført til sjøvann.

Foreliggende oppfinnelse angår metoder for innprenting av fisk med

minst én fiskeodorant (f.eks. fisketiltrekningsmiddel eller fiskefrastøtningsmiddel) ved tilsetning av minst én PVCR-modulator til en første vannmasse (f.eks. ferskvann) i en mengde tilstrekkelig til å modulere ekspresjon og/eller sensitivitet av minst én PVCR; og tilsetning av fôr for fiskekonsum til vannet. Fôret inneholder minst én odorant og en mengde av NaCl tilstrekkelig til å bidra til et betydelig øket nivå av PVCR-modulator i serum fra fisken. PVCR-modulator endrer fiskens olfaktoriske sansing av odoranten. Modulert ekspresjon av minst én PVCR kan holdes inntil fisken blir overført til en andre vannmasse.

I et første aspekt av foreliggende oppfinnelse omfattes en metode for innprenting av fisk i vann med minst en odorant for nevnte fisk og forårsake at den innprentede fisken reagerer på nevnte odorant, kjennetegnet ved at nevnte metode omfatter:

a) tilsetning av minst en polyvalent kationfølende reseptor (PVCR)-modulator til vannet i en mengde tilstrekkelig til å modulere ekspresjon og/eller sensitivitet av i det minste en PVCR, nevnte PVCR-modulator er en som endrer luktesansen til fisken for odoranten;

b) tilsetning av fôr til vannet for konsumering av fisken, nevnte fôr inneholder et middel tilstrekkelig til å bidra med et betydelig øket nivå av nevnte PVCR-modulator i serum av fisken ved konsumering av fôret, hvorved fisken innprentes med odoranten;

c) eksponering av fisken for nevnte odorant enten ved tilsetning av odoranten til fôret, eller til ferskvannet, hvorved fisken innprentes med odoranten; og

d) tilveiebringe en kilde av nevnte odorant i vannet i hvilket fisken holdes eller overføres til, for derved å forårsake at den innprentede fisken reagerer med nevnte odorant.

I én utførelsesform kan fisk (f.eks. marin fisk eller anadrom fisk) overføres til sjøvann og i en annen utførelsesform kan fisk (f.eks.

ferskvannsfisk) overføres til ferskvann uten PVCR-modulator tilsatt. I enda en annen utførelsesform kan fisk overføres til ferskvann som har PVCR-modulator, men uten odoranten tilsatt. Foreliggende oppfinnelse omfatter også tilveiebringelse av en kilde for nevnte odorant etter at fisk er overført til den
5 andre vannmasse. Når fisken blir overført til den andre vannmasse, kan det olfaktoriske sanseapparat til fisken skjelne odoranten eller blir sensibilisert for odoranten. Endring av olfaktorisk sansing av fisk for odoranten omfatter videre generering av en olfaktorisk nerveimpuls etter binding av odoranten til de olfaktoriske lameller i fisken. Metodene omfatter også tilsetning av en PVCR-
10 modulator til fôret. Eksempler på fisketiltrekkende midler er aminosyrer, nukleotider, organiske forbindelser og kombinasjoner derav. Forbindelser avledet ved utføring av en pattedyr-fingerskylling kan for eksempel anvendes som et fiskefrastøtningsmiddel.

I en annen utførelsesform angår foreliggende oppfinnelse metoder for
15 innprenting av fisk med minst én odorant for fisk ved tilsetning av minst én PVCR-modulator til den første vannmasse (f.eks. ferskvann) i en mengde tilstrekkelig til å modulere ekspresjon og/eller sensitivitet av minst én PVCR; tilsetning av minst én odorant til vannet; og tilsetning av fôr for fiskekonsum til vannet, hvor fôret inneholder en mengde av NaCl tilstrekkelig til å bidra til et
20 betydelig øket nivå av PVCR-modulator i serum fra fisken. PVCR-modulator endrer olfaktorisk sansing av odoranten av fisk. Foreliggende oppfinnelse omfatter også tilveiebringelse av en kilde for nevnte odorant etter at fisk er overført til en andre vannmasse. Når fisken blir overført til den andre vannmasse, kan det olfaktoriske sanseapparat til fisken skjelne odoranten eller
25 blir sensibilisert for odoranten.

I et andre aspekt av foreliggende oppfinnelse omfattes en metode for oppdrett av fisk ved å fôre fisken i vann med minst en attraktant for nevnte fisk, kjennetegnet ved at fisken har blitt innprentet i vann med attraktanten hvor nevnte metode omfatter tilsetning av fôr for fiskekonsumering til vannet, nevnte
30 fôr inneholder nevnte attraktant og en kilde for ernæring, derved forårsakende at den innprentede fisken reagerer på attraktanten og konsumerer fôret, og hvor fisken er innprentet med attraktanten ved:

- a) tilsetning av minst en PVCR-modulator til vannet i en mengde tilstrekkelig til å modulere ekspresjon og/eller sensitivitet til minst en PVCR, nevnte PVCR-modulator er en som endrer det olfaktoriske føleapparatet til fisken for odoranten;

5

- b) tilsetning av fôr for fiskekonsumering til vannet, nevnte fôr inneholdende en mengde av et middel tilstrekkelig til betydelig å øke nivået av nevnte PVCR-modulator i serum av fisken ved konsumering av fôret; og

10 Foreliggende oppfinnelse omfatter også metoder for oppdrett av anadrom fisk slik at den anadrome fisk blir sensibilisert for minst én fiskeodorant ved innprenting av den anadrome fisk med fisketiltrekningsmiddel i ferskvann under smoltifisering, som beskrevet her; overføring av anadrom fisk til sjøvann; og tilsetning av fôr for fiskekonsum til sjøvannet, hvor fôret
15 inneholder en kilde for ernæring og tiltrekningsmidlet anvendt for innprenting. Når overført til sjøvann kan det olfaktoriske sanseapparat til disse innprentede fiskene skjelne tiltrekningsmidlet eller blir sensibilisert for tiltrekningsmidlet.

Det beskrives også fôr for konsum av anadrom fisk i ferskvann. Fôret omfatter én eller flere kilder for ernæring; en mengde av NaCl mellom ca.
20 10.000 mg/kg og ca. 100.000 mg/kg; og minst ett fisketiltrekningsmiddel. Fôret kan videre omfatte tilsetning av en PVCR-modulator så som tryptofan i en mengde mellom ca. 1 og ca. 10 g/kg. Tilsvarende omfatter foreliggende oppfinnelse fôr for konsum av anadrom fisk i sjøvann. Dette sjøvannfôr omfatter en kilde for ernæring; og fisketiltrekningsmidlet med hvilket fisk er
25 innprentet.

Det beskrives også metoder for identifikasjon av en fiske-odorant og dens modulering av minst én PVCR til stede i det olfaktoriske systemet til fisk, ved å eksponere odoranten som skal testes for fiskevev, hvor minst én odorant-reseptor og minst én PVCR er til stede i vev; og bedømme størrelsen eller
30 karakteristika av en olfaktorisk nerverespons. Tilstedeværelsen av en olfaktorisk nerveimpuls indikerer at forbindelsen er en odorant eller PVCR-modulator i vannet i kontakt med fiskens olfaktoriske epitel. Fravær av en olfaktorisk nerveimpuls indikerer at forbindelsen ikke er en odorant eller PVCR-

modulator i vannet i kontakt med fiskens olfaktoriske epitel. Endringer i størrelsen eller karakteristika av den olfaktoriske nerveimpuls etter eksponering av det olfaktoriske epitel for forskjellige kombinasjoner av odoranter og PVCR-modulatorer indikerer modifikasjoner av de olfaktoriske nervesignaler fra odorant-reseptorer og/eller PVCR-proteiner til stede i dette vev. Slike forsøk kan være ytterligere modifisert ved eksponering av fisken for en PVCR-modulator til stede i ferskvann så vel som fôret satt til ferskvannet før forsøk som anvender disse metoder. Forsøk kjent på området så som tiltrekningsadferdsforsøk eller frastøtningsadferdsforsøk kan utføres for å bestemme hvorvidt odoranten er henholdsvis et tiltrekningsmiddel eller frastøtningsmiddel.

Videre beskrives metoder for å øke matkonsum til anadrom fisk, metoder for å øke veksthastigheten for én eller flere anadrome fisk, metoder for å øke overlevelse av anadrom fisk etter deres overføring til sjøvann og metoder for å forbedre fôr-omdannelsesforhold (FCR) for anadrom fisk. Disse metoder blir utført med kunnskap om rollene til PVCR-proteiner i forskjellige organer omfattende de olfaktoriske lameller, hjerne og den gastrointestinale kanal. I fiskens olfaktoriske system har det vært oppdaget at PVCR-proteiner utfører kontrollerende funksjoner som setter fisken i stand til å "lukte" den ioniske sammensetning av det omgivende vann så vel som forene spesifikke tiltrekkende midler med vannsalinitet. I fiskens gastrointestinale kanal har det vært oppdaget at PVCR-proteiner virker som duale sensorer for både ion- og næringsmiddel-sammensetning av intestinalt innhold. Disse duale funksjoner til PVCR tillater at celler som kler fiskens G.I.-kanal samler informasjon om den ioniske sammensetning av vann og aminosyre-konsum avledet fra mat for optimalt å anvende næringsstoffer for vekst. Disse metoder kan utføres ved å underkaste den anadrome fisk for minst én PVCR-modulator i ferskvannet i en mengde tilstrekkelig til å modulere ekspresjon og/eller sensitivitet av minst én PVCR; tilsetning av fôr for fiskekonsum til ferskvannet, hvor fôret inneholder en mengde av NaCl tilstrekkelig til å bidra til et betydelig øket nivå av PVCR-modulator i serum fra den anadrome fisk og minst ett fiske-tiltrekningsmiddel; overføre den anadrome fisk til sjøvann; og tilsette fôr for fiskekonsum til sjøvannet. PVCR-modulatoren endrer olfaktorisk sansing av fisk for

tiltrekningsmidlet. Sjøvannfôret inneholder en kilde for ernæring og tiltrekningsmidlet anvendt under innprenting i en mengde tilstrekkelig til å modulere PVCR i olfaktorisk vev til fisken

Foreliggende oppfinnelse angår også metoder for tiltrekking eller
 5 hjem søking av anadrom fisk som er innprentet. Den anadrome fisk blir innprentet med minst ett tiltrekningsmiddel i ferskvann under smoltifisering, som beskrevet her, hvorved det olfaktoriske sanseapparat til fisk kan skjelne tiltrekningsmidlet eller blir sensibilisert for tiltrekningsmidlet; den anadrome fisk blir overført til sjøvann; og fisken eksponert for tiltrekningsmidlet anvendt under
 10 innprentingsprosessen i en tilstrekkelig mengde til å modulere PVCR i det olfaktoriske sanseapparat til fisken. I sjøvann kan fisken utsettes for tiltrekningsmidlet ved å feste tiltrekningsmidlet til et objekt (f.eks. garn eller fiskeagn) og plassere objektet som har tiltrekningsmidlet festet dertil i sjøvannet.

15 I en annen utførelsesform angår foreliggende oppfinnelse metoder for frastøting av anadrom fisk som er innprentet, som beskrevet her, slik at fisken blir sensibilisert for minst ett fiskefrastøtningsmiddel. Metoden omfatter innprenting av den anadrome fisk med minst ett frastøtningsmiddel i ferskvann under smoltifisering, hvorved det olfaktoriske sanseapparatet til fisken kan
 20 skjelne frastøtningsmidlet eller blir sensibilisert for frastøtningsmidlet; overføring av anadrom fisk til sjøvann; og eksponering av fisken for samme frastøtningsmiddel anvendt under innprentingsprosessen i en tilstrekkelig mengde til å modulere PVCR i det olfaktoriske sanseapparat til fisken. Frastøtningsmidlet kan festes til et objekt som blir plassert i sjøvannet.

25 Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en rekke fordeler omfattende for eksempel: å la oppdrettsanlegg øke matkonsumet til fisk slik at de vokser raskere; hjem søking av fisk for forbedret formering; lettere tiltrekning av fisk i et garn eller med et agn; og frastøtning av fisk fra farlige områder.

30 KORT BESKRIVELSE AV TEGNINGENE

Figur 1 er et diagram som illustrerer partielle nukleotid- (SEKV ID NR:1) og aminosyre- (SEKV ID NR:2) sekvenser av den polyvalente kationfølende reseptor (PVCR) til atlantehavslaks (*Salmo salar*).

Figur 2 er et diagram som illustrerer partielle nukleotid- (SEKV ID NR:3) og aminosyre- (SEKV ID NR:4) sekvenser av PVCR til arktisk røye (*Salvelinus alpinus*).

Figur 3 er et diagram som illustrerer partielle nukleotid- (SEKV ID NR:5) og aminosyre- (SEKV ID NR:6) sekvenser av PVCR til regnbueørret (*Onchorhynchus mykiss*).

Figurer 4A-E er diagrammer som illustrerer full-lengde nukleinsyre- (SEKV ID NR.:7) og aminosyre- (SEKV ID NR.:8) sekvens av hainyre-kation-reseptor ("SKCaR").

Figur 5 er en serie av fotografier av immunocyto kjemi som viser PVCR-lokalisering av olfaktorisk bulbus nerve og lameller til atlantehavslaks ved anvendelse av et anti-PVCR-antistoff.

Figur 6 er et skjema som illustrerer effekten av ytre og indre ionekonsentrasjoner på de olfaktoriske lameller som respons på PVCR-modulatorer.

Figur 7 er fotografier av immunocyto kjemi som viser PVCR-protein-ekspressjon ved utvikling av nasale lameller og olfaktorisk bulbus etter klekking av atlantehavslaks ved anvendelse av et anti-PVCR antistoff.

Figur 8 er et fotografi av immunocyto kjemi som viser PVCR-lokalisering i nasale lameller av pigghå ved anvendelse av et anti-PVCR antistoff.

Figur 9 er et fotografi av et Southern blot fra RT-PCR-analyser av vev fra atlantehavslaks som viser tilstedeværelsen av PVCR mRNA i nasale lameller tilpasset ferskvann.

Figur 10 er et histogram som illustrerer mengden av PVCR-protein, som bestemt ved en ELISA (ng) for forskjellige vevprøver (gjelle, lever, hjerte, muskel, mage, olfaktorisk epitel, nyre, urinblære, hjerne, hypofyse, olfaktorisk bulbus, pyloric caeca, proksimal tarm og distal tarm).

Figur 11 viser rå og integrerte registreringer fra høyresistens-elektroder av ferskvann-tilpasset atlantehavslaks når eksponert for 500 μ M L-alanin, 1 mmol kalsium, 50 μ M gadolinium og 250 mmol av NaCl. Figurene viser eksistensen av en olfaktorisk registrering som respons på L-alanin, kalsium, gadolinium og NaCl.

Figur 12A er en kurve som viser responsdata for ferskvann-tilpasset atlanterhavslaks nasale lameller for kalsium, magnesium, gadolinium og natriumklorid normalisert for signalet oppnådd med 10 mM kalsium.

Figur 12B er en kurve som viser responsdata for ferskvann-tilpasset
 5 atlanterhavslaks nasale lameller for kalsium, magnesium, gadolinium og natriumklorid ved forskjellige konsentrasjoner ($10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$, $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, $10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, $10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$, $10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$, $10^{-1} \text{ mol l}^{-1}$, 10^0 mol l^{-1}).

Figur 12C er en kurve som viser responsdata for ferskvann-tilpasset atlanterhavslaks nasale lameller for kalsium ved forskjellige konsentrasjoner
 10 ($10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$, $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, $10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, $10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$, $10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$) og kunstig sjøvann (ASW) i nærvær av 500 mM natriumklorid.

Figur 12D er et histogram som viser responsdata for ferskvann-tilpasset atlanterhavslaks nasale lameller for 500 mM natriumklorid, kalsiumfritt ASW, divalent-fritt ASW, ASW, destillert vann (kontroll); og de følgende PVCR-
 15 agonister i kombinasjon med 500 mM natriumklorid: 1mM magnesium, 1mM kalsium, 1mM strontium og 50 μM gadolinium.

Figur 13 viser rå registrering fra høyresistens-elektroder av olfaktorisk nerveimpuls i nærvær av et frastøtningsmiddel (finger-skylling) og i nærvær av en PVCR-agonist (gadolinium) og et frastøtningsmiddel (finger-skylling).
 20 Figuren viser at den olfaktoriske nerveimpuls til frastøtningsmidlet blir reversibelt endret i nærvær av en PVCR-agonist.

Figur 14 viser rå registreringer fra høyresistens-elektroder av ferskvann-tilpasset atlanterhavslaks som respons på en serie av gjentatte stimuli (L-alanin eller NaCl) med 2 minutters intervaller. Figuren viser at den olfaktoriske
 25 nerveimpuls til tiltrekningsmidlet blir reversibelt endret i nærvær av en PVCR-agonist

Figur 15 er en grafisk representasjon av forholdet fra FURA-2-celler som uttrykker PVCR i nærvær eller fravær av 10 mM L-isoleucin i forskjellige konsentrasjoner (0,5, 2,5, 5,0, 7,5, 10,0 og 20,0 mM) av ekstracellulær kalsium
 30 (Ca^{2+}).

Figur 16 er en grafisk representasjon av den fraksjonerte Ca^{2+} -respons, sammenlignet med ekstracellulær Ca^{2+} (mM) for PVCR i bare Ca^{2+} , fenyilalanin, isoleucin eller AA-blanding (en rekke L-isomerer i forskjellige konsentrasjoner).

Figur 17 er en grafisk representasjon av olfaktoriske nerve-registreringer av ferskvann-atlanterhavslaks-smolt olfaktorisk epitel i destillert vann, ASW og kontroll-aminosyre (500 μ M L-alanin).

Foreliggende oppfinnelse angår den fundamentale oppdagelse at fisk
 5 kan innprentes med en odorant (f.eks. et tiltrekningsmiddel eller frastøtningsmiddel) under visse utviklingsstadier og senere, når fisken blir eksponert for den samme odorant, kan den lett skjelne odoranten eller blir sensibilisert for odoranten. Spesielt omfatter foreliggende oppfinnelse den nyoppdagete forståelse at en polyvalent kationfølende reseptor (PVCR), har en
 10 rolle ved å la fisk "sanser" både ioner og aminosyrer. PVCR-proteiner tillater at fisken "sanser" både vannsalinitet (f.eks. ionekonsentrasjoner) og konsentrasjoner av aminosyrer i vannet som omgir dem, i deres kroppsfluider og i innholdet av deres gastrointestinale kanal. PVCR virker med odorant-reseptorer til å innprente fisk med en odorant, slik at modulatorer av PVCR
 15 endrer olfaktoriske sansingskapabiliteter til fisken.

Metodene gjelder alle typer akvatiske arter omfattende ferskvannsfisk, marin fisk, anadrom fisk, skalldyr, bløtdyr og pigghuder.

Marin fisk er fisk som lever, i det minste mesteparten av deres voksne liv, i sjøvann. Marin fisk omfatter for eksempel torsk, kolje, lysing, kveite,
 20 makrell, lyr, havabbor, sverdfisk, tunfisk, vinterflyndre og sommerflyndre. Ferskvannsfisk er fisk som lever, i det minste mesteparten av deres voksne liv, i ferskvann. Betegnelsene "marin fisk" og "ferskvannsfisk" er forstått av fagfolk på området.

Anadrom fisk er fisk som svømmer fra sjøvann til ferskvann for å gyte.
 25 Anadrom fisk omfatter for eksempel laks (f.eks. atlanterhavslaks (*Salmo salar*), Coho laks (*Oncorhynchus kisutch*), Chum laks (*Oncorhynchus keta*), Chinook laks (*Oncorhynchus tshawytscha*), Pink laks (*Oncorhynchus gorbuscha*), Sockeye laks (*Oncorhynchus nerka*)), røye (f.eks. arktisk røye (*Salvelinus alpinus*)) og ørret (f.eks. regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*)). Anadrom fisk
 30 omfatter også fisk som er ute av stand til å svømme til sjøvann (f.eks. innestengt av land), men har de fysiologiske mekanismer til å tilpasse seg til sjøvann. Betegnelsen "pre-voksen anadrom fisk," som anvendt her, angir anadrom fisk som ikke ennå er tilpasset sjøvann. Disse fiskene er generelt

unge fisk. Pre-voksen anadrom fisk omfatter, men er ikke begrenset til fisk som er fingerling, parr eller smolt. Som anvendt her, angir "smolt" fisk som gjennomgår fysiologiske endringer som lar fisken tilpasses til sjøvann eller overlever etter påfølgende overføring til sjøvann. Betegnelsen "smolt" angir
5 også fisk som ikke er på det nøyaktige utviklingsstadiet til å overleve uskadet etter overføring til sjøvann, men er heller én av en populasjon av fisk hvor, basert på statistisk prøving og evaluering, populasjonen av fisk blir bestemt å være på et fysiologisk stadium klar for overføring til sjøvann.

Anadrom fisk så som laks kan returnere til et spesifikt sted i en
10 ferskvanns-elv hvor de ble klekket til tross for år med reise og opphold i store deler av havet i deres voksne liv. For å oppnå dette gjennomgår anadrom fisk innprenting under forskjellige faser av deres livssyklus som setter dem i stand til å gjenkjenne og returnere til et spesifikt sted. Én slik fase er under deres larvestadium i livet når de klekkes i et elveleie og en annen fase er under
15 smoltifisering i elven når de tilpasses for liv i sjøvann. Mens det har vært demonstrert at eksponering av laks for en spesifikk odorant under smoltifisering innprenter den tilsvarende voksne laks til å returnere til stedet inneholdende den odorant, var det inntil oppdagelsen ifølge foreliggende oppfinnelse uklart nøyaktig hvorledes disse fisk utførte denne oppgaven med enten naturlige eller
20 kunstige odoranter. Yngelmigrering av fisk til spesifikke områder av estuarer eller elver er ikke begrenset til anadrome fiskearter. Marin flatfisk så som flyndre migrerer fra dypt havvann til spesifikke estuarer i elver nær kysten for å gyte og returnerer deretter til havet.

En forbedret evne til å tiltrekke eller frastøte fisk ville sterkt hjelpe
25 oppdrettsprodusenter i oppdrett og produksjon av fisk for både fornyelse av utarmede naturlige populasjoner så vel som kommersiell produksjon i havmerder eller i havbruk. Aktuelle metoder idag omfatter fornyelse av villfisk-populasjoner ved produksjon av et stort antall unge fisk i oppdrettsanlegg fulgt av deres frigjøring til naturen ved elvemunninger eller estuarer. Anvendelse av
30 tiltrekkende midler for disse fisk kan bidra til effektiv høsting av fiskere ved anvendelse av enten krokar eller garn. På lignende måte skjer kommersiell produksjon av stort antall unge laks for havbruk i regioner så som Alaska og nordvestlige Stillehavet. Imidlertid er slike metoder ikke effektive ved at store

antall fisk ikke overlever deres overføring til naturen og således blir store antall fisk oppdrettet og satt fri for å gi en retur til ferskvannsstedet på 1-20% avhengig av de spesifikke arter. Fornyelsesanstrengelser for villfiskpopulasjoner blir hindret av omstreifing av et stort antall unge fisk til vanninntak til kraftanlegg og damturbiner. Vellykket aversjon hos slike unge fisk etter deres frislipping fra oppdrettsanlegget mot frastøtingsmidler ville effektivt øke effektiviteten av disse fornyelsesanstrengelser og/eller forhindre problemer forårsaket av fisken med hensyn til operasjon av kraftanleggene eller turbinene. Videre blir et stort antall laks og ørret produsert i ferskvanns-oppdrettsanlegg hvoretter de blir overført direkte til havmerder for utvoksing innenfor et begrenset område. Før foreliggende oppfinnelse møtte laksesmolt produsert ved denne direkte overføringsmetode multiple problemer ved tilpasning til deres nye sjøvannomgivelse. Forsinkelser i spising etter overføring til sjøvann og remodellering av tarmfunksjon for sjøvannliv reduserer nå veksten av disse fisk etter overføring til sjøvann.

Foreliggende oppfinnelse angår metoder for oppdrett av fisk. Fiskeoppdrettsanlegg har erfart vanskeligheter med oppdrett av anadrom fisk fordi tidsperioden hvor den pre-voksne fisk tilpasser seg til sjøvann (f.eks. gjennomgår smoltifisering) er kortvarig og kan være vanskelig å fastslå. Så når fisken blir overført til sjøvann, opplever de ofte stress (f.eks. osmotisk sjokk) og spiser dårlig. Mange av fiskene som blir overført dør som et resultat. Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer metoder og preparater som lar fisk bedre tilpasse seg til sjøvann og øke matkonsum ved innprenting av fisken med et tiltrekningsmiddel i ferskvann som har en PVCR-modulator og etter overføringen til sjøvann, gi fisken et fôr som har samme tiltrekningsmiddel.

PVCR-modulatoren endrer den olfaktoriske sansing til fisken for odoranten. I noen tilfeller reduserer eller fjerner tilstedeværelsen av en (f.eks. minst én) PVCR-modulator i ferskvann reversibelt fiskens evne til å sanse visse odoranter. I andre tilfeller kan den forhøyes eller økes. Ved å eksponere fisken (f.eks. anadrom fisk) i ferskvann som har en PVCR-modulator for en odorant, får fisken en redusert eller sløvet respons på en odorant. PVCR lar fisk "sanse" forskjellige typer av modulatorer, som er ytterligere definert her. Betegnelsen "sanse" eller "sansing" angir PVCR's evne til å endre dens

ekspressjon og/eller sensitivitet som respons på en PVCR-modulator. I tillegg til å modulere PVCR, kan sansing av en odorant involvere endring av én eller flere olfaktoriske reseptorer. PVCR kan virke, for eksempel med én eller flere olfaktoriske reseptorer for å danne en nerveimpuls under sansing av en
5 odorant. Generering av denne nerveimpuls skjer etter binding av odoranten til de olfaktoriske lameller i fisken.

Fiskens olfaktoriske system består av det olfaktoriske epitel, olfaktorisk nerve og olfaktorisk bulbus i hjernen. Ved anvendelse av metoder ifølge foreliggende oppfinnelse viser anti-PVCR antiserum og RT-PCR at hver
10 komponent av fiskens olfaktoriske system inneholder minst ett PVCR-protein. Foreliggende oppfinnelse angår metoder som demonstrerer at minst én PVCR fungerer til å la fisk "lukte" salinitet til det omgivende vann via sansing av ionekonsentrasjoner av Ca^{2+} , Mg^{2+} og Na^+ med PVCR. Foreliggende oppfinnelse angår videre metoder hvorved eksponering av fiskens olfaktoriske
15 epitel for PVCR-modulatorer så som Ca^{2+} , Mg^{2+} , Gd^{3+} og neomycin produserer en konsentrasjonsavhengig olfaktorisk nerveimpuls i konsentrasjonsområder som svarer til de som forekommer i salinitetsområder møtt av vill-laks. Disse data verifiserer tilstedeværelse av funksjonelle PVCR-proteiner i olfaktoriske epitelceller og deres nøkkelrolle for salinitet-sansing av fisk.

20 Disse samme metoder ble anvendt for å demonstrere at samtidig eksponering av det olfaktoriske epitel for en odorant (så som aminosyre tiltrekningsmiddel eller frastøtningsmiddel) og en PVCR-agonist (Ca^{2+} eller Gd^{3+}) endrer størrelsen og/eller karakteristika til den resulterende olfaktoriske nerveimpuls. Denne endring er produsert av interaksjoner mellom signalene
25 produsert av odorantreseptoren (sansing av spesifikke odorantmolekyler) og PVCR (sansing av både salinitet og aminosyrer hvis til stede). PVCR modulerer eller endrer odorantreseptorer og deres evne til å danne en nerveimpuls.

Tilstedeværelse av både PVCR-proteiner (sansing av salinitet og
30 utvalgte aminosyrer) sammen med odorant-reseptorer (sansing av spesifikke odorant-molekyler) gir en forklaring på hvorledes laks kan sanse både lukten av spesifikke elver eller strømmen så vel som deres salinitetsprofil når de vender hjem for å gyte.

Ferskvann og marin fisk sanser odoranter i akvatiske omgivelser som varierer sterkt i deres ioniske sammensetning. PVCR i olfaktoriske epitelceller spiller en betydelig rolle i å la olfaktoriske celler gi en meningsfull respons på odoranter over et bredt område av ioniske omgivelser. Videre tillater PVCR i

5 spesifikke olfaktoriske celler at ferskvann og marin fisk "lukter" eller sanser vannsalinitet. PVCR kan sanse forskjellige modulatorer, som beskrevet her og spesielt aminosyrer og divalente kationer.

Tilstedeværelse av PVCR-modulatorer i det omgivende ferskvann så vel som serum til fisken endrer ekspresjon og/eller sensitivitet av minst én PVCR

10 på en måte lignende den som normalt skjer bare etter at fisken er overført til sjøvann. Således, istedenfor innprenting med odoranter til stede i mat eller vann etter deres overføring til sjøvann, kan anadrom fisk innprentes med odoranter på en måte identisk med den som skjer i sjøvann, men overraskende forblir fisken i ferskvann. Når fisken blir overført til sjøvann, er det olfaktoriske

15 sanseapparat til fisken allerede fullstendig tilpasset og innprentet til en sjøvann-omgivelse og fisken kan lett skjelne og huske odoranten i sjøvann.

En odorant er en forbindelse som binder til olfaktoriske reseptorer og forårsaker at fisken sanser odoranter. Generering av en olfaktorisk nerveimpuls skjer etter binding av odoranten til de olfaktoriske lameller. En

20 fiskeodorant er enten et fisketiltrekningsmiddel eller fiskefrastøtningsmiddel. Et fisketiltrekningsmiddel er en forbindelse til hvilken fisk blir tiltrukket.

Sensitiviteten av tiltrekningsmidlet blir modulert, i det minste delvis, av sensitiviteten av og/eller ekspresjonen av PVCR i det olfaktoriske apparatet til fisken som respons på en PVCR-modulator. Eksempler på tiltrekningsmidler

25 omfatter aminosyrer (f.eks. L-tryptofan, L-tyrosin, L-fenylalanin, L-alanin, L-serin, L-arginin, L-histidin, L-leucin, L-isoleucin, L-asparaginsyre, L-glutaminsyre, L-glycin, L-lysin, L-metionin, L-asparagin, L-prolin, L-glutamin, L-treonin, L-valin og L-cystein), nukleotider (f.eks. inosin-monofosfat), organiske forbindelser (f.eks. glycin-betain og trimetylaminoksyd) eller en kombinasjon

30 derav. Tilsvarende er et fiskefrastøtningsmiddel en forbindelse som fisk blir frastøtt av og sensitiviteten til fisken for frastøtningsmidlet blir endret gjennom ekspresjon og/eller sensitivitet til PVCR i det olfaktoriske apparatet til fisken i nærvær av en PVCR-modulator. Et eksempel på et frastøtningsmiddel er en

“fingerskylling” som er en blanding av pattedyroljer og fettsyrer produsert av de epidermale celler i huden og blir lagt igjen etter at menneskefingre blir skyllet med en vandig løsning. Metoder for utføring av en fingerskylling er kjent på området og er beskrevet mer detaljert i eksempelvsnittet.

5 I løpet av tiden fisken er eksponert for en PVCR-modulator og en odorant i ferskvann, blir de “innprentet” med odoranten. Prosessen med innprenting av fisken med en odorant omfatter å skape en vedvarende effekt eller inntrykk på fisken slik at fisken kan “reagere” på odoranten, f.eks. blir de sensibilisert for odoranten eller kan skjelne odoranten. Å være sensibilisert for
10 odoranten angir fiskens evne til lettere å gjenkjenne eller huske odoranten. Å skjelne en odorant angir fiskens evne til å differensiere blant én eller flere odoranter eller ha en preferanse for én odorant fremfor en annen. I én utførelsesform angår oppfinnelsen metoder for innprenting av fisken med et tiltrekningsmiddel og modulering av PVCR som ytterligere beskrevet her og
15 deretter tilveiebringe et unikt fôrpreparat som har samme tiltrekningsmiddel.

Spesielt omfatter metodene for oppdrett av fisk innprenting av fisken med tiltrekningsmidlet ved tilsetning av minst én PVCR-modulator (f.eks. kalsium og magnesium) til ferskvannet og tilsetning av et spesielt fremstilt eller modifisert fôr til ferskvannet for konsum av fisken. Fôret inneholder en
20 tilstrekkelig mengde av natriumklorid (NaCl) (f.eks. mellom ca. 1% og ca. 10 vekt% eller ca. 10.000 mg/kg til ca. 100.000 mg/kg) for betydelig å øke nivåer av PVCR-modulator i serumet og et tiltrekningsmiddel (f.eks. mellom spormengder og ca. 100 mg/kg). Denne mengden av NaCl i fôret forårsaker eller medfører at den anadrome fisk drikker mer ferskvann. Siden ferskvannet
25 inneholder en PVCR-modulator og fisken inntar økede mengder av den, vil serumnivået av PVCR-modulator betydelig øke i fisken og forårsake modulert (f.eks. øket og/eller redusert) PVCR-ekspressjon og/eller endret PVCR-sensitivitet. PVCR-modulatoren endrer den olfaktoriske sansing til fisken for tiltrekningsmidlet, som beskrevet her.

30 I en annen utførelsesform blir fisken (f.eks. anadrom fisk) innprentet, ikke ved tilsetning av odoranten til fôret, men ved tilsetning av en odorant til ferskvannet som har en PCVR-modulator (PVCR-modulator omgivelse) f.eks. mens fisken gjennomgår smoltifisering eller er i visse larvestadier. Fisken blir

underkastet samme trinn som beskrevet her. Fisken er i PVCR-modulator omgivelse og blir matet en diett som har NaCl og, eventuelt, en PVCR-modulator (så som tryptofan), bortsett fra at odoranten blir tilsatt ferskvannet heller enn føret. Odoranten blir satt til ferskvannet i en mengde mellom ca. 1
5 nanomol og ca. 500 millimol. Denne prosessen innprenter fisken med odoranten ved å modulere ekspresjon og/eller sensitivitet av PVCR i det olfaktoriske apparatet, slik at det olfaktoriske sanseapparat til fisken kan skjelne odoranten eller blir sensibilisert for odoranten.

Foreliggende oppfinnelse, i enda en annen utførelsesform, omfatter
10 innføring av PVCR-modulator og odorant i en første vannmasse. Etter at fiskene er innprentet blir de overført til en andre vannmasse. Avhengig av typen fisk som blir underkastet trinnene ifølge foreliggende oppfinnelse kan fisken komme fra ferskvann eller sjøvann. For eksempel blir pre-voksen anadrom fisk holdt i ferskvann før trinnene ifølge foreliggende oppfinnelse utføres. Under
15 smoltifisering, som beskrevet her, blir fisken underkastet PVCR-modulator og odoranten, som derved innprenter fisken. Den anadrome fisk blir deretter overført til sjøvann, hvor de lettere kan skjelne odoranten. I tilfellet av ferskvannsfisk kan for eksempel fisken holdes i ferskvann og PVCR-modulator og odorant kan tilføres til ferskvannet. Når den innlærende fase har funnet
20 sted, kan fisken deretter overføres tilbake til ferskvann uten PVCR-modulatorer tilsatt. I enda et annet eksempel kan marin fisk overføres fra sjøvann direkte til ferskvann som har PVCR-modulator og odorant tilsatt. Alternativt, siden marin fisk også kan oppdrettes i ferskvann som har PVCR-modulatorer tilsatt, kan foreliggende oppfinnelse utføres ved tilføring av en odorant til denne PVCR-
25 omgivelse, som beskrevet her. Metoder for oppdrett av marin fisk i ferskvann er beskrevet i detalj i patent nr. 6,463,882. Etter at de marine fiskene er innprentet, kan de deretter overføres til sjøvann eller hvis ønskelig, tilbake til ferskvann som har PVCR-modulator tilsatt (f.eks. vann uten odoranten).

Når fiskene er innprentede kan de overføres fra ferskvannomgivelsen
30 som har PVCR-modulator og odorant, til en andre vannmasse (f.eks. sjøvann, ferskvann eller ferskvann som har en PVCR-modulator). Foreliggende oppfinnelse omfatter å tilveiebringe en kilde for odoranten etter at fiskene er overført. Kilden kan være praktisk talt hvilken som helst ting eller preparat som

lar fisken bli eksponert for odoranten. Denne odorant er lik odoranten med hvilken fisken er innprentet. Eksempler, som er ytterligere beskrevet her, omfatter objekter, preparater, suspensjoner, spray-preparater, etc. Når fisken blir eksponert for odoranten etter å være overført, kan fisken reagere på odoranten, som beskrevet her.

I tilfellet av anadrom fisk, når fisk er innprentet med odoranten og har gjennomgått smoltifiseringsprosessen, er fisken klar til å bli overført til sjøvann. Når fisken blir overført til sjøvann blir fisken gitt fôr som inneholder ikke bare en kilde for ernæring, men også samme tiltrekningsmiddel eller kombinasjon av tiltrekningsmidler som ble innprentet i fisken mens fisken var i ferskvann og eksponert for prosessen beskrevet her. Fisken inntar mer fôr og gjør dette tidligere etter overføring til sjøvann, enn fisk som ikke er eksponert for metodene ifølge foreliggende oppfinnelse. Følgelig akklimatiseres fisken bedre til sjøvannet og vokser raskere. I én utførelsesform foretrekker fisk fôr som har tiltrekningsmidlet som ble innprentet i dem, sammenlignet med fôr som har et tiltrekningsmiddel som ikke var innprentet i dem.

Smoltifisering er stadiet ved hvilket en fisk gjennomgår akklimatisering eller tilpasning fra ferskvann til sjøvann. Smoltifisering angir også en prosess som skjer i pre-voksen anadrom fisk som er fysiologisk pre-tilpasset til sjøvann mens fortsatt i ferskvann. Smoltifiseringsprosessen varierer fra arter til arter. Forskjellige arter av anadrom fisk kan gjennomgå smoltifisering ved forskjellige størrelser, vekt og tider i livet til fisken. Foreliggende oppfinnelse medfører at den store majoritet av eller alle de pre-voksne anadrome fisk gjennomgår denne prosessen og forbereder dem for overføring til sjøvann. Fisk kan innprentes med en odorant, som beskrevet her, under dette stadium.

I tillegg til innprenting under smoltifisering, kan innprentingsprosessen også skje under andre utviklingsstadier av fisken. Odoranter kan også innprentes i fiskelarver. Et innledende larvestadium, referert til som "plommesekk" larvestadium, er et under hvilket fiskens primære kilde for mat kommer fra plommesekken. Under dette stadium kan larvene utsettes for en PVCR-modulator og en odorant slik at odoranten kan innprentes. PVCR-modulator og odorant blir satt til ferskvannet, som ytterligere beskrevet her, i en tilstrekkelig tidsperiode til å forårsake at innprenting skjer. Et annet

utviklingsstadium under hvilket innprenting kan skje er i det "første spisende" larvestadium. I dette stadium slutter fisken gradvis å anvende plommesekken som en kilde for ernæring og begynner å innta fôr. De først spisende larver kan utsettes for en PVCR-modulator og odorant for innprenting. Som
5 beskrevet her kan odoranten tilsettes til ferskvannet eller til føret. Innprentingsprosessen kan skje på ett eller en kombinasjon av disse stadier, nemlig plommesekk larvestadiet, først spisende larvestadium og smoltifiseringsstadiet ved anvendelse av samme odorant. Ved å utføre innprentingsprosessen under mer enn ett av disse stadier skapes en sterkere respons på visse
10 odoranter når fisken blir eksponert for den etter overføring til sjøvann.

Foreliggende oppfinnelse kan også anvendes for andre typer av fisk, nemlig flyndre som migrerer til kystestuarer som har fortynnede sjøvannskonsentrasjoner hvor de gyter. De resulterende larve- og unge stadier av flyndrer utvikles i disse estuarer før de returnerer til sjøen. Innprenting av
15 flatfisk via fornyelsesprogrammer som for tiden er i gang ville gi en omgivelse hvor metodene ifølge foreliggende oppfinnelse kan anvendes, som ytterligere beskrevet her.

Den anadrome fisk blir holdt i ferskvann før tilsetning av PVCR-modulator. Betegnelsen "ferskvann" betyr vann som kommer fra for eksempel
20 en strøm, elv, dammer, offentlig vannforsyning eller fra andre ikke-marine kilder som for eksempel har den følgende ionesammensetning: mindre enn ca. 2 mM magnesium, kalsium og NaCl. Betegnelsen "ferskvann" angir også ferskvann til hvilket minst én PVCR-modulator er tilsatt, som beskrevet her.

PVCR-modulatoren blir satt til ferskvannet i tilstrekkelige mengder til å
25 modulere ekspresjon eller endre sensitivitet av PVCR. PVCR blir isolert fra forskjellige vev av mange typer fra anadrom fisk ved anvendelse av molekylære biologiteknikker, som beskrevet i eksempelavsnittet. DNA ble isolert fra prøver fra forskjellige arter av anadrome fisk omfattende atlantehavslaks, røye, Chum laks, Coho laks, King eller Chinook laks, Pink laks, Sockeye laks og ørret.

30 PVCR, som er lokalisert i forskjellige vev (f.eks. gjelle, skinn, olfaktoriske lameller, olfaktorisk epitel, tarm, nyre, urinblære, G.I.-kanal, hjerne eller muskel) av anadrom fisk, sanser endringer i PVCR-modulatorer omfattende forskjellige ioner (f.eks. divalente kationer), for eksempel i det omgivende vann, i deres

serum eller i det lumenale innhold av tubuli inne i kroppen, så som nyre, urinblære eller tarm. PVCR lokalisert i det olfaktoriske apparatet til fisk spiller en viktig rolle i sansing av PVCR-modulatorer og/eller odoranter, som beskrevet her. Dens evne til å sanse disse modulatorer øker og/eller reduserer

5 ekspresjon av PVCR, for derved å la fisken bedre tilpasses til sjøvann. Øket og/eller redusert ekspresjon av PVCR kan forekomme, for eksempel i ett eller flere vev eller i alle vev. Når modulering av PVCR skjer i det olfaktoriske apparatet til fisken, kan fisken sanse PVCR-modulator eller odorant og sammen med reseptorer, sende en nerveimpuls til hjernen. Tilstedeværelse av

10 en PVCR-modulator reduserer reversibelt ekspresjon, sensitivitet og/eller mottagelighet av PVCR for en odorant, og reduserer, minimaliserer eller fjerner derved den olfaktoriske nerveimpuls.

Molekylær kloning av PVCR-proteiner demonstrerer at disse ionereseptorer tilhører en stor superfamilie av GTP-bindingsprotein-koblede

15 reseptorer som omfatter odorant- og feromon-reseptorer. Lokalisering av PVCR- (CaR) ekspresjon i nervesystemet til pattedyr demonstrerer rikelig ekspresjon av CaR mRNA i olfaktoriske lapper.

Molekylær kloning av pattedyr- og fisk-odorantreseptorer har demonstrert at PVCR (hos pattedyr kalsiumreseptoren eller CaR) er strukturelt

20 relatert til både odorant- og feromon-reseptorer (som binder en rekke odorant-molekyler) så vel som metabotrope glutamat-reseptorer (mGluR) som binder glutamat. Både odorant og PVCR er begge G-protein-koblede reseptorer som interagerer med G-proteiner for å aktivere signaltransduksjonsmolekyler omfattende adenylatcyklase og/eller fosfolipase A₂ for å øke intracellulære Ca²⁺

25 konsentrasjoner i celler.

En "PVCR-modulator" er definert her å bety en forbindelse som modulerer (f.eks. øker og/eller reduserer) ekspresjon av PVCR eller endrer sensitivitet eller mottagelighet av PVCR. Slike forbindelser omfatter, men er ikke begrenset til, PVCR-agonister (f.eks. uorganiske polykationer, organiske

30 polykationer og aminosyrer), Type II kalsimimetika og forbindelser som indirekte endrer PVCR-ekspresjon (f.eks. 1,25 dihydroksyvitamin D i konsentrasjoner på ca. 3.000 –10.000 Internasjonale enheter /kg fôr), cytokiner så som Interleukin beta og makrofag kjemotaktisk Peptid-1 (MCP-1)).

Eksempler på Type II kalsimimetika, som øker og/eller reduserer ekspresjon og/eller sensitivitet av PVCR, er for eksempel NPS-R-467 og NPS-R-568 fra NPS Pharmaceutical Inc., (Salt Lake, Utah, patent nr. 5,962,314; 5,763,569; 5,858,684; 5,981,599; 6,001,884) som kan administreres i konsentrasjoner på mellom ca. 0,1 μM og ca. 100 μM fôr eller vann. Se Nemeth, E.F. *et al.*, *PNAS* 95: 4040-4045 (1998). Eksempler på uorganiske polykationer er divalente kationer omfattende kalsium i en konsentrasjon mellom ca. 2,0 og ca. 10,0 mM og magnesium i en konsentrasjon mellom ca. 0,5 og ca. 10,0 mM; og trivalente kationer omfattende, men ikke begrenset til, gadolinium (Gd^{3+}) i en konsentrasjon mellom ca. 1 og ca. 500 μM . Organiske polykationer omfatter, men er ikke begrenset til, aminoglykosider så som neomycin eller gentamicin i konsentrasjoner mellom ca. 1 og ca. 8 g/kg fôr så vel som organiske polykationer omfattende polyaminer (f.eks. polyarginin, polylysin, polyhistidin, polyornitin, spermin, cadaverin, putrescin, kopolymerer av poly-arginin/histidin, poly-lysin/arginin i konsentrasjoner mellom ca. 10 μM og 10 mM fôr). Se Brown, E.M. *et al.*, *Endocrinology* 128: 3047-3054 (1991); Quinn, S.J. *et al.*, *Am. J. Physiol.* 273: C1315-1323 (1997). I tillegg omfatter PVCR-agonister aminosyrer så som L-tryptofan, L-tyrosin, L-fenylalanin, L-alanin, L-Serin, L-arginin, L-histidin, L-leucin, L-isoleucin, L-asparaginsyre, L-glutaminsyre, L-glycin, L-lysin, L-metionin, L-asparagin, L-prolin, L-glutamin, L-treonin, L-valin og L-cystein i konsentrasjoner mellom ca. 1 og ca. 10 g/kg fôr. Se Conigrave, A.D., *et al.*, *PNAS* 97: 4814-4819 (2000). Aminosyrer, i én utførelsesform, er også definert som de aminosyrer som kan sanses av minst én PVCR i nærvær av lave nivåer av ekstracellulær kalsium (f.eks. mellom ca. 1 mM og ca. 10 mM). I nærvær av ekstracellulær kalsium kan PVCR i organer eller vev så som tarm, pyloric caeca eller nyre bedre sanse aminosyrer. Se eksempelavsnittet. De molare konsentrasjoner refererer til fri eller ioniserte konsentrasjoner av PVCR-modulator i ferskvannet og omfatter ikke mengder av bundet PVCR-modulator (f.eks. PVCR-modulator bundet til negativt ladede partikler omfattende glass, proteiner eller plastoverflater). Hvilken som helst kombinasjon av disse modulatorer kan tilsettes til vannet eller til fôret (i tillegg til NaCl, som beskrevet her), så lenge kombinasjonen modulerer ekspresjon og/eller sensitivitet av PVCR.

PVCR-modulator kan administreres til fisken på flere måter.

Oppfinnelsen omfatter administrering av PVCR på hvilken som helst måte som er tilstrekkelig til å modulere ekspresjon og/eller endre sensitivitet av PVCR. I én utførelsesform blir PVCR-modulator enkelt satt til ferskvannet i forskjellige konsentrasjoner, som beskrevet her. En ferskvannomgivelse som har minst én PVCR-modulator er referert til her som en "PVCR-modulator-omgivelse". PVCR-modulatorer (f.eks. kalsium og magnesium) som blir satt til vannet modulerer ekspresjon og/eller endrer sensitiviteten til PVCR på skinn og gjeller av fisken og kan inntas av fisken, spesielt når fisk blir matet fôr som har mellom ca. 1% og ca. 10% NaCl (f.eks. i konsentrasjoner mellom ca. 10.000 mg/kg og ca. 100.000 mg/kg fôr). I tillegg til tilsetning av NaCl til fôret, kan PVCR-modulator (f.eks. en aminosyre så som tryptofan) også være satt til fôret. Mengder og typer av PVCR-modulatorer satt til fôret er også beskrevet her. Andre utførelsesformer omfatter å underkaste fisken PVCR-modulator ved å "dyppe" fisken i modulatorene, f.eks. organiske polykationer. De organiske polykationer kan formuleres på en slik måte at de lar polykationer festes til skinn og gjeller til fisken, i tilstrekkelige mengder til å modulere ekspresjon av PVCR.

I én foretrukket utførelsesform blir foreliggende oppfinnelse praktisert ved tilsetning av en kombinasjon av to PVCR-agonister til ferskvannet. Spesielt blir kalsium og magnesium satt til ferskvannet for å bringe konsentrasjonene av hver til mellom ca. 2,0 mM og ca. 10,0 mM av kalsium og mellom ca. 0,5 mM og ca. 10,0 mM av magnesium. I tillegg til tilsetning av kalsium og magnesium til vannet, kan disse områder av ionekonsentrasjoner oppnås ved å tilveiebringe en brakkvann- (f.eks. fortynnet sjøvann) omgivelse for fisken.

Kalsium og magnesium kan komme fra en rekke kilder, som når satt til vannet, kalsium- og/eller magnesium-nivåer modulerer ekspresjon av PVCR og/eller er innenfor de angitte områder. Kilder for kalsium og magnesium kan være en blanding av en rekke forbindelser eller kan hver komme fra en i det vesentlige ensartet eller ren forbindelse. Kilder for kalsium omfatter for eksempel $\text{Ca}(\text{CO}_3)_2$, CaCl_2 , CaSO_4 og $\text{Ca}(\text{OH})_2$ og kilder for magnesium omfatter for eksempel MgCl_2 , MgSO_4 , MgBr_2 og MgCO_3 .

I én utførelsesform omfatter oppfinnelsen intermitterende (f.eks. avbrutt) så vel som kontinuerlig (f.eks. uavbrutt) eksponering for ferskvann som har minst én PVCR-modulator, mens på NaCl-diett. Intermitterende eksponering for PVCR kan forekomme så lenge PVCR-ekspresjon og/eller endret sensitivitet
5 forblir modulert (f.eks. øket og/eller redusert i forskjellige vev).

Fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse forbereder fisk for overføring fra ferskvann til sjøvann. Den pre-voksne anadrome fisk blir holdt i en ferskvannomgivelse som har en PVCR-modulator lenge nok til tilstrekkelig å innprente odoranten i fisken. Fisken blir eksponert for odoranten mens i PVCR-
10 modulator omgivelse i et tidsrom tilstrekkelig til å innprente odoranten og modulere PVCR slik at generering av nerveimpulss i det olfaktoriske apparatet skjer. Lengden av tid avhenger av den fysiologiske og fysiske modenhet til fisken. Noen fisk vil lettere tilpasses til omgivelsen og modulere deres ekspresjon og/eller endre sensitivitet av deres PVCR, mens andre vil trenge
15 mer tid for dette. Faktorer som kan innvirke på lengden av tiden nødvendig for å modulere ekspresjon og/eller endre sensitivitet av PVCR omfatter, men er ikke begrenset til, størrelse på fisken, nivå av PVCR-ekspresjon eller sensitivitet, hvis noen, før tilsetning av PVCR-modulator til ferskvannet, fiskens evne til å skille ut PVCR-modulator og ioner, fiskens overflate til volum forhold,
20 etc. Derfor kan lengden av tid fisken blir holdt være i området fra ca. 7 dager til mange måneder (f.eks. 7, 14, 21, 30, 45, 90 og 120 dager) og fortrinnsvis mellom ca. 2 uker og ca. 6 uker.

Oppfinnelsen omfatter videre tilsetning av fôr til ferskvann. Hyppighet og mengder av fôr som fisken blir matet, er kjent på området. Generelt blir fisken
25 matet 1-3 ganger pr. dag, totalt ca. 0,25-5,0% kroppsvekt/dag. Fôret har nok NaCl til å bidra til et betydelig øket nivå av PVCR-modulator i serumet til den pre-voksne anadrome fisk. Mer spesifikt har NaCl minst to effekter. Den første forekommer når tilstrekkelige mengder av NaCl er til stede i fôret. Tilstedeværelsen av NaCl i fôret forårsaker at den pre-voksne anadrome fisk
30 drikker mer vann fra omgivelsen rundt den. For det andre er NaCl en direkte negativ PVCR-modulator og virker til å redusere PVCR-sensitivitet. Til tross for NaCl's effekt ved å redusere sensitivitet, øker det overraskende PVCR-ekspresjon i visse vev når fisken blir matet med en NaCl-diett og den

omgivende ferskvannsomgivelse har minst én PVCR-modulator. Økningen i inntak av ferskvann som har PVCR-modulatorer forårsaker en total økning av serumnivåene av PVCR-modulatorer.

Det beskrives også et fiskefôr. I én utførelsesform har fôret et agens
5 som er tilstrekkelig til å bidra til et betydelig øket nivå av PVCR-modulatoren i serum til den anadrome fisk. Et slikt middel kan anvendes ved metodene ifølge foreliggende oppfinnelse beskrevet her. Ett eksempel på et agens som betydelig øker nivået av PVCR-modulator i serumet til fisk er NaCl. Følgelig, ved en annen utførelsesform, inneholder fôret mellom ca. 1%-10% av NaCl
10 etter vekt eller mellom ca. 10.000 mg NaCl/kg av fôr og ca. 100.000 mg NaCl/kg av fôr (f.eks. 12.000 mg/kg). Fôret omfatter også et tiltrekningsmiddel, som beskrevet her. Disse fôr kan refereres til her som "NaCl/tiltrekningsmiddel dietter." Odoranten er til stede i fôret i en mengde tilstrekkelig til å endre den olfaktoriske sansing til fisk (f.eks. spormengder til ca. 100 mg/kg). I tillegg til
15 NaCl og odorant, kan en PVCR-modulator og spesielt en PVCR-agonist så som en aminosyre, eventuelt tilsettes. I én utførelsesform har fôret mellom ca. 1% og ca. 10% NaCl etter vekt, en odorant så som L-alanin og en aminosyre så som tryptofan i en mengde mellom ca. 1 og ca. 10 g/kg. I tillegg til de unike komponenter som omfatter fôret, som beskrevet ovenfor, kan fôret i tillegg
20 omfatte bestanddeler som er tradisjonelt inkludert i fôr, f.eks. for ernæring og/eller smak. For eksempel kan fôret omfatte fiske-komponenter, så som flyndre- eller blekksprutkjøtt eller fiskeoljer. Slike fôr kan også være utformet for spesifikke livsstadier til fisken omfattende larve, ung og voksen fisk.

Fôret kan fremstilles på flere måter, så lenge den riktige konsentrasjon
25 av NaCl er til stede. Fôret kan for eksempel fremstilles ved reformulering av fôret eller ved å la fôret absorbere en løsning som inneholder NaCl og eventuelt, tilsetning av en odorant og/eller PVCR-modulator. Et overflatelag kan tilsettes for akseptbarhet.

En annen utførelsesform omfatter mating av anadrom fisk med fôr som
30 har mellom 1% og 10% NaCl etter vekt og en odorant når fisken blir holdt i en ferskvannomgivelse som har mellom ca. 2,0 og ca. 10,0 mM kalsium og mellom ca. 0,5 mM og ca. 10,0 mM magnesium.

I en annen utførelsesform blir fisken, mens i ferskvannet som har PVC-modulator, også eksponert for en fotoperiode. En fotoperiode angir eksponering av fisken for lys (f.eks. sollys, glødelys eller fluorescerende lys). Fortrinnsvis er fotoperioden hovedsakelig kontinuerlig eller forekommer lenge nok til å øke vekst, fremkalle smoltifisering og/eller redusere dødelighet. Fisken kan utsettes for en kontinuerlig fotoperiode mens de er i ferskvann og gjennomgå trinnene ifølge foreliggende oppfinnelse (f.eks. i PVC-modulator-omgivelsen og matet NaCl/tiltrekningsmiddel-diett), så vel som etter å være eksponert for denne omgivelse og deretter overført til sjøvann. Fotoperioden kan være i minst ca. 12 timer innen et 24 timers intervall eller i lenger perioder så som ca. 14, 16, 18, 20, 22 eller fortrinnsvis ca. 24 timer. Antallet dager fisken er eksponert for en fotoperiode kan være i området fra ca. 1 dag til mange måneder (f.eks. 1, 3, 7, 14, 21, 30, 45, 90 og 120 dager). Fortrinnsvis er fotoperioden mens fisken blir holdt i PVC-modulatoromgivelse og blir matet NaCl/tiltrekningsmiddel-diett, mellom ca. 4 dager og ca. 50 dager. Etter overføring til sjøvann, er fotoperiode-eksponering fortrinnsvis mellom ca. 7 dager og ca. 45 dager. Metoder for eksponering av fisk for en fotoperiode er kjent på området og er beskrevet for eksempel i Willoughby, S., Manual of Salmonid Farming, Blackwell Scientific, Oxford, UK, 106 og 152-154 (1999).

Fisken kan også eksponeres for en fotoperiode etter overføring til sjøvann. Fordelene ved eksponering for en fotoperiode omfatter en dramatisk reduksjon i dødeligheten av fisk etter overføring til sjøvann. I én utførelsesform øker således å holde fisk i en kontinuerlig fotoperiode, deres overlevelse under deres tilpasning til sjøvann.

Betegnelsen "sjøvann," betyr vann som kommer fra sjøen eller vann som blir formulert til å simulere den kjemiske og mineralske sammensetning av vann fra sjøen. Den vesentlige elementsammensetning av det fremstilte sjøvann faller fortrinnsvis hovedsakelig innen området til den vesentlige elementsammensetning av naturlig sjøvann (f.eks. som har den følgende ioniske sammensetning: mer enn 30 mM magnesium, mer enn ca. 6 mM kalsium og mer enn ca. 300 mM NaCl). Metoder for fremstilling av kunstig sjøvann er kjent på området og er beskrevet i for eksempel U.S. pat. nr. 5,351,651.

Ved utføring av metodene ifølge foreliggende oppfinnelse på pre-voksen anadrom fisk, viser fisken betydelig øket vekst (f.eks. SGR), tarmmotilitet og/eller matkonsum, sammenlignet med pre-voksen anadrom fisk som ikke er underkastet foreliggende oppfinnelse. Foreliggende oppfinnelse medfører
5 forbedringer i vekst, tarmmotilitet og/eller matkonsum før, under og etter sjøvannoverføring. Etter overføring til sjøvann opplever fisk som ikke blir underkastet trinnene ifølge foreliggende oppfinnelse, generelt osmotisk stress, redusert eller intet matkonsum og til og med død. Osmotisk stress er resultat av forskjeller i det osmotiske trykket mellom omgivelsen og kroppskammere i
10 fisken. Dette forstyrrer den homeostatiske likevekt til fisken og resulterer i redusert vekst, reproduktiv svikt og redusert resistens mot sykdom. Som et resultat av osmotisk stress vokser fisken også langsommere og bruker lenger tid til å nå markedsstørrelse. I tillegg medfører foreliggende oppfinnelse økninger i vekst av fisk med en rekke størrelser. Vekstøkning er forventet å
15 sees i mindre fisk (f.eks. ca. 15 g), medium fisk (f.eks. 40 g) så vel som større fisk (f.eks. 90-120 g). Følgelig angår foreliggende oppfinnelse metoder for å øke vekst av pre-voksen anadrom fisk som har vekter i området fra ca. 15 g til ca. 120 g. Ekspresjon og/eller sensitivitet av PVCR kan moduleres, for eksempel i det olfaktoriske apparatet til fisken og kan moduleres i andre typer
20 av vev så som i klorid celler i gjellevev, epitelceller i gastrointestinal-kanal (f.eks. mage, pyloric caeca, proksimal eller distal tarm), tubuli i nyre, skinn eller urinblære.

Eliminering av ikke-spisende eller dårlig spisende osmotisk stressede fisk i en gruppe forbedrer de totale fôromdannelse-forhold for hele gruppen.
25 Optimal fôring og vekst etter sjøvannoverføring for alle medlemmer av gruppen behandlede fisk vil gi bedre fôrutnyttelse og forbedre det totale utbyttet av produksjon når fisken når markedsstørrelse.

Foreliggende oppfinnelse omfatter metoder for å øke effektiv utnyttelse av mat og øke veksten av anadrom fisk ved optimalisering av funksjonen eller
30 økning av veksten av gastrointestinal-kanalen til fisk ved eksponering av fisk for en PVCR-agonist omfattende en enkel eller en blanding av L-aminosyrer som er inkludert enten i maten eller ferskvannet under smoltifiseringsprosessen. Disse metoder kan gjennomføres ved tilsetning av minst én PVCR-modulator til

maten som blir satt til ferskvann, inntatt av fisken og derved eksponering av PVCR til stede i celler som kler lumen av forskjellige gastrointestinal-kanal-segmenter av larve eller unge fisk for endringer av modulatorene. Modulering av gastrointestinalkanal PVCR i fisk optimaliserer deres utnyttelse av inntatt mat via PVCR-mediert sansing av spesifikke aminosyrer og signalering av cellene som kler gastrointestinal-kanalen og transporterer både ioner og næringsstoffer gjennom dette epitel.

Celler som kler fiskens G.I.-kanal inneholder rikelig PVCR-protein som er eksponert for både det lumenale innhold i maven, pyloric caeca og tarm så vel som mikroomgivelsen lokalisert umiddelbart ved siden av de basolaterale membraner til disse celler. Foreliggende oppfinnelse angår det funn at PVCR-proteiner har evnen til å sanse både ioniske og aminosyrekonsentrasjoner og signaliserer celler som inneholder PVCR til å respondere hensiktsmessig. Ved sansing av den lokale konsentrasjon av aminosyrer, kan PVCR-inneholdende celler konstant skjelne tilstedeværelse av næringsstoffer (proteiner) som blir fordøyet av intestinale proteaser til aminosyrer som blir absorbert av disse epitelceller. Således utfører PVCR-protein i intestinal epitelcelle en funksjon lignende den beskrevet for olfaktoriske epitelceller ovenfor men signalet generert av PVCR blir ikke overført av nervesignaler. Isteden produserer aktivering av PVCR i GI-kanalen aktivering av transportprosesser, endrer GI-motilitet så vel som produserer proliferasjon og vekst av intestinale epitelceller. Disse 2 funksjoner til PVCR-proteiner tilveiebringer sansing av GI-kanalen nødvendig for effektiv vekst og utvikling av fisk. Metoder ifølge foreliggende oppfinnelse tillater remodellering og utvikling av GI-kanalen for optimal funksjon i sjøvann mens fisken er i ferskvann.

Følgelig beskrives metoder for å forbedre FCR for anadrom fisk som blir overført til sjøvann som er innprentet med en odorant. Fôr-omdannelsesforhold eller FCR blir oppnådd ved dividering av kroppsvekt-økningen av en gruppe fisk med mengden av mat matet til denne gruppe av fisk. Jo mer effektiv omdannelsen av mat til kroppsvekt-vekst av fisken, jo mindre FCR (liten mengde av mat/stor vektøkning av fisk). Et meget lite FCR-tall (mindre enn 1) omfatter en meget effektiv omdannelse av mat til kroppsvekt-vekst og det er dette industrien streber etter. I motsetning betyr stor FCR en ineffektiv

omdannelse av mat til kroppsvekt-vekst og er generelt uønsket. Stor eller dårlig FCR er uønsket fordi fôr vanligvis er dyrt og mer må anvendes for at fisken skal vokse til en gitt vekt. FCR-verdier for fisk underkastet metodene ifølge foreliggende oppfinnelse er forventet å være generelt mindre og mer

5 ønskelige enn de fleste industri-publiserte verdier fordi foreliggende oppfinnelse eliminerer tilstedeværelse av osmotisk skadet fisk som har tendens til å øke totalt FCR siden de spiser mat, men ikke vokser. Som en konsekvens, ved å underkaste fisken metodene ifølge foreliggende oppfinnelse, reduseres FCR, i én utførelsesform, for derved å tillate optimal fôring og vekst av nesten all

10 fisken. FCR for fisk underkastet foreliggende oppfinnelse er tilstrekkelig til å opprettholde vekst og fôring av majoriteten av fisk eller fortrinnsvis øke vekst og fôrkonsum for majoriteten av fisken. Når fisk blir underkastet metodene ifølge foreliggende oppfinnelse, oppviser de områder av FCR, for eksempel ville de omfatte verdier mellom ca. 0,7 og ca. 7,0. Spesielt er matkonsum eller

15 matinntak forbedret fordi fisken "lukter" eller "sanser" maten med PVCR og odorant-reseptorer i celler i de olfaktoriske lameller eller olfaktorisk bulbus.

Tilsvarende tillater foreliggende oppfinnelse å nedsette eller redusere tiden mellom generasjoner av pre-voksne anadrome fisk. Disse fisker begynner gyting tidligere fordi foreliggende oppfinnelse øker deres vekst, som

20 beskrevet her. Siden 2-3 år er nødvendig for å oppnå seksuelt moden fisk, krever forsøk på selektiv oppavl av egenskaper 2-3 års intervall før et gitt trekk kan velges og fisken oppviser den oppavlede egenskapen. Forbedringer i vekst og tid til å nå modenhet gitt ved oppfinnelsen reduserer tidsintervallet nødvendig for å nå seksuell modenhet hos fisk med så meget som ca. 6

25 måneder til ca. 12 måneder. Reduksjon av intervallet før gyting tillater produksjon av mer fisk og forbedret seleksjon av fisk som har egenskaper forskjellig fra at de er bedre i stand til å tilpasse seg til sjøvann (f.eks. valg av fisk som har forbedret smak, øket filet-tykkelse, øket $\alpha 3$ omega fettsyreinnhold eller fisk som er lettere i stand til å modulere PVCR-ekspresjon).

30 Før foreliggende oppfinnelse ble anadrom fisk som ble overført fra ferskvann til sjøvann generelt overført ved en spesiell størrelse, referert til som "kritisk størrelse." Den kritiske størrelsen varierer fra arter til arter, men angir generelt en minimums-størrelse ved hvilken en fisk kan overføres til sjøvann.

Den kritiske størrelsen for laks, ørret og røye er henholdsvis mellom ca. 50 og ca. 100 g, mellom ca. 70 og ca. 120 g og større enn 100 g. Kritiske størrelser for Coho, King og Sockeye laks er henholdsvis mellom ca. 10 og ca. 15 g, mellom ca. 20 og 40 g og mellom ca. 1 og ca. 2 g. Chum og Pink laks har hver
 5 en kritisk størrelse på omtrent mindre enn 3 g.

Før oppfinnelsen ble en populasjon av pre-voksen anadrom fisk som har oppnådd en gjennomsnittlig kritisk størrelse overført til sjøvann. Noen av fiskene var fysiologisk klare for overføringen, mens andre ikke var det. Dette er én av grunnene til den økede dødelighetsgrad etter overføring til sjøvann.
 10 Metodene ifølge foreliggende oppfinnelse forbereder fysiologisk alle eller nesten alle fiskene på overføring til sjøvann ved å modulere PVCR-ekspresjon og/eller sensitivitet i det olfaktoriske apparatet og i annet vev og/eller ved å fremkalle smoltifisering. I én utførelsesform kan i det vesentlige alle fisk som veier mer enn ca. 15 gram overføres uten at noen dør. Således omfatter
 15 metodene ifølge foreliggende oppfinnelse metoder for forberedelse av pre-voksen anadrom fisk for overføring til sjøvann, så vel som som fremkalling av smoltifisering i pre-voksen anadrom fisk.

Siden metodene ifølge foreliggende oppfinnelse modulerer ekspresjon og/eller sensitivitet av PVCR i anadrom fisk og er innprentet med en odorant,
 20 overlever de bedre når overført til sjøvann fordi sjøvann-fôret har samme odorant som det fisken ble innprentet med og dette medfører at de spiser bedre. Det reduserte osmotiske stress resulterer i redusert dødelighet. Dette skjer fordi fisken behandlet ved metoden ikke opplever noe osmotisk sjokk når overført til sjøvann som har en ionisk sammensetning meget forskjellig fra
 25 ferskvann. Således medfører foreliggende oppfinnelse metoder for reduksjon av dødelighetsgraden etter at pre-voksen anadrom fisk blir overført til sjøvann.

Ikke bare er foreliggende oppfinnelse anvendelig for reduksjon av dødelighetsgraden etter overføring til sjøvann, foreliggende oppfinnelse er også anvendelig for å øke overlevelseshetsgrad i ferskvann før overføring. Før
 30 oppdagelsen ifølge foreliggende oppfinnelse, eksisterte et "smolt-vindu" hvor oppdrettsanlegget overførte den pre-voksne anadrome fisk til sjøvann eller ellers døde fisken hvis den fortsatt forble i ferskvann etter å ha gjennomgått smoltifisering. PVCR-modulator omgivelsen og NaCl/tiltrekningsmiddel-diett

ifølge foreliggende oppfinnelse gjør at fisken fortsetter å trives i det uendelige. Fisken fortsetter å oppta fôr og vokse. Følgelig øker metodene ifølge foreliggende oppfinnelse betydelig tidsperioden eller vinduet hvor fisken kan overføres til sjøvann eller eliminerer den helt. I tillegg, etter at disse fisk er

5 overført til sjøvann opptar de mer fôr og vokser bedre, sammenlignet med fisk som ikke gjennomgår trinnene ifølge foreliggende oppfinnelse.

Foreliggende oppfinnelse omfatter også metoder for overføring til sjøvann av pre-voksen anadrom fisk som har mindre vekt, sammenlignet med den kritiske størrelse for de spesielle arter av fisk kjent innen industrien.

10 Metodene ifølge foreliggende oppfinnelse, som beskrevet her, modulerer PVC-ekspresjon i fisk som er mindre enn de normalt overført til sjøvann eller de som gjennomgår eller er i ferd med å gjennomgå smoltifisering. Disse metoder omfatter overføring av parr, stadiet til en ung fisk før den blir smolt, til sjøvann. Parr er et livsstadium av pre-voksen anadrom fisk som forekommer

15 etter modning av aleviner eller plommesekk-ungel. Parr eller fingerling oppviser karakteristiske ovide striper eller parr-merker langs deres flanker og gjennomgår normalt vekst og utvikling i ferskvann før smoltifisering. Betegnelsen "parr" er en betegnelse som er kjent på området. Ettersom plommesekk-ungel fortsetter å spise, vokser de til større parr. Parr kan ha et

20 bredt område av kroppsvekt avhengig av betingelsene under hvilke de blir dyrket. Vekten til parr varierer fra arter til arter. Kroppsvekt for parr varierer betydelig innen et område fra ca. 0,5 g til ca. 70 g. Gjennomføring av foreliggende oppfinnelse i ett forsøk, som beskrevet her, resulterer i overføring av atlantehavslaks parr som veier så lite som mellom ca. 13% og ca. 18,5% av

25 den kritiske størrelsesvekt (mellom ca. 70 og ca. 100 g) eller ca. 13 g. Følgelig omfatter foreliggende oppfinnelse en metode for forberedelse av anadrom fisk for overføring til sjøvann hvor fisken veier mellom ca. 15 gram og ca. 120 gram på tidspunktet for overføring til sjøvann.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer i tillegg metoder for overføring av

30 pre-voksen anadrom fisk til sjøvann som har varmere temperatur (f.eks. 14°C og 19°C), sammenlignet med vann-temperaturer (6°-14°C) til hvilke disse fiskene tidligere er blitt overført. Siden fisken opplever redusert eller lite osmotisk stress når den overføres til sjøvann ved anvendelse av metodene

ifølge foreliggende oppfinnelse, kan fisken tåle overføring til høyere vann-temperaturer uten å få en økning i dødelighetsgrad.

Metodene ifølge foreliggende oppfinnelse reduserer også forekomst av sykdom blant smolt og den voksende laks. Fordi smolt behandlet ved

5 metodene ifølge foreliggende oppfinnelse opplever mindre stress ved overføring til sjøvann, er deres immunfunksjoner sterkere og de er mindre mottagelige for parasittiske, virale, bakterielle og fungale sykdommer. Fisk som ikke er behandlet ved metodene beskrevet her er mer mottagelige for slike sykdommer og kan være reservoarer for sykdom, som kan infisere frisk fisk.

10

Metoder for bedømmelse av PVCR og odorant

Det beskrives metoder for detektering av nivået av PVCR for å bestemme hvorvidt fisken er klar for overføring fra ferskvann til sjøvann etter at de er innprentet med en odorant. Metoder som måler PVCR-nivåer omfatter

15 mange egnede forsøk. Egnede forsøk omfatter immunologiske metoder, så som FACS-analyse, radioimmunoassay, strømningscytometri, immunocytokjemi, enzym-bundet immunosorbent-forsøk (ELISA) og kjemiluminescens-forsøk. Hvilken som helst metode kjent nå eller utviklet senere kan anvendes for å måle PVCR-ekspresjon.

20

Antistoffer reaktive med PVCR eller deler derav kan anvendes. I en foretrukket utførelsesform binder antistoffene spesifikt til PVCR eller en del derav. Antistoffene kan være polyklonale eller monoklonale og betegnelsen antistoff skal omfatte polyklonale og monoklonale antistoffer og funksjonelle fragmenter derav. Betegnelsene polyklonale og monoklonale refererer til

25 graden av homogenitet av et antistoff-preparat og er ikke ment å være begrenset til spesielle produksjonsmetoder.

I mange av de foretrukne utførelsesformer detekterer immunologiske teknikker PVCR-nivåer ved hjelp av anti-PVCR antistoff (dvs. ett eller flere antistoffer). Betegnelsen "anti-PVCR" antistoff omfatter monoklonale og/eller

30 polyklonale antistoffer og blandinger derav.

Anti-PVCR antistoffer kan fremkalles mot passende immunogener, så som isolert og/eller rekombinant PVCR eller del derav (omfattende syntetiske molekyler, så som syntetiske peptider). I én utførelsesform blir antistoffer

fremkalt mot isolert og/eller rekombinant PVCR eller del derav (f.eks. et peptid) eller mot en vertscelle som uttrykker rekombinant PVCR. I tillegg kan celler som uttrykker rekombinant PVCR, så som transfekterte celler, anvendes som immunogener eller ved en screening for antistoff som binder reseptor.

5 Hvilken som helst egnet teknikk kan fremstille det immuniserende antigen og produsere polyklonale eller monoklonale antistoffer. Kjent teknikk omfatter en rekke av disse metoder (se f.eks. Kohler et al., Nature, 256: 495-497 (1975) og Eur. J. Immunol. 6: 511-519 (1976); Milstein et al., Nature 266: 550-552 (1977); Koprowski et al., U.S. patent nr. 4,172,124; Harlow, E. og
10 D. Lane, 1988, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY); Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2 (Supplement 27, Sommer '94), Ausubel, F.M. et al., Ed., (John Wiley & Sons: New York, NY), kap. 11, (1991)). Generelt kan fusjon av en egnet udødelig eller myelom celledinje, så som SP2/0, med antistoffproduserende
15 celler produsere et hybridom. Dyr immunisert med antigenet av interesse gir antistoffproduserende celle, fortrinnsvis celler fra milt eller lymfeknuter. Selektive kulturbetingelser isolerer antistoffproduserende hybridomceller mens begrensede fortykningsteknikker produserer dem. Forskere kan anvende egnede forsøk så som ELISA for å velge antistoffproduserende celler med den
20 ønskede spesifisitet.

Andre egnede metoder kan produsere eller isolere antistoffer med den ønskede spesifisitet. Eksempler på andre metoder omfatter seleksjon av rekombinant antistoff fra et bibliotek eller basert på immunisering av transgene dyr så som mus.

25 I henhold til metoden kan et forsøk bestemme nivået av PVCR i en biologisk prøve. For å bestemme mengdene av PVCR, omfatter et forsøk kombinasjon av prøven som skal testes med et antistoff som har spesifisitet for PVCR, under betingelser egnet for dannelse av et kompleks mellom antistoff og PVCR og detektering eller måling (direkte eller indirekte) dannelsen av et
30 kompleks. Prøven kan oppnås direkte eller indirekte og kan fremstilles ved en metode egnet for den spesielle prøve og forsøksformat valgt.

Spesielt kan vevsprøver, f.eks. fra nasale lameller, olfaktorisk apparat eller gjeller, tas fra fisk etter at den er bedøvet med MS-222. Vevsprøvene blir

fiksert ved neddypping i 2% paraformaldehyd i passende Ringers løsning svarende til osmolaliteten til fisken, vasket i Ringers, deretter frosset i en innstøpende forbindelse, f.eks. O.C.T.TM (Miles, Inc., Elkhart, Indiana, USA) ved anvendelse av metylbutan avkjølt med flytende nitrogen. Etter kutting av

5 8-10 μ vevsnitt med en kryostat, blir individuelle snitt underkastet forskjellige merkingsprotokoller. For eksempel blir snittene: 1) blokkert med geiteserum eller serum oppnådd fra samme art av fisk, 2) inkubert med kanin anti-CaR eller anti-PVCR antiserum og 3) vasket og inkubert med peroksydase-konjugert affinitets-renset geit antikanin antiserum. Lokasjonene av bundet peroksydase-

10 konjugert geit-antikanin antiserum blir deretter visualisert ved utvikling av et rose-farget aminoetylkarbazol reaksjonsprodukt. Individuelle snitt blir montert, inpsisert og fotografert ved standard lysmikroskopi-teknikker. Anti-CaR antiserum anvendt for å detektere fisk PVCR-protein blir fremkalt i kaniner ved anvendelse av et 23-mer peptid svarende til aminosyrer nummer 214-236

15 lokalisert i det ekstracellulære domenet av RaKCaR protein. Sekvensen av 23-mer peptidet er: ADDDYGRPGIEKFREEAEERDIC (SEKV ID NR.: 9) et lite peptid med sekvensen DDYGRPGIEKFREEAEERDICI (SEKV ID NR.: 10) eller ARSRNSADGRSGDDLPC (SEKV ID NR.: 11) kan også anvendes for å fremstille antisera inneholdende antistoffer til PVCR. Slike antistoffer kan være

20 monoklonale, polyklonale eller kimære.

Egnede merker kan detekteres direkte, så som radioaktive, fluorescerende eller kjemiluminescente merker. De kan også detekteres indirekte ved anvendelse av merker så som enzym-merker og andre antigene eller spesifikke bindingspartnere så som biotin. Eksempler på slike merker

25 omfatter fluorescerende merker så som fluorescein, rhodamin, kjemiluminescente merker så som luciferase, radioisotop-merker så som ³²P, ¹²⁵I, ¹³¹I, enzym-merker så som pepperrot-peroksydase og alkalisk fosfatase, β -galaktosidase, biotin, avidin, spinn-merker og lignende. Deteksjon av antistoffer i et kompleks kan også utføres immunologisk med et annet antistoff

30 som deretter blir detektert (f.eks. ved hjelp av et merke). Konvensjonelle metoder eller andre egnede metoder kan direkte eller indirekte merke et antistoff.

Ved utføring av metoden blir nivåene av PVCR i forskjellige vev-forandringer sammenlignet med kontroll. Modulerte nivåer eller tilstedeværelse av PVCR-ekspresjon i forskjellige vev, sammenlignet med en kontroll, indikerer at fisken eller populasjonen av fisk fra hvilken en statistisk signifikant mengde
 5 av fisk var testet, er klar for overføring til ferskvann. En kontroll angir et nivå av PVCR, hvis noe, i en fisk som ikke er underkastet trinnene ifølge foreliggende oppfinnelse.

PVCR kan også undersøkes ved Northern blot analyse av mRNA fra vevsprøver. Northern blot analyse fra forskjellige haivev har vist at den høyeste
 10 grad av PVCR-ekspresjon er i gjellevev, fulgt av nyre og den rektale kjertel. Det synes å være minst tre distinkte mRNA-arter på ca. 7 kb, 4,2 kb og 2,6 kb.

PVCR kan også undersøkes ved hybridisering, f.eks. ved hybridisering av én av PVCR-sekvensene gitt her eller et oligonukleotid avledet fra én av sekvensene, til en DNA-inneholdende vevsprøve fra en fisk. En slik
 15 hybridiseringssekvens kan ha et detekterbart merke, f.eks. radioaktivt, fluorescerende, etc., bundet for å tillate deteksjon av hybridiseringsprodukt. Metoder for hybridisering er velkjente og slike metoder er gitt i US pat. nr. 5 837 490, til Jacobs et al. Utforming av oligonukleotidproben bør fortrinnsvis følge disse parametrene: (a) den bør være utformet til et område av sekvensen
 20 som har færrest ubestemte baser ("N'er"), hvis noen og (b) den bør være utformet til å ha T_m på ca. 80°C (antatt 2°C for hver A eller T og 4 grader for hver G eller C).

Stringens-betingelser for hybridisering angir betingelsene for temperatur og bufferpreparat som tillater hybridisering av en første nukleinsyresekvens til
 25 en andre nukleinsyresekvens, hvor betingelsene bestemmer graden av identitet mellom de sekvenser som hybridiserer til hverandre. Derfor er "høye stringens-betingelser" de betingelser hvorved bare nukleinsyresekvenser som er meget lignende hverandre vil hybridisere. Sekvensene kan være mindre lignende hverandre hvis de hybridiserer under moderate stringens-betingelser. Enda
 30 mindre similaritet er nødvendig for to sekvenser til å hybridisere under lave stringens-betingelser. Ved å variere hybridiseringsbetingelsene fra et stringens-nivå ved hvilket ingen hybridisering forekommer, til et nivå ved hvilket hybridisering først blir observert, kan betingelsene bestemmes ved hvilke en gitt

sekvens vil hybridisere til de sekvenser som er mest lignende den. Den nøyaktige betingelsesbestemmelse av stringensen av en spesiell hybridisering omfatter ikke bare ionestyrken, temperaturen og konsentrasjonen av destabiliserende midler så som formamid, men også faktorer så som lengden

5 av nukleinsyresekvensene, deres basesammensetning, prosenten av umake basepar mellom de to sekvenser og hyppigheten av forekomst av subsett av sekvensene (f.eks. små strekk av repetisjoner) innen andre ikke-identiske sekvenser. Vasking er trinnet hvor betingelsene blir satt for å bestemme et minimumsnivå av similaritet mellom sekvensene som hybridiserer med

10 hverandre. Generelt, fra den laveste temperatur ved hvilken bare homolog hybridisering skjer, resulterer 1% par som ikke passer sammen mellom to sekvenser i en 1°C reduksjon i smeltetemperatur (T_m) for hvilken som helst valgt SSC-konsentrasjon. Generelt resulterer en dobling av konsentrasjonen av SSC i en økning av T_m på ca. 17°C. Ved anvendelse av disse retningslinjer

15 kan vaske-temperaturen bestemmes empirisk, avhengig av nivået av par som ikke passer sammen, som er ønsket. Hybridiserings- og vaskebetingelser er forklart i *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, F.M. et al., ed., John Wiley & Sons, Inc., 1995, med supplerende oppdateringer) på sider 2.10.1 til 2.10.16 og 6.3.1 til 6.3.6.

20 Høye stringens-betingelser kan anvende hybridisering ved enten (1) 1x SSC (10x SSC = 3 M NaCl, 0,3 M $\text{Na}_3\text{-citrat}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (88 g/liter), pH til 7,0 med 1 M HCl), 1% SDS (natrium-dodecylsulfat), 0,1 - 2 mg/ml denaturert kalvetymus DNA ved 65°C, (2) 1x SSC, 50% formamid, 1% SDS, 0,1 - 2 mg/ml denaturert kalvetymus DNA ved 42°C, (3) 1% bovint serumalbumin (fraksjon V), 1 mM

25 $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, 0,5 M NaHPO_4 (pH 7,2) (1 M NaHPO_4 = 134 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4 ml 85% H_3PO_4 pr. liter), 7% SDS, 0,1 - 2 mg/ml denaturert kalvetymus DNA ved 65°C, (4) 50% formamid, 5x SSC, 0,02 M Tris-HCl (pH 7,6), 1x Denhardt's løsning (100x = 10 g Ficoll 400, 10 g polyvinylpyrrolidon, 10 g bovint serumalbumin (fraksjon V), vann til 500 ml), 10% dekstransulfat, 1% SDS, 0,1 -

30 2 mg/ml denaturert kalvetymus DNA ved 42°C, (5) 5x SSC, 5x Denhardt's løsning, 1% SDS, 100 µg/ml denaturert kalvetymus DNA ved 65°C eller (6) 5x SSC, 5x Denhardt's løsning, 50% formamid, 1% SDS, 100 µg/ml denaturert

kalvetymus DNA ved 42°C, med høy stringens vaskinger med enten (1) 0,3 - 0,1x SSC, 0,1% SDS ved 65°C eller (2) 1 mM Na₂EDTA, 40 mM NaHPO₄ (pH 7,2), 1% SDS ved 65°C. Betingelsene ovenfor skal anvendes for DNA-DNA hybrider på 50 basepar eller lenger. Når hybridene er antatt å være mindre enn 18 basepar i lengde, bør hybridiserings- og vaske-temperaturer være 5 - 10°C under den til den beregnede T_m av hybridene, hvor T_m i °C = (2 x antallet A- og T- baser) + (4 x antallet G- og C-baser). For hybrider antatt å være ca. 18 til ca. 49 basepar i lengde er T_m i °C = (81,5°C + 16,6(log₁₀M) + 0,41(% G + C) - 0,61 (% formamid) - 500/L), hvor "M" er molariteten av monovalente kationer (f.eks. Na⁺) og "L" er lengden av hybridene i basepar.

Moderate stringens-betingelser kan anvende hybridisering ved enten (1) 4x SSC, (10x SSC = 3 M NaCl, 0,3 M Na₃-citrat·2H₂O (88 g/liter), pH til 7,0 med 1 M HCl), 1% SDS (natrium-dodecylsulfat), 0,1 - 2 mg/ml denaturert kalvetymus DNA ved 65°C, (2) 4x SSC, 50% formamid, 1% SDS, 0,1 - 2 mg/ml denaturert kalvetymus DNA ved 42°C, (3) 1% bovint serumalbumin (fraksjon V), 1 mM Na₂-EDTA, 0,5 M NaHPO₄ (pH 7,2) (1 M NaHPO₄ = 134 g Na₂HPO₄·7H₂O, 4 ml 85% H₃PO₄ pr. liter), 7% SDS, 0,1 - 2 mg/ml denaturert kalvetymus DNA ved 65°C, (4) 50% formamid, 5x SSC, 0,02 M Tris-HCl (pH 7,6), 1x Denhardt's løsning (100x = 10 g Ficoll 400, 10 g polyvinylpyrrolidon, 10 g bovint serumalbumin (fraksjon V), vann til 500 ml), 10% dekstransulfat, 1% SDS, 0,1 - 2 mg/ml denaturert kalvetymus DNA ved 42°C, (5) 5x SSC, 5x Denhardt's løsning, 1% SDS, 100 µg/ml denaturert kalvetymus DNA ved 65°C eller (6) 5x SSC, 5x Denhardt's løsning, 50% formamid, 1% SDS, 100 µg/ml denaturert kalvetymus DNA ved 42°C, med moderat stringens vaskinger med 1x SSC, 0,1% SDS ved 65°C. Betingelsene ovenfor skal anvendes for DNA-DNA hybrider med 50 basepar eller lenger. Når hybridene er antatt å være mindre enn 18 basepar i lengde bør hybridiserings- og vaske-temperaturer være 5 - 10°C under den til den beregnede T_m for hybridene, hvor T_m i °C = (2 x antallet A- og T-baser) + (4 x antallet G- og C-baser). For hybrider antatt å være ca. 18 til ca. 49 basepar i lengde er T_m i °C = (81,5°C + 16,6(log₁₀M) + 0,41(% G + C) - 0,61 (% formamid) - 500/L), hvor "M" er molariteten av monovalente kationer (f.eks. Na⁺) og "L" er lengden av hybridene i basepar.

Lave stringens-betingelser kan anvende hybridisering ved enten (1) 4x SSC, (10x SSC = 3 M NaCl, 0,3 M Na₃-citrat·2H₂O (88 g/liter), pH til 7,0 med 1 M HCl), 1% SDS (natrium-dodecylsulfat), 0,1 - 2 mg/ml denaturert kalvetymus DNA ved 50°C, (2) 6x SSC, 50% formamid, 1% SDS, 0,1 - 2 mg/ml denaturert kalvetymus DNA ved 40°C, (3) 1% bovint serumalbumin (fraksjon V), 1 mM Na₂-EDTA, 0,5 M NaHPO₄ (pH 7,2) (1 M NaHPO₄ = 134 g Na₂HPO₄·7H₂O, 4 ml 85% H₃PO₄ pr. liter), 7% SDS, 0,1 - 2 mg/ml denaturert kalvetymus DNA ved 50°C, (4) 50% formamid, 5x SSC, 0,02 M Tris-HCl (pH 7,6), 1x Denhardt's løsning (100x = 10 g Ficoll 400, 10 g polyvinylpyrrolidon, 10 g bovint serumalbumin (fraksjon V), vann til 500 ml), 10% dekstransulfat, 1% SDS, 0,1 - 2 mg/ml denaturert kalvetymus DNA ved 40°C, (5) 5x SSC, 5x Denhardt's løsning, 1% SDS, 100 µg/ml denaturert kalvetymus DNA ved 50°C eller (6) 5x SSC, 5x Denhardt's løsning, 50% formamid, 1% SDS, 100 µg/ml denaturert kalvetymus DNA ved 40°C, med lav stringens vaskinger med enten 2x SSC, 0,1% SDS ved 50°C eller (2) 0,5% bovint serumalbumin (fraksjon V), 1 mM Na₂EDTA, 40 mM NaHPO₄ (pH 7,2), 5% SDS. Betingelsene ovenfor skal anvendes for DNA-DNA hybrider med 50 basepar eller lenger. Når hybridene er antatt å være mindre enn 18 basepar i lengde, bør hybridiserings- og vasketemperaturer være 5 - 10°C under den til den beregnede T_m for hybridene, hvor

$$T_m \text{ i } ^\circ\text{C} = (2 \times \text{antallet A- og T-baser}) + (4 \times \text{antallet G- og C-baser}).$$

For hybrider antatt å være ca. 18 til ca. 49 basepar i lengde er $T_m \text{ i } ^\circ\text{C} = (81,5^\circ\text{C} + 16,6(\log_{10}M) + 0,41(\% \text{ G} + \text{C}) - 0,61 (\% \text{ formamid}) - 500/L)$, hvor "M" er molariteten av monovalente kationer (f.eks. Na⁺) og "L" er lengden av hybridene i basepar.

Foreliggende oppfinnelse omfatter deteksjon av PVCR ved PCR-metoder ved anvendelse av primere beskrevet eller avledet fra sekvenser beskrevet her. For eksempel kan PVCR detekteres ved PCR ved anvendelse av de følgende primere: 5'-TGT CKT GGA CGG AGC CCT TYG GRA TCG C-3' (SEKV ID NR:12) og 5'-GGC KGG RAT GAA RGA KAT CCA RAC RAT GAA G-3' (SEKV ID NR:13), hvor K er T eller G, Y er C eller T og R er A eller G. PCR er den selektive amplifisering av en målsekvens ved gjentatte runder av nukleinsyre-replikasjon ved anvendelse av sekvens-spesifikke primere og en

termostabil polymerase. PCR tillater gjenvinning av hele sekvenser mellom to ender av en kjent sekvens. PCR-metoder er beskrevet her og er kjent på området.

Spesielt kan nivået av akvatisk PVCR bestemmes i forskjellige vev ved
 5 revers transkriptase-polymerasekjedereaksjon (RT-PCR) etter isolering av poly A+ RNA fra akvatiske arter. Metoder for PCR og RT-PCR er godt karakterisert på området (Se generelt, PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification (ed. H.A. Erlich, Freeman Press, NY, NY, 1992); PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Ed. Innis, et al., Academic Press, San
 10 Diego, CA, 1990); Mattila et al., Nucleic Acids Res., 19:4967 (1991); Eckert et al., PCR Methods and Applications, 1:17 (1991); PCR (ed. McPherson et al., IRL Press, Oxford); Ausebel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience 1987, & Supp. 49, 2000; og U.S. patent 4,683,202). Kort angitt blir mRNA ekstrahert fra vevet av
 15 interesse og revers transkribert. Deretter blir en PCR-reaksjon utført med PVCR-spesifikke primere og tilstedeværelse av det antatte PVCR-produkt blir bestemt, for eksempel ved agarosegelelektroforese. Eksempler på PVCR-spesifikke primere er SEKV ID NR.: 12 og/eller SEKV ID NR.: 13. Produktet fra RT-PCR-reaksjon som blir utført med PVCR-spesifikke primere er
 20 referert til her som et RT-PCR-produkt. RT-PCR-produktet kan omfatte nukleinsyremolekyler som har en del eller hele PVCR-sekvensen. RT-PCR-produktet kan eventuelt være radioaktivt merket og tilstedeværelse eller mengde av PVCR-produkt kan bestemmes ved anvendelse av autoradiografi. To eksempler på kommersielt tilgjengelige fluorescerende prober som kan
 25 anvendes i et slikt forsøk er Molecular Beacons (Stratagene) og Taqman® (Applied Biosystems). Alternative metoder for merking og kvantifisering av RT-PCR-produktet er velkjente for en fagmann på området (se Ausebel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience 1987, & Supp. 49, 2000. Poly A+ RNA kan isoleres fra
 30 hvilket som helst vev som inneholder minst én PVCR ved standard metoder. Slikt vev omfatter for eksempel gjelle, nasale lameller, urinblære, nyre, tarm, mage, lever og hjerne.

Således beskrives sett for deteksjon av PVCR i det olfaktoriske apparatet eller kvantifisering av PVCR i det olfaktoriske apparatet som har antistoffer spesifikke for PVCR eller en del derav eller en nukleinsyresekvens som kan hybridisere til nukleinsyren av PVCR.

5 Endringer i ekspresjon eller sensitivitet av PVCR kan også utføres ved innføring av et egnet transgen. Egnede transgener ville omfatte enten PVCR-genet selv eller modifiserte gener som direkte eller indirekte ville innvirke på PVCR-genekspresjon som respons på en PVCR-modulator og/eller odorant. Metoder for vellykket innføring, seleksjon og ekspresjon av transgenet i fisk oocytter, embryoer og voksne er beskrevet i Chen, TT *et al.*, Transgenic Fish, 10 *Trends in Biotechnology* 8:209-215 (1990).

Det tilveiebringes metoder for å identifisere og/eller kvantifisere virkningene av PVCR-modulatorer på olfaktorisk reseptor sansing og vice versa. Foreliggende oppfinnelse omfatter også metoder for å bestemme 15 hvorvidt en forbindelse er en odorant. Når fisk blir eksponert for en odorant (f.eks. odoranten binder til olfaktoriske lameller), binder odoranten til det olfaktoriske epitel i fisken, hvilket fører til generering av en nerveimpuls. Det elektriske potensiale av impulsen kan måles ved anvendelse av metoder kjent på området eller de senere utviklet. Ett eksempel på en metode som kan 20 anvendes for å måle elektrisk potensiale er et elektroencefalogram, vanlig referert til som EEG. Eksempel 3 beskriver i detalj hvorledes måle nerveimpuls til fisk og spesielt når det gjelder modulering av PVCR i det olfaktoriske apparatet til fisken. Kort angitt blir fisken bedøvet og plassert i V-klemme apparat hvor dens gjeller blir irrigert kontinuerlig med luftet sjøvann og dens 25 nasale lameller badet kontinuerlig med en strøm av destillert vann via en slange holdt i stilling i den inhalerende olfaktoriske åpning. De olfaktoriske nerver til fisken ble eksponert ved fjerning av overliggende benstrukturer. Odoranter som skal testes kan leveres som boluser til det olfaktoriske epitel via en 3-veis ventil hvor 1 cm³ vann inneholdende stimulus raskt ble injisert i slangen 30 inneholdende en kontinuerlig strøm av destillert vann. Det elektriske potensialet blir oppnådd ved anvendelse av for eksempel høy-resistens wolfram-elektroder og kan registreres (Grass Amplifier apparat), digitaliseres og vises. Resultatene kan analyseres med datamaskin ved anvendelse av

kompatibel programvare. Tilstedeværelse av en elektrisk impuls indikerer at forbindelsen som testes er en odorant og fravær av en elektrisk impuls indikerer fravær av en odorant.

Vitenskapelige forsøk eksisterer som bestemmer hvorvidt en forbindelse
5 er en fiske-odorant. Eksempler på slike tester er unnviksadfærd-forsøk (f.eks. for å teste om en forbindelse er et frastøtningsmiddel) og tiltrekningsadfærd-forsøk (f.eks. for å teste om en forbindelse er et tiltrekningsmiddel). Metoder for å utføre slike adferdsforsøk er kjent på området og er beskrevet i for eksempel Royce-Malmgren *et al.*, *J. Chemical ecology*, 13(3) 533, 546 (1987).
10 Kort angitt blir fisk plassert i en labyrinth sammen med forbindelsen som testes. Fisken har valget å svømme mot forbindelsen som testes eller svømme vekk fra forbindelsen som testes. Hvis mer fisk svømmer mot forbindelsen et statistisk betydelig antall ganger, sammenlignet med en kontroll, da blir odoranten angitt å være et tiltrekningsmiddel. Tilsvarende, hvis mer fisk
15 svømmer vekk fra odoranten et statistisk signifikant antall ganger, sammenlignet med en kontroll, da blir odoranten angitt å være et frastøtningsmiddel. Forsøk som senere blir utviklet for å bestemme hvorvidt en forbindelse er et fisketiltrekningsmiddel eller fiskefrastøtningsmiddel kan også anvendes.

20

Metoder for hjemvending av fisk og bortstøting av fisk:

Etter at den er innprentet, omfatter oppfinnelsen også eksponering av fisken, etter overføring til sjøvann, for odoranten. I tillegg til innføring av odoranten ved å ha den i fôret, kan odoranten være plassert i sjøvannet eller
25 festet til et objekt som blir plassert i sjøvannet i nærheten av fisken. Følgelig angår foreliggende oppfinnelse metoder for hjemvending eller luring av fisk ved innprenting av fisken med et tiltrekningsmiddel, som beskrevet her og etter overføring av fisken til sjøvann, plassering av tiltrekningsmidlet anvendt under innprentingsprosessen på et objekt. "Hjemvending eller luring av fisk" omfatter
30 fisk som blir tiltrukket av en spesiell odorant. Eksempler på slike objekter er garn eller fiskeagn. Følgelig omfatter foreliggende oppfinnelse metoder for tiltrekning av fisk ved anvendelse av tiltrekningsmidler som er festet til garn eller fiskeagn, så vel som objekter som har tiltrekningsmidlet som ble anvendt under

innprentingsprosessen. Fiskere eller fiskeoppdrettsanlegg kan ha fordel av å tiltrekke fisk for formålet å fange dem eller avle dem. Spesielt kan slike tiltrekningsmidler anvendes for en rekke anvendelser, omfattende metoder for laksehjemvending som omfatter forbedring av effektiviteten av havbruk av
 5 forskjellige arter av anadrom fisk så som laks, nye arts-spesifikke agn for sportsfiske, så vel som metoder for å øke utbytter ved kommersielt krok- eller garnfiske eller redusere fangst av verdifull men uønskede arter (bifangst).

Innprenting av ferskvannsfisk med et tiltrekningsmiddel for anvendelse i ferskvann kan utføres ved eksponering av fisken for tiltrekningsmidlet i
 10 ferskvann. Det viktigste element ved denne oppgaven er identifikasjon av den passende odorant som er optimal for ferskvannsanvendelse. Som vist i eksemplene gitt blir det olfaktoriske nervesignal for visse odoranter redusert eller fjernet etter samtidig stimulering av en olfaktorisk PVCR. Således vil metoder ifølge foreliggende oppfinnelse anvendes for å identifisere ideelle
 15 ferskvanns-odoranter.

Det beskrives også metoder for bortstøting av fisk i sjøvann. Etter å være innprentet ved metodene beskrevet her får fisken øket sensitivitet for frastøtningsmidlet eller en kombinasjon av frastøtningsmidler anvendt under innprentingsprosessen. Følgelig blir fisken sensibilisert for frastøtningsmidlet
 20 anvendt under innprentingsprosessen og er mer sannsynlig å svømme vekk fra frastøtningsmidlet, sammenlignet med frastøtningsmidler som ikke var innprentet hos fisken. Fisken blir enkelt eksponert for frastøtningsmidlet ved hvilken som helst av en rekke metoder, omfattende å plassere frastøtningsmidlet anvendt i innprentingsprosessen i sjøvannet (f.eks. ved
 25 spraying, strømning eller på annen måte frigjøring av frastøtningsmidlet i sjøvannet) eller ved å plassere frastøtningsmidlet på et objekt. Ett eksempel på denne metoden er å påføre fiskefrastøtningsmidlet på et objekt nær eller på inntaket til en turbin, en omgivelse som ellers ville utgjøre en risiko for fisken. Uten frastøtningsmidlet svømmer fisk nær inntaket og blir skadet. Metodene
 30 for frastøting av fisken, som beskrevet her, lar fisk unngå slike farlige områder. Et annet eksempel er å belegge en garnbarriere i havmerder som inneholder normal anadrom fisk med et frastøtningsmiddel. Belegning av garnbarrieren

ville hindre rømning av de innesperrede fiskene siden de ville unngå garnet på grunn av dets frastøtningsmiddel-innhold eller omgivelse.

Et annet eksempel på frastøting av fisk ved anvendelse av metodene beskrevet her er for svømmere, surfere, dykkere, etc. for å frastøte farlig fisk så
5 som haier. Frastøtningsmidlet kan bestå av en PVCR-antagonist som ville antagonisere eller sløve den normale sansing av sjøvann av minst én PVCR i det olfaktoriske apparatet for derved å etterligne stimulus som fisk mottar når de møter ferskvann. Siden mange marine arter så som haier som er begrenset til sjøvann og unngår ferskvannsomgivelser, ville et objekt eller en person
10 belagt med eller omgitt av en PVCR-antagonist bli unngått av fisken ettersom han/hun ville oppfattes av fisken som omgitt av ferskvann.

Spesielt er tiltrekningsmidlene eller frastøtningsmidlene festet til disse objekter (f.eks. garn eller fiskeagn) de som omfatter en PVCR-modulator i en mengde tilstrekkelig til å modulere PVCR i det olfaktoriske sanseapparat til
15 fisken. Tiltrekningsmidlet eller frastøtningsmidlet kan være festet til objektet, belagt på overflaten, impregnert i objektet (f.eks. line eller garn) eller tilknyttet på hvilken som helst måte til objektet så lenge odoranten er til stede i tilstrekkelige mengder til å tillate tiltrekning eller frastøtning av fisken ved å endre PVCR i det olfaktoriske sanseapparat til fisken, som ytterligere beskrevet
20 her. Odoranten kan også frigjøres direkte i sjøvannet. Mengden av odoranten vil avhenge av en rekke faktorer, så som metoden for tilknytning av odoranten til objektet (f.eks. kan man trenge mer odorant hvis odoranten er impregnert i et garn eller line, sammenlignet med enkelt festet til utsiden av et objekt), distansen av fisken fra objektet (f.eks. vil man trenge mer odorant for å tiltrekke
25 eller frastøte fisk som er lenger unna), den ønskede effekt av odoranten på fisken (f.eks. vil en sterkere odorant-respons kreve mer odorant enn hvis man ønsket å fremkalle en svakere respons), karakteristika til fisken (f.eks. vekt, størrelse, type av anadrom fisk), og mengdene av PVCR-modulatorer som er til stede i sjøvannet (f.eks. vil visse PVCR-modulatorer redusere responsen på
30 odoranten, som ytterligere beskrevet her). I ett forsøk øker tilstedeværelse av visse aminosyrer, som kan være odoranter, enten alene eller i kombinasjon, sensitiviteten for kalsium hvilket tillater at PVCR "sanser" aminosyrer i nærvær av fysiologiske konsentrasjoner av kalsium.

Foreliggende oppfinnelse blir ytterligere og mer spesifikt illustrert ved de følgende Eksempler.

EKSEMPLIFISERING

5 De følgende eksempler refererer til Prosess I og Prosess II gjennom det hele. Prosess I er også referert til her som "SUPERSMOLT™ I Prosess." En "Prosess I" fisk eller smolt angir fisk eller smolt som har gjennomgått trinnene i Prosess I. En Prosess I smolt er også referert til som "SUPERSMOLT™ I" smolt. Likeledes er Prosess II også referert til her som "SUPERSMOLT™ II
10 Prosess." En "Prosess II" fisk eller smolt angir fisk eller smolt som har gjennomgått trinnene i Prosess II. En Prosess II smolt er også referert til som "SUPERSMOLT™ II" smolt.

Prosess I: Fisk omfattende, pre-voksen anadrom fisk (dette omfatter både kommersielt produsert S0, S1 eller S2 smolt så vel som mindre parr/smolt
15 fisk), blir eksponert for eller holdt i ferskvann inneholdende enten 2,0-10,0 mM kalsium- og 0,5-10,0 mM magnesium-ioner. Dette vannet blir produsert ved tilsetning av kalsiumkarbonat og/eller -klorid og magnesiumklorid til ferskvannet. Fisk blir matet med fôrpellet inneholdende 7% (vekt/vekt) NaCl. Se Eksempel 2 for ytterligere detaljer angående fôret. Fisk blir eksponert for
20 eller holdt i dette regimet av vannblanding og fôr totalt 30-45 dager, ved anvendelse av standard oppdretts-forvaringsteknikker. Vanntemperaturer varierer mellom 10-16°C. Fisk blir eksponert for en konstant fotoperiode hele varigheten av Prosess I. Et fluorescerende lys blir anvendt for fotoperioden.

Prosess II: Fisk, omfattende pre-voksen anadrom fisk (dette omfatter
25 både kommersielt produsert S0, S1 eller S2 smolt så vel som mindre parr/smolt fisk), blir eksponert for eller holdt i ferskvann inneholdende 2,0-10,0 mM kalsium- og 0,5-10,0 mM magnesium-ioner. Dette vannet blir produsert ved tilsetning av kalsiumkarbonat og/eller -klorid og magnesiumklorid til ferskvannet. Fisk blir matet med fôrpellet inneholdende 7% (vekt/vekt) NaCl og
30 enten 2 g eller 4 g av L-tryptofan pr. kg fôr. Se Eksempel 2 for ytterligere detaljer angående fôret. Fisk blir eksponert for eller holdt i dette regimet av vannblanding og fôr i totalt 30-45 dager ved anvendelse av standard oppdretts-

forvaringsteknikker. Vanntemperaturer varierer mellom 10-16°C. Fisk blir eksponert for en konstant fotoperiode hele varigheten av Prosess II. Et fluorescerende lys blir anvendt for fotoperioden.

- 5 Eksempel 1. Polyvalente kation-sansende reseptorer (PVCR) tjener som salinitet-sensorer i fisk.

Polyvalente kation-sansende reseptorer (PVCRs) tjener som salinitets-sensorer i fisk. Disse reseptorer er lokalisert i de apikale membraner i forskjellige celler i fiskens kropp (f.eks. i gjeller, tarm, nyre) som er kjent å være ansvarlige for osmoregulering. En full-lengde kation-reseptor (CaR også referert til som "PVCR") fra pigghå er uttrykt i humane HEK-celler. Denne reseptor ble vist å respondere på endringer i ione-sammensetninger av NaCl, Ca^{2+} og Mg^{2+} i ekstracellulær fluid som bader HEK-cellene. De ioniske konsentrasjoner respondert på av denne PVCR omfattet området som omfatter overgangen fra ferskvann til sjøvann. Ekspresjon av PVCR mRNA blir også øket i fisk etter deres overføring fra ferskvann til sjøvann og blir modulert av PVCR-agonister. Partielle genomiske kloner av PVCR har også vært isolert fra andre fiskearter, omfattende vinter- og sommer-flyndre så vel som rognkjeks, ved anvendelse av nukleinsyre-amplifisering med degenererte primere.

20 Denne metoden ble også anvendt for å isolere partielle genomiske kloner av PVCR for atlantehavslaks (Figur 1), arktisk røye (Figur 2) og regnbueørret (Figur 3). De degenererte oligonukleotid-primere anvendt var 5'-TGT CKT GGA CGG AGC CCT TYG GRA TCG C-3' (SEKV ID NR:12) og 5'-GGC KGG RAT GAA RGA KAT CCA RAC RAT GAA G-3' (SEKV ID NR:13), hvor K er T eller G, Y er C eller T og R er A eller G. De degenererte oligoer ble dannet ved standard metoder (Preston, G.M., 1993, "Polymerase chain reaction with degenerate oligonucleotide primers to clone gene family members," i: Methods in Mol. Biol., vol. 58, ed. A. Harwood, Humana Press, s. 303-312). Genomiske bånd fra disse tre arter ble amplifisert, rensset ved agarose-gelelektroforese, ligert inn i en passende plasmid-vektor (laks og arktisk røye arter pT7 Blue (Novagen, Madison, WI; ørret anvendte pGem-T (Promega Biotech. Madison, WI) og transformert til en passende bakteriell verts-stamme laks og arktisk røye - pT7 vektor med NovaBlue (Novagen,

Madison, WI) og ørret pGEM-T anvendte JM-109 E. coli celle som deretter ble dyrket i flytende medium. Plasmidene og insersjonene ble renset fra vertscellene og sekvensert. Fig. 4 viser de utledede aminosyresekvenser og oppstilling for PVCR fra atlantehavslaks, arktisk røye og regnbueørret, i forhold
 5 til PVCR fra nyren til pigghå (*Squalus acanthias*). SKCaR aminosyre- og nukleinsyresekvenser er vist i Figurer 4A-H.

Ytterligere PVCR-sekvenser er isolert og sekvensert i andre arter av fisk. Disse sekvenser omfatter, men er ikke begrenset til, PVCR isolert i laks (f.eks. Coho Laks (*Oncorhynchus kisutch*), Chum Laks (*Oncorhynchus keta*), Chinook
 10 Laks (*Oncorhynchus tshawytscha*), Pink Laks (*Oncorhynchus gorbuscha*), Sockeye Laks (*Oncorhynchus nerka*)). Sekvensene for disse arter kan finnes i patentsøknad nr.: 09/687,477, innlevert 12. oktober 2000.

Eksempel 2: Fôret

15 Det er to generelle metoder for å fremstille fôr for konsum av fisk som del av Prosess I og II. Disse to prosesser involverer enten reformulering av fôret eller tilsetning av en konsentrert løsning for absorpsjon i fôret fulgt av et topp-lag for akseptbarhet. Denne beskrivelse beskriver metodologien for å fremstille fôr ved anvendelse av hver av disse 2 metoder.

20

Metoder:

Fôr-fremstilling for lakseforsøk

For reformulering av fôr er bestanddelene som følger: Basis-dietten ble fremstilt ved anvendelse av de følgende bestanddeler og prosedyre: 30% Squid
 25 (gjort flytende i blander), 70% Corey Aquafeeds flyndrediett (pulverisert i blander). Bestanddeler ble blandet til en halvfuktig "deig" ball. Andre bestanddeler omfattende NaCl eller PVCR aktive forbindelser ble blandet i basis-dietten etter vekt i henhold til hva forsøket trengte.

30 Moore Clark standard ferskvanns laksefisk-diett (størrelse 1,2,1,5,2,0, 2,5 og 3,5 mm) kan også anvendes. Et topplag ble påført på pelletene slik at topplaget utgjør 4% av vekten til basisdietten. Topplaget er sammensatt av 50% krill hydrolysat (Specialty Marine Products Ltd.) og 50% Menhaden

fiskeolje. Topplaget blir tilsatt for akseptbarhet og lukking av tilsatte bestanddeler.

Andre bestanddeler kan omfatte NaCl, MgCl₂, CaCl₂ eller L-tryptofan som blir tilsatt etter vekt til basisdietten etter vekt.

5

Fremstilling av fôr inneholdende 7% (vekt/vekt) NaCl:

For Prosess I: Fast natriumklorid eller NaCl utmålt i et forhold på 7% av vekten til Moore Clark standard ferskvanns laksediett-vekt ble satt til et volum av springvann omtrent 3-4 ganger vekten til NaCl. Blandingen ble oppvarmet til
10 60-70°C med blanding ved anvendelse av en magnetisk rørestav for å oppløse saltet. NaCl-løsningen ble deretter hellet i en håndholdt sprøyte og påført på Moore Clark standard ferskvann laksediett som blandes i en 1,5 kubikkmeter motorisert sementblander. Etter absorpsjon av den NaCl-rike løsning, blir den fuktete Moore Clark standard ferskvann laksedietten spredd tynt på trådglass
15 og plassert i et lukket hyllesystem utstyrt med en vifte og 1500 watt varmeelement for å fremskynde tørkeprosessen. Etter tørking i omtrent 6 timer, blir de tørkede NaCl-rike pellet returnert til sementblander og et topp-lag påført. Fôret blir lagret ved romtemperatur inntil anvendelse.

Fremstilling av fôr inneholdende 7% (vekt/vekt) NaCl + PVCR-agonist
20 (Tryptofan) for Prosess II: Fast natriumklorid eller NaCl utmålt i et forhold på 7% av vekten til Moore Clark standard ferskvann laksefiskdiett-vekt ble satt til et volum av springvann på omtrent 3-4 ganger vekten til NaCl. Blandingen ble oppvarmet til 60-70°C med blanding ved anvendelse av en magnetisk rørestav for å oppløse saltet. USP kvalitet L-tryptofan ble satt til vannet med enten 2
25 gram eller 4 gram for hver kg av Moore Clark standard ferskvann laksefiskdiett avhengig av formuleringsbehov. Fortynnet saltsyre ble satt til vannet med blanding inntil tryptofanet var oppløst og pH i løsningen var omtrent 4,0. NaCl + tryptofan-løsningen ble deretter hellet i en håndholdt sprøyte og ble deretter påført på Moore Clark standard ferskvann laksefiskdietten som virvlet inne i en
30 sementblander. Etter absorpsjon av NaCl+tryptofan-løsningen blir den fuktete Moore Clark standard ferskvann laksefisk-diett deretter sprøytet tynt på trådglass og plassert i et lukket hyllesystem utstyrt med en vifte og 1500 watt varmeelement for å fremskynde tørkeprosessen. Etter tørking i omtrent 6 timer

blir de tørkede NaCl/tryptofan-rike pellet deretter returnert til sement-blanderen og et topp-lag blir påført. Fôret blir lagret ved romtemperatur inntil anvendelse.

L-tryptofan kan erstattes med hvilken som helst aminosyre, beskrevet her, som modulerer PVCR-ekspressjon.

5 For å fremstille fôret for ferskvann for anvendelse under innprentingsprosessen som inneholder odoranten, kan trinnene for fremstilling av fôret for enten Prosess I eller II, som beskrevet ovenfor, følges og odoranten blir enkelt satt til fôret. Mengden av odorant satt til fôret er mellom spormengder til ca. 100 mg/kg (mg av odorant pr. kg av fôr). Odoranten anvendt for fôret kan
10 identifiseres ved metodene beskrevet her.

Fôr for sjøvann inneholdende odoranten kan fremstilles, for eksempel ved tilsetning av odoranten anvendt under innprentingsprosessen til fôr typisk gitt til fisk overført til sjøvann.

15 Eksempel 3: Tilstedeværelse og funksjon av PVCR-protein i nasale lameller og olfaktorisk bulbus så vel som GI-kanalen til fisk.

Dataene beskrevet her illustrerer rollene til PVCR-proteiner i de olfaktoriske organer (nasale lameller og olfaktorisk bulbus) av fisk ettersom de angår evnen til fisk til å sanse eller "lukte" både endringer i vann-salinitet
20 og/eller ionisk sammensetning så vel som spesifikke aminosyrer. Disse data er spesielt anvendbare for anadrom fisk (laks, ørret og røye) som enten blir overført fra ferskvann direkte til sjøvann eller eksponert for Prosess I eller Prosess II i ferskvann og deretter overført til sjøvann.

Disse data beskrevet her ble avledet fra en kombinasjon av kilder
25 omfattende immunocyto kjemi ved anvendelse av anti-PVCR antisera, RT-PCR amplifisering av PVCR fra nasalt lamellvev, undersøkelser av funksjonen av rekombinante akvatiske PVCR-proteiner uttrykt i dyrkede celler hvor disse proteiner "sanser" spesifikke ioner eller aminosyrer så vel som elektrofysiologiske registreringer av nervecelle elektrisk aktivitet fra olfaktoriske
30 nerver eller bulbus til ferskvannslaks.

Kombinasjonen av immunocyto kjemi og RT-PCR-data, beskrevet her, avslører tilstedeværelse av PVCR-proteiner i både store familier av fisk (elasmobranch-hai; teleost-laks) i både larve, unge og voksne stadier.

Immunocytokjemi-analyser viser at ett eller flere PVCR-proteiner er til stede både på deler av olfaktoriske reseptorceller lokalisert i de nasale lameller av fisk (hvor de er badet i vann fra den omgivende omgivelse) så vel som på nerveceller som utgjør olfaktorisk glomeruli til stede i den olfaktoriske bulbus i fiskehjerne (hvor disse celler er eksponert for den indre ioniske omgivelse i fiskens kropp). Således, fra disse lokasjoner kan fisken sammenligne den ioniske sammensetning av det omgivende vann med referanse til deres egen indre ioniske sammensetning. Endringer i ekspresjon og/eller sensitivitet av PVCR-proteiner tilveiebringer metoder for å sette fisken i stand til å bestemme på kontinuerlig basis hvorvidt vannsammensetningen de møter er forskjellig fra den de er tilpasset eller eksponert for tidligere. Dette systemet er sannsynlig å være integrert med både kontroll av indre kropps-sammensetning av fisk så vel som hjemvending av laks fra ferskvann til sjøvann og vice versa. Således har fisk evnen til å "lukte" endringer i vann-salinitet direkte via PVCR-proteiner og responderer hensiktsmessig for både å regulere deres kropps-sammensetning og forbli i omgivelser som er best for deres overlevelse i naturen.

Ett trekk ved dette biologiske system er endring i sensitivitet av PVCR-protein for divalente kationer så som Ca^{2+} og Mg^{2+} ved endringer i NaCl-konsentrasjonen i vannet. Således har PVCR i fiskens olfaktoriske organer forskjellig tilsynelatende sensitivitet for Ca^{2+} enten i nærvær eller fravær av NaCl. Disse data presentert her er de første direkte bevis for disse funksjoner via PVCR-proteiner til stede i det olfaktoriske apparatet til fisk.

Et annet trekk ved PVCR-proteinfunksjon i det olfaktoriske apparatet til fisk er å modulere responser av olfaktoriske celler til spesifikke odoranter (tiltrekningsmidler eller frastøtningsmidler). Transduksjon av cellulære signaler som er et resultat av binding av spesifikke odoranter til olfaktoriske celler skjer via endringer i ioniske gradienter gjennom plasmamembranene av disse celler. Binding av spesifikke odoranter til olfaktoriske celler resulterer i elektrisk nerveledningssignaler som kan registreres ved anvendelse av standardiserte elektrofysiologiske elektroder og utstyr. Ved anvendelse av dette apparat, ble det vist at det olfaktoriske apparatet av ferskvanns-tilpasset laks:

1. responderte på PVCR-agonister på en konsentrasjonsavhengig måte lignende den vist tidligere for annet fiskevev omfattende det

vist for vinterflyndre-urinblære. Disse data gir de funksjonelle bevis for tilstedeværelse av et PVCR-protein; og

2. at tilstedeværelse av en PVCR-agonist reduserer eller fjerner signalet som er et resultat av odoranter omfattende både tiltrekningsmidler og frastøtningsmidler. Således har PVCR i det olfaktoriske apparatet til laks kapasiteten til å modulere responser på forskjellige odoranter.

Et annet trekk ved PVCR-proteiner er deres evne til å "sanse" spesifikke aminosyrer til stede i omgivelsen omkring. Ved anvendelse av full-lengde rekombinant SKCaR cDNA, ble funksjonelt SKCaR-protein uttrykt i HEK-celler og vist å respondere på en konsentrasjons-avhengig måte på både enkle og blandinger av L-aminosyrer. Siden PVCR-agonister omfattende aminosyrer så vel som polyaminer (putrescin, spermin og spermidin) er tiltrekningsmidler for marine organismer omfattende fisk og skalldyr, tilveiebringer disse data en annen metode ved hvilken PVCR-proteiner ville tjene ikke bare som modulatorer av luktesansen til fisk, men også som sensorer for aminosyrer og polyaminer selv. PVCR-proteiner i andre organer av fisk omfattende G.I.-kanalen og de endokrine organer til fisk fungerer også til å sanse spesifikke konsentrasjoner av aminosyrer, hvilket gir integrering av en rekke cellulære prosesser i epitelceller (aminosyretransport, vekst, ionetransport, motilitet og vekst) for fordøyelse og utnyttelse av næringsstoffer hos fisk.

Beskrivelse av eksperimentelle resultater og data-tolkning:

PVCR-protein og mRNA er lokalisert til de olfaktoriske lameller, olfaktorisk nerve og olfaktorisk bulbus til ferskvannstilpasset larve-, ung og voksen atlantehavslaks så vel som de olfaktoriske lameller til pigghå:

Figur 5 viser representative immunocyto kjemi-fotografier av PVCR-protein-lokalisering i olfaktorisk bulbus og nerve så vel som olfaktoriske lameller hos unge atlantehavslaks. Spesifisiteten av merking for PVCR-protein blir verifisert ved anvendelse av 2 distinkte antisera hver rettet mot en forskjellig region av PVCR-proteinet. Således viser antiserum anti-4641 (som gjenkjenner en ekstracellulært domene PVCR-region) og antiserum anti-SKCaR (som gjenkjenner en intracellulært domene PVCR-region) lignende merkingsmønstre som omfatter forskjellige glomeruli på serielle snitt av

olfaktorisk bulbus. Ved anvendelse av anti-SKCaR antiserum blir spesifikk merking av PVCR-proteiner observert i adskilte regioner av den olfaktoriske nerve så vel som epitelceller i de nasale lameller som er eksponert for den ytre ioniske omgivelse.

5 Tilstedeværelsen av PVCR-protein i både nasale lamell-celler så vel som olfaktorisk bulbus og nerve viser at disse respektive PVCR-proteiner ville være i stand til å sanse både de indre og ytre ioniske omgivelser til laksen. For dette formål er celler inneholdende innvendig eksponerte PVCR forbundet med utvendig eksponerte PVCR via elektriske forbindelser innen nervesystemet.

10 Som vist skjematisk i Figur 6 indikerer disse data at eksternt og internt eksponerte PVCR fungerer sammen for å gi evnen til å sanse de ioniske konsentrasjoner av den omgivende ioniske omgivelse ved anvendelse av som referanse den ioniske konsentrasjon av laksens kroppsvæsker. Endringer i ekspresjon og/eller sensitivitet av ytre sett av PVCR vs indre PVCR ville

15 deretter gi en langvarig "hukommelse" av den tilpassede tilstand til fisken ettersom den drar gjennom ioniske omgivelser med forskjellig sammensetning. Figur 7 viser immunocyto kjemi ved anvendelse av anti-SKCaR antiserum som avslører tilstedeværelse av PVCR-protein i både utvikling av nasale lamell-celler og olfaktorisk bulbus i larve-atlanterhavslaks bare dager etter klekking

20 (plommesekk-stadiet). Som beskrevet her er innprenting av laks tidlig i utvikling så vel som under smoltifisering vist å være nøkkel-intervaller for vellykket tilbakevending av vill-laks til deres natale elv. Tilstedeværelse av PVCR-proteiner i disse utviklingsstadier av lakselivscyklus indikerer at PVCR deltar i denne prosessen.

25 Data oppnådd ved anvendelse av anti-SKCaR antiserum fra andre fiskearter omfattende bruskfisk viser lignende merking av PVCR protein i celler (markert A) i deres nasale lameller (Figur 8). Anvendelse av annen metodikk omfattende RT-PCR ved anvendelse av spesifikke degenererte primere (Figur 9) og ELISA-metoder (Figur 10) detekterer tilstedeværelse av PVCR-proteiner

30 og mRNA i nasale lameller til fisk. Mens ingen av disse 2 teknikker gir kvantitative målinger som beskrevet, er begge sett av data konsistente og viser rikelig PVCR-protein til stede i dette vev.

Måling av ekstracellulære elektriske potensialer (EEG) fra olfaktorisk nerve fra ferskvanns-tilpasset atlantehavslaks avslørte tilstedeværelse av funksjonelle PVCR-proteiner:

Figur 11 oppviser representative registreringer oppnådd fra 6 fisk av
 5 ferskvannstilpassede unge atlantehavslaks (omtrent 300-400 g) ved
 anvendelse av metoder lignende de beskrevet i *Bodznick, D. J. Calcium ion: an odorant for natural water discriminations and the migratory behavior of sockeye salmon, Comp. Physiol. A 127:157-166 (1975)* og *Hubbard, PC, et al., Olfactory sensitivity to changes in environmental Ca^{2+} in the marine teleost Sparus*
 10 *Aurata, J. Exp. Biol. 203:3821-3829 (2000)*. Etter bedøving av fisken ble den plassert i V-klemme-apparat hvor dens gjeller ble irrigert kontinuerlig med luftet sjøvann og dens nasale lameller badet kontinuerlig med en strøm av destillert vann via en slange holdt i stilling i den inhalerende olfaktoriske åpning. De olfaktoriske nerver til fisken ble eksponert ved fjerning av overliggende
 15 benstrukturer. Stimuli ble levert som boluser til det olfaktoriske epitel via en 3-veis ventil hvor 1 cm^3 av vann inneholdende stimulus raskt ble injisert i slangen inneholdende en kontinuerlig strøm av destillert vann. Ekstracellulære registreringer ble oppnådd ved anvendelse av høyresistens wolfram-elektroder hvor de resulterende amplifiserte analoge signaler (Grass Amplifier apparat) ble
 20 digitalisert, vist og analysert med datamaskin ved anvendelse av MacScope programvare. Ved anvendelse av denne eksperimentelle metode, kunne stabile og reproducerbare registreringer oppnås i opptil 6 timer etter den innledende kirurgi på fisken.

Som vist i Figur 11 gir irrigering av laksens olfaktoriske epitel med
 25 destillert vann, minimal dannelse av store signaler i olfaktorisk nerve. Dataene i Figur 11 er vist både som rå-data (venstre kolonne) og de tilsvarende integrerte signaler for hver rå-registrering er vist i høyre kolonne. Eksponering av det olfaktoriske epitel for 500 mikromolar L-alanin (et velkjent aminosyre-tiltrekningsmiddel for fisk) gir stor økninger i både stimuleringsfrekvensen og
 30 amplituden i den olfaktoriske nerve som vedvarer omtrent 2 sekunder. Tilsvarende produserer påføring av enten 1 mM Ca^{2+} eller 250 mM NaCl også responser i EEG-aktivitet. For å teste tilstedeværelse av funksjonelt PVCR-protein ble det olfaktoriske epitel eksponert for 50 mikromolar gadolinium (Gd^{3+} -

en PVCR-agonist) og oppnådde også en respons. Figur 12A viser dose-responsdata fra multiple fisk for forskjellige PVCR-agonister eller modulatorer hvor de relative størrelser av individuell olfaktorisk nerverespons ble normalisert i forhold til responsen produsert av eksponering av det olfaktoriske epitel for 10 mM Ca^{2+} . Som vist i Figur 12A er det olfaktoriske epitel til ferskvannstilpasset 5 ung laks meget sensitivt for Ca^{2+} hvor den halvt maksimale eksitatoriske respons (EC_{50}) er omtrent 1-10 mikromolar. Tilsvarende gir eksponering av olfaktorisk epitel for PVCR-agonist Gd^{3+} responser av en lignende størrelse som den fremkalt av Ca^{2+} i et konsentrasjonsområde på 1-10 mikromolar. I 10 motsetning skjer olfaktoriske epitelresponser på Mg^{2+} ikke før 10-100 mikromolare løsninger blir anvendt. Disse doserespons-kurver ($\text{EC}_{50} \text{Gd}^{3+} \leq \text{Ca}^{2+} < \text{Mg}^{2+}$) er lignende de oppnådd for PVCR-modulerte responser i annet fiskeepitel (flyndre-urinblære NaCl-mediert vanntransport - se SKCaR anvendelse).

I motsetning viser analyse av de olfaktoriske epitel-responser på NaCl-eksponering at det er uresponsivt inntil en konsentrasjon på 250 millimolar NaCl blir anvendt. Siden NaCl ikke direkte aktiverer PVCR på samme måte som Gd^{3+} , Ca^{2+} eller Mg^{2+} men heller reduserer sensitiviteten av PVCR for disse 15 agonister, er disse data også i overensstemmelse med tilstedeværelse av olfaktorisk epitel PVCR. Responsen fremkalt ved eksponering av epitelet for betydelige konsentrasjoner av NaCl skjer sannsynligvis via andre PVCR-uavhengige mekanismer. 20

Disse data indikerer at PVCR-proteiner til stede i olfaktorisk epitel kan sanse og generere tilsvarende olfaktoriske nervesignaler som respons på PVCR-agonister i passende konsentrasjoner i destillert vann. 25

Ytterligere data, vist i Figurer 12B-12D gir støtte for tilstedeværelse av funksjonelle PVCR protein(er) i de nasale lameller av atlantehavslaks med en sensitivetsprofil lignende den vist av pattedyr-CaR-proteiner. Figur 12B viser en mer fullstendig karakterisering av responsen av ferskvanns-tilpasset atlantehavslaks-smolt olfaktoriske responser på forskjellige PVCR-agonister 30 (Mg^{2+} , Gd^{3+} og Ca^{2+}) og en enkel antagonist (NaCl). Disse data utvider dataene beskrevet ovenfor.

Figur 12C viser hvorledes PVCR-agonist (Ca^{2+}) reduserer den olfaktoriske respons produsert ved eksponering av atlantehavslaks olfaktorisk epitel for 500 mM NaCl. Bemerk at tilstedeværelsen av 10 mM Ca^{2+} i en 500 mM NaCl-løsning gir en respons som er identisk med den produsert av kunstig sjøvann- (ASW) eksponering.

Figur 12D viser de kvantitative responser av forskjellige PVCR-agonister for å redusere den store respons produsert av irrigering av de nasale lameller med 500 mM NaCl. Bemerk at Ca^{2+} fritt og divalent fritt sjøvann produserer en respons som er lignende i størrelse til den vist etter eksponering for 500 mM NaCl alene. I motsetning reduserer inklusjon av én PVCR-agonist omfattende 1 mM Mg^{2+} , 1 mM Ca^{2+} , 1 mM Sr^{2+} eller 50 mikromolar Gd^{3+} alle betydelig den olfaktoriske respons på 500 mM NaCl lignende den fremkalt ved irrigering av de nasale lameller med kunstig sjøvann (ASW). Alle disse responser er større enn den fremkalt ved irrigering av de nasale lameller med destillert vann.

Disse data demonstrerer at PVCR-agonister kan modulere den olfaktoriske respons til atlantehavslaks.

Metode for stimuli og stimulus levering: anvendt for å oppnå dataene beskrevet i Figurer 12B-12D ble oppnådd som følger:

Stimuli ble levert til det olfaktoriske epitel via et glass-kapillarrør plassert i den inhalerende olfaktoriske åpning. Dette rør ble forbundet med et tyngdekraft-matet ledningssystem som tillater skifting fra bakgrunn-perfusjon (trekull-filtrert ferskvann) til en eksperimentell stimulus mens det opprettholdes en strømningshastighet på 6-8 ml/min. Verifisering av lokasjonen av stimulus-leveringsrør og elektrode ble utført ved observasjon av responser på en 'test-stimulus' på 1 ml L-alanin.

Stimuli besto av CaR-agonister (CaCl_2 , MgCl_2 , GdCl_3 , SrCl_2 og NaCl (Sigma-Aldrich), kontroll ferskvanns-stimulus (trekull filtrert springvann) og kontroll sjøvannsstimuli (ASW, Ca-fritt ASW, divalent fritt ASW). Stimuli ble presentert alene eller i kombinasjon med 500 mM NaCl. Ringers og kunstig sjøvann oppskrifter ble oppnådd fra the Biological Bulletin Compendia (alle konsentrasjoner er i mM) ASW (NaCl 423, KCl 9,0, CaCl_2 22,94, MgSO_4 25,50, NaHCO_3 2,14, pH 8,0); Ca-fritt ASW (NaCl 436,71, KCl 9,0, MgCl_2 22,94, MgSO_4 , 25,5, NaHCO_3 2,14, pH 8,0); divalent fritt ASW (NaCl 461,85, KCl

10,73, NaHCO_3 2,14, Na_2SO_4 7,04, pH 8,0); FW Teleost Ringer's (NaCl 111,0, KCl 5,37, CaCl_2 1,0, MgSO_4 0,6, HEPES 5,0, pH 7,3).

Tilsetning av PVCR-agonister så som Ca^{2+} eller Gd^{3+} til destillert vann inneholdende velkjente laksefrastøtningsmidler fjerner reversibelt responsen til
5 det olfaktoriske epitel på disse stimuli:

Figur 13 viser representative data oppnådd fra en enkel kontinuerlig registrering hvor det olfaktoriske epitel først ble eksponert for et velkjent frastøtningsmiddel, pattedyr-fingerskylling. Fingerskylling blir oppnådd ved enkelt å skylle menneskefingre med vedheftede oljer og fettsyrer ved
10 anvendelse av destillert vann og er tidligere vist å være et kraftig frastøtningsmiddel-stimulus både ved EEG-registreringer så vel som unngåelse-adferdsforsøk (Royce-Malmgren og W.H Watson *J. Chem. Ecology* 13:533-546 (1987)). Bemerk imidlertid at inklusjon av PVCR-agonister 5mM Ca^{2+} eller 50 mikromolar Gd^{3+} reversibelt fjerner responsen av det olfaktoriske
15 epitel for pattedyr-fingerskylling. Disse data viser at PVCR-agonister modulerte responsen av det olfaktoriske epitel på en odorant så som pattedyr-fingerskylling. Fjernelse av responser på både PVCR-agonister som vist i Figur 12A så vel som pattedyr-fingerskylling indikerer at det er noen komplekse interaksjoner mellom PVCR-proteiner og andre odorant-reseptorer. Det er
20 også ekstremt usannsynlig at inklusjon av PVCR-agonister fjerner alle de stimulerende komponenter av pattedyr-fingerskylling fra løsning slik at de ikke var i stand til å stimulere epitelet.

Tilsetning av PVCR-agonister så som Ca^{2+} eller Gd^{3+} , men ikke NaCl til destillert vann inneholdende det velkjente laksetiltrekningsmiddel L-alanin
25 fjerner reversibelt responsen av det olfaktoriske epitel på disse stimuli.

Figur 14 viser en tidsserie av stimuli (2 min mellom hver stimulus i en enkel fisk) lignende den vist i Figur 13 bortsett fra at 500 mikromolar L-alanin (et laksetiltrekningsmiddel) ble anvendt for å produsere et signal i den olfaktoriske nerve. Bemerk at tilsetning av enten 5 mM Ca^{2+} (registrering #2)
30 eller 50 mikromolar Gd^{3+} (registrering #7) til 500 mikromolar L-alanin resulterte i fullstendig tap av den tilsvarende respons fra den olfaktoriske nerve etter injeksjon av denne blandingen. I begge tilfeller var dette ikke på grunn av en permanent endring av det olfaktoriske epitel av noen av disse PVCR-agonister

fordi en påfølgende identisk stimulus uten PVCR-agonisten (registrering #3 og #8) forårsaket returnering av signalet. Det er bemerkelsesverdig at i tilfellet av Gd^{3+} -tilsetning, ble størrelsen av det påfølgende L-alanin-signal redusert sammenlignet med kontroll (sammenlign registreringer #6 vs #8) hvilket

5 indikerer at det olfaktoriske epitel foretrekker et intervall med gjenvinning fra dets eksponering for denne kraftige PVCR-agonist. Imidlertid er endring av respons på L-alanin-stimulus ikke permanent eller uspesifikk siden

kombinasjon av samme dose av L-alanin med 250 mM NaCl resulterte initielt i en lignende respons (registreringer #4 og #9) fulgt av en forbedret respons på

10 L-alanin alene (registreringer #5 og #10).

I oppsummering viser dataene vist i Figurer 13 og 14 at inklusjon av en PVCR-agonist i løsninger inneholdende enten et frastøtningsmiddel (finger-skylling) eller tiltrekningsmiddel (L-alanin) forårsaker en dramatisk reduksjon i responsen av det olfaktoriske epitel på de odoranter. For både

15 frastøtningsmidler og tiltrekningsmidler, skjer noen form for komplekse interaksjoner i olfaktoriske epitelceller siden blanding av PVCR-agonister og odoranter gjør epitelet temporært uresponsivt til hvert stimulus. Mens typen av slike interaksjoner ikke er kjent på foreliggende tidspunkt, skjer slike interaksjoner ikke på nivået av PVCR-molekylet selv som vist ved data fra

20 forsøk ved anvendelse av rekombinant PVCR-protein SKCaR. Som ytterligere beskrevet her forbedrer inklusjon av aminosyrer i nærvær av Ca^{2+} responsen av SKCaR for omgivelse Ca^{2+} -konsentrasjoner. Uansett deres natur er disse negative modulerende effekter av PVCR-agonister omfattende Ca^{2+} sannsynlige å produsere store effekter på hvorledes ferskvannslaks lukter

25 objekter i deres omgivelse etter overføring fra en lav-kalsium til en høy-kalsium omgivelse. Anvendelse av dette forsøkssystemet ville tillate identifikasjon og analyse av både spesifikke klasser av PVCR-agonister og -antagonister så vel som spesifikke effekter av hver PVCR-modulator på spesifikke odoranter omfattende både frastøtningsmidler og tiltrekningsmidler.

30

Rekombinant PVCR-protein SKCaR har evnen til å sanse konsentrasjoner av aminosyrer etter dens ekspresjon i humane embryoniske nyre- (HEK) celler:

Full-lengde rekombinant pigghå- (*Squalus acanthias*) nyre kalsium-reseptor (SKCaR) ble uttrykt i humane embryoniske nyreceller ved anvendelse av metoder beskrevet her. Evnen til SKCaR til å respondere på individuelle aminosyrer så vel som forskjellige blandinger ble kvantifisert ved anvendelse av FURA-2 forhold avbildningsfluorescens.

Figur 15 viser en sammenligning av fluorescens-traceringer av FURA2-lastede celler som stabilt uttrykker SKCaR som ble badet i fysiologisk saltvann (125 mM NaCl, 4mM KCl, 0,5 mM CaCl₂, 0,5 MgCl₂, 20 mM HEPES (NaOH), 0,1% D-glukose pH 7,4) i nærvær eller fravær av 10 mM L-isoleucin (L-Ile) før de ble plassert i fluorimeteret. Baselinje ekstracellulær Ca²⁺ konsentrasjon var 0,5 mM. Aliquoter av Ca²⁺ ble tilsatt for å produsere endelige ekstracellulære konsentrasjoner på 2,5 mM, 5 mM, 7,5 mM, 10 mM og 20 mM Ca²⁺ med endringer i fluorescensen registrert. Bemerk at økning i cellefluorescens ble større i nærvær av 10 mM Phe for ekstracellulære Ca²⁺-konsentrasjoner mindre enn 10 mM.

Figur 16 viser data plottet fra multiple forsøk som beskrevet i Figur 15 hvor virkningene av 10 mM Phe, 10 mM Ile eller en aminosyreblending (AA blanding) inneholdende alle L-isomerer i de følgende konsentrasjoner i mikromol/liter: 50 Phe, 50 Trp, 80 His, 60 Tyr, 30 Cys, 300 Ala, 200 Thr, 50 Asn, 600 Gln, 125 Ser, 30 Glu, 250 Gly, 180 Pro, 250 Val, 30 Met, 10 Asp, 200 Lys, 100 Arg, 75 Ile, 150 Leu. Bemerk at både 10 mM Phe og 10 mM Ile så vel som blandingen av aminosyrer øker SKCaR's respons på en gitt Ca²⁺ - konsentrasjon. Således viser disse data at tilstedeværelse av aminosyrer enten alene eller i kombinasjon øker den tilsynelatende sensitivitet til Ca²⁺ hvilket tillater at SKCaR "sanser" aminosyrer i nærvær av fysiologiske konsentrasjoner av Ca²⁺. Disse data oppnådd for SKCaR er sammenlignbare med de oppnådd for human CaR.

Betydningen av disse data for akvatiske organismer står i markert kontrast til rollene til humane CaR aminosyre-sansende kapabiliteter. Figur 15 viser at SKCaR's maksimale evne til å sanse aminosyrer er begrenset til et område av Ca²⁺ som er til stede både i akvatiske ytre omgivelser så vel som kroppsvæskene til forskjellige fisk. De følgende fysiologiske prosesser skjer: 1) Sansing av aminosyrer i den proksimal tarm og pyloric caeca til fisk: PVCR til

stede på den apikale overflate av intestinale epitelceller kan respondere på aminosyrer så som tryptofan som del av Prosess II. Inklusjon av tryptofan i føret til fisk interagerer med intestinal PVCR for å forbedre utvikling av ung anadrom fisk til å tolerere sjøvannsoverføring. 2) I både voksen, ung og larve-
 5 fisk, kunne PVCR lokalisert i den apikale membran av mage- og intestinal-epitelceller "sanse" tilstedeværelse av aminosyrer produsert av proteolyse av proteiner til aminosyrer. Denne mekanisme kunne anvendes for å informere både epiteliale og nevroendokrine celler i tarmen om tilstedeværelse av næringsstoffer (proteiner) og utløse en rekke responser omfattende vekst og
 10 differensiering av intestinalt epitel så vel som ledsagende transport-proteiner, sekresjon eller reabsorpsjon av ioner så som mavesyre. Apikal PVCR regulerer også sekresjon av intestinale hormoner så som cholecystokin (CCK) og andre. 3) PVCR-proteiner til stede i celler i de nasale lameller av fisk "lukter" både vann-salinitet (via Ca^{2+} , Mg^{2+} og NaCl) og aminosyrer som er et
 15 eksempel på et tiltrekningsmiddel. På foreliggende tidspunkt er det uklart hvorvidt aminosyre sansingskapabiliteter av PVCR blir anvendt av det olfaktoriske epitel for å sette fisken i stand til å lukte forskjellige aminosyre-tiltrekningsmidler.

Disse data viser at PVCR-sansing av aminosyrer forekommer i et
 20 område av ekstracellulært kalsium som er til stede i forskjellige konsentrasjoner av sjøvann til stede i estuarer og fiske-migreringsruter så vel som forskjellige kammere av fiskens kropp, omfattende serum og kroppshulrom omfattende tarm, pyloric caeca og nyre, hvor transepitelial aminosyre-absorpsjon skjer. Disse data utgjør den første rapport som viser aminosyresensitiviteten til PVCR
 25 i fisk.

Eksempel 4. Olfaktoriske nerve-registreringer i ferskvanns-tilpasset atlantisk laks under betingelser som simulerer ferskvann til sjøvann-overføring.

Figur 17 viser en representativ registrering oppnådd fra en enkel
 30 ferskvannstilpasset atlantehavslaks smolt. Det øvre venstre panel viser en registrering av elektriske impulser oppnådd fra den olfaktoriske nerve i disse fisk i et intervall når destillert vann blir anvendt for å irrigere deres nasale lameller. Bemerk at fordi disse fisk er ferskvanns-tilpasset, er bare sjelden

store avvik (angitt ved 2 stiplede piler) av registreringsfortegnelsen observert etter irrigering av de nasale lameller med destillert vann (større nedover pil). I motsetning, hvis de nasale lameller av samme fisk nå blir irrigert med kunstig sjøvann (nedre panel pil), skjer det nå begynnelsen av multiple storskala

5 elektriske impulser som forhindrer deteksjon av spesifikke odoranter så som L-Ala (vist øverst til høyre under perfusjon med destillert vann). Disse data viser hva som skjer med ferskvanns-tilpasset atlantehavslaks smolt når de blir overført fra ferskvann direkte til sjøvann og ikke blir underkastet metodene ifølge foreliggende oppfinnelse. Som beskrevet her viser disse data at det er et

10 temporært intervall hvor ferskvannstilpasset fisk er ute av stand til optimalt å lukte eller detektere mat i sjøvann på grunn av den dramatiske forandring i deres omgivende ioniske omgivelse. Dette fenomen er sannsynligvis ansvarlig for den betydelig reduserte spising vist av slik fisk under intervallet som følger etter sjøvann-overføring. I motsetning begynner anadrom fisk som blir overført

15 fra ferskvann direkte til sjøvann etter eksponering for Prosess I eller Prosess II i ferskvann å spise 48 timer etter sjøvann-overføring. Den observerte forskjell i matkonsum mellom kontroll vs. fisk behandlet ved metodene ifølge foreliggende oppfinnelse under intervallet umiddelbart etter sjøvann-overføring er modulering av ekspresjon og/eller sensitivitet av i det minste PVCR i de

20 olfaktoriske organer til disse fisk.

Ledsagende patentsøknad nr. 09/687,373, med tittelen "Growing Marine Fish in Fresh Water," innlevert 12. oktober, 2000; patentsøknad nr. 09/687,476, med tittelen "Methods for Raising Pre-adult Anadromous Fish," innlevert 12. oktober 12, 2000; patentsøknad Nr. 09/687,372, med tittelen "Methods for

25 Raising Pre-adult Anadromous Fish," innlevert 12. oktober 2000; patentsøknad nr. 09/687,477, med tittelen "Methods for Raising Pre-adult Anadromous Fish," innlevert 12. oktober 2000 Provisional Patentsøknad Nr. 60/240,392, med tittelen "Polyvalent Cation Sensing Receptor Proteins in Aquatic Species," innlevert 12. oktober 2000; Provisional patentsøknad nr. 60/240,003, med

30 tittelen "Polyvalent Cation Sensing Receptor Proteins in Aquatic Species," innlevert 12. oktober 2000; patentsøknad nr.: 09/975,553, med tittelen "Methods for Raising Pre-adult Anadromous Fish," innlevert 11. oktober 2001; PCT patentsøknad nr.: PCT/US01/31562, med tittelen "Polyvalent Cation

Sensing Receptor in Aquatic Species,” innlevert 11. oktober 2001;
patentsøknad nr.: PCT/US01/31625, med tittelen “Growing Marine Fish in
Fresh Water,” innlevert 11. oktober 2001.

I tillegg nevnes søknad nr. 09/162,021, innlevert 28. september 1998,
5 internasjonal PCT-søknad nr. PCT/US97/05031, innlevert 27. mars 1997 og
søknad nr. 08/622,738 innlevert 27. mars 1996, alle med tittelen “Polycation
Sensing Receptor in Aquatic Species and Methods of Use Thereof” og

Nearing, J. *et al.*, “Polyvalent Cation Receptor Proteins (CaRs) are
salinity Sensors in Fish,” PNAS 99(14): 9231-9236 (2002).

SEQUENCE LISTING

<110> MariCal, Inc.

Harris, H. William

Jury, Steven

Russell, David R.

Nearing, Jacqueline A

Betka, Marlies

Linley, Timothy

Brown, Edward M

<120> Methods for Growing and Imprinting Fish Using an Odorant

<130> 2213.2004003

<140> PCT/US02/32217

<141> 2002-10-08

<150> 60/328,464

<151> 2001-10-11

<160> 13

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 594

<212> DNA

<213> Salmo salar

<220>

<221> misc_feature

<223> R=A or G

<400> 1

```

cttggcatta tgctctgtgc tgggggtatt cttgacagca ttcgtgatgg gagtggttat      60
caaatttcgc aacaccccaa ttgttaaggc cacaacaga gagctatcct acctcctcct      120
gttctcactc atctgctgtt tctccagttc cctcatcttc attggtgaac cccaggactg      180
gacatgccgt ctacgccagc ctgcattcgg gataagtttt gttctctgca tctcctgcat      240
cctggtaaaa actaaccgag tacttctagt gttcgaagcc aagatcccca ccagtctcca      300
tcgtaagtgg tgggggctaa acttgacagt cctgttagtg ttcctgttca catttggtgca      360
agtgatgata tgtgtgggtct ggctttacaa tgctcctccg gcgagctaca ggaaccatga      420
cattgatgag ataattttca ttacatgcaa tgagggtctt atgatggcgc ttggcttcct      480
aattgggtac acatgcctgc tggcagccat atctctcttc tttgcattta aatcacgaaa      540
actgccagag aactttactg aggctaagtt catcaccttc agcatgctca tctt      594

```

<210> 2

<211> 197

<212> PRT

<213> Salmo salar

<220>

<221> misc_feature

<222> (171)..(171)

<223> Xaa = Any amino acid

<400> 2

```

Leu Ala Leu Cys Ser Val Leu Gly Val Phe Leu Thr Ala Phe Val Met
1           5           10           15

```

```

Gly Val Phe Ile Lys Phe Arg Asn Thr Pro Ile Val Lys Ala Thr Asn
          20           25           30

```

```

Arg Glu Leu Ser Tyr Leu Leu Leu Phe Ser Leu Ile Cys Cys Phe Ser
          35           40           45

```

3/15

Ser Ser Leu Ile Phe Ile Gly Glu Pro Gln Asp Trp Thr Cys Arg Leu
50 55 60

Arg Gln Pro Ala Phe Gly Ile Ser Phe Val Leu Cys Ile Ser Cys Ile
65 70 75 80

Leu Val Lys Thr Asn Arg Val Leu Leu Val Phe Glu Ala Lys Ile Pro
85 90 95

Thr Ser Leu His Arg Lys Trp Trp Gly Leu Asn Leu Gln Phe Leu Leu
100 105 110

Val Phe Leu Phe Thr Phe Val Gln Val Met Ile Cys Val Val Trp Leu
115 120 125

Tyr Asn Ala Pro Pro Ala Ser Tyr Arg Asn His Asp Ile Asp Glu Ile
130 135 140

Ile Phe Ile Thr Cys Asn Glu Gly Ser Met Met Ala Leu Gly Phe Leu
145 150 155 160

Ile Gly Tyr Thr Cys Leu Leu Ala Ala Ile Xaa Phe Phe Phe Ala Phe
165 170 175

Lys Ser Arg Lys Leu Pro Glu Asn Phe Thr Glu Ala Lys Phe Ile Thr
180 185 190

Phe Ser Met Leu Ile
195

<210> 3

<211> 594

<212> DNA

<213> *Salvelinus alpinus*

<400> 3
cttggcatta tgctctgtgc tgggggtatt cttgacagca ttcgtgatgg gagtgtttat 60
cagatttcgc aacaccccaa ttgttaaggc cacaaacaga gagctatcct acctctcct 120
gttctcactc atctgctggt totccagctc cctcatcttc attggtgaac cccaggactg 180
gacatgccgt ctacgccagc ctgcattcgg gataagtttt gttctctgca tctcctgcat 240
cctggtcaaa actaaccgag tacttctagt gttcgaagcc aagatcccca ccagtctcca 300
tcgtaagtgg tgggggctaa acttgacggt cctggttggt ttctgttca catttggtgca 360

4/15

agtgatgata tgtgtggtct ggctttacaa tgctcctccg gcgagctaca ggaaccatga 420
cattgatgag ataattttca ttacatgcaa tgagggctct atgatggcgc tcggcttcct 480
aattgggtac acatgcctgc tggcagccat atgcttcttc tttgcattta aatcacgaaa 540
actgccagag aactttaccg aggctaagtt catcaccttc agcatgctca tctt 594

<210> 4

<211> 197

<212> PRT

<213> *Salvelinus alpinus*

<220>

<221> misc_feature

<223> Xaa = Any amino acid

<400> 4

Leu Ala Leu Cys Ser Val Leu Gly Val Phe Leu Thr Ala Phe Val Met
1 5 10 15

Gly Val Phe Ile Arg Phe Arg Asn Thr Pro Ile Val Lys Ala Thr Asn
20 25 30

Arg Glu Leu Ser Tyr Leu Leu Leu Phe Ser Leu Ile Cys Cys Phe Ser
35 40 45

Ser Ser Leu Ile Phe Ile Gly Glu Pro Gln Asp Trp Thr Cys Arg Leu
50 55 60

Arg Gln Pro Ala Phe Gly Ile Ser Phe Val Leu Cys Ile Ser Cys Ile
65 70 75 80

Leu Val Lys Thr Asn Arg Val Leu Leu Val Phe Glu Ala Lys Ile Pro
85 90 95

Thr Ser Leu His Arg Lys Trp Trp Gly Leu Asn Leu Gln Phe Leu Leu
100 105 110

Val Phe Leu Phe Thr Phe Val Gln Val Met Ile Cys Val Val Trp Leu
115 120 125

5/15

Tyr Asn Ala Pro Pro Ala Ser Tyr Arg Asn His Asp Ile Asp Glu Ile
130 135 140

Ile Phe Ile Thr Cys Asn Glu Gly Ser Met Met Ala Leu Gly Phe Leu
145 150 155 160

Ile Gly Tyr Thr Cys Leu Leu Ala Ala Ile Cys Phe Phe Phe Ala Phe
165 170 175

Lys Ser Arg Lys Leu Pro Glu Asn Phe Thr Glu Ala Lys Phe Ile Thr
180 185 190

Phe Ser Met Leu Ile
195

<210> 5

<211> 593

<212> DNA

<213> Oncorhynchus mykiss

<400> 5

ttggcattat gctctgtgct ggggggtattc ttgacagtat togtgatggg agtggtttatc	60
agatttcgca acaccccaat tgttaaggcc acaaacagag agctatccta cctcctcctg	120
ttctcactta tctgctgttt ctccagctcc ctcatcttca ttggtgaacc ccaggactgg	180
acatgccgtc tacgccagcc tgcattcggg ataagttttg ttctctgcat ctctgcac	240
ctgggtcaaaa ctaaccaggt acttctagtg ttcgaagcaa agatccccac cagtctccat	300
cgtaagtggg gggggctaaa cttgcagttc ctgttggtgt tctgttcac atttgtgcaa	360
gtgatgatat gtgtggtctg gctttacaat gctcctccgg cgagctacag gaaccatgac	420
attgatgaga tcattttcat tacatgcaat gagggctcta tgatggcgct tggcttcta	480
attgggtaca catgcctgct ggcagccata tgcttcttct ttgcatttaa atcacgaaaa	540
ctgccagaga attttaccga ggctaagttc atcaccttca gcatgctcat ctt	593

<210> 6

<211> 197

<212> PRT

<213> Oncorhynchus mykiss

6/15

<220>

<221> misc_feature

<223> Xaa = Any amino acid

<400> 6

Leu Ala Leu Cys Ser Val Leu Gly Val Phe Leu Thr Val Phe Val Met
1 5 10 15

Gly Val Phe Ile Arg Phe Arg Asn Thr Pro Ile Val Lys Ala Thr Asn
20 25 30

Arg Glu Leu Ser Tyr Leu Leu Leu Phe Ser Leu Ile Cys Cys Phe Ser
35 40 45

Ser Ser Leu Ile Phe Ile Gly Glu Pro Gln Asp Trp Thr Cys Arg Leu
50 55 60

Arg Gln Pro Ala Phe Gly Ile Ser Phe Val Leu Cys Ile Ser Cys Ile
65 70 75 80

Leu Val Lys Thr Asn Arg Val Leu Leu Val Phe Glu Ala Lys Ile Pro
85 90 95

Thr Ser Leu His Arg Lys Trp Trp Gly Leu Asn Leu Gln Phe Leu Leu
100 105 110

Val Phe Leu Phe Thr Phe Val Gln Val Met Ile Cys Val Val Trp Leu
115 120 125

Tyr Asn Ala Pro Pro Ala Ser Tyr Arg Asn His Asp Ile Asp Glu Ile
130 135 140

Ile Phe Ile Thr Cys Asn Glu Gly Ser Met Met Ala Leu Gly Phe Leu
145 150 155 160

Ile Gly Tyr Thr Cys Leu Leu Ala Ala Ile Cys Phe Phe Phe Ala Phe
165 170 175

Lys Ser Arg Lys Leu Pro Glu Asn Phe Thr Glu Ala Lys Phe Ile Thr
180 185 190

Phe Ser Met Leu Ile
195

<210> 7

<211> 4134

<212> DNA

<213> *Squalus acanthias*

<400> 7

aattccgttg ctgtcgggtc agtccaagtc tctccagtg caaatgaga aatgggtggtc	60
gccattacag gaacatgcac tacatctgtg ttaatgaaat attgtcagtt atctgaaggt	120
tattaaaatg tttctgcaag gatgggttca cgagaaatca attctgcacg ttttcccatt	180
gtcattgtat gaataactga ccaaagggat gtaacaaaat ggaacaaagc tgaggaccac	240
gttcaccctt tcttgagca tacgatcaac cctgaaggag atggaagact tgaggaggaa	300
atggggattg atcttccagg agttctgctg taaagcgatc cctcaccatt acaaagataa	360
gcagaaatcc tccaggcatc ctctgtaaac gggctggcgt agtgtggctt ggtcaaggaa	420
cagagacagg gctgcacaat ggctcagctt cactgccaac tcttattctt gggatttaca	480
ctctacagt cgtacaatgt ctcagggtat ggtccaaacc aaagggccca gaagaaagga	540
gacatcatac tgggaggtct cttcccaata cactttggag tagccgcca ggatcaggac	600
ttaaaatcga gaccggaggc gacaaaatgt attcgggtaca attttcgagg cttccgatgg	660
ctccaggcga tgatattcgc aattgaagag attaacaaca gtatgacttt cctgccaat	720
atcaccctgg gatatcgcat atttgacacg tgtaacaccg tgtccaaggc gctagaggca	780
acactcagct ttgtggccca gaacaaaatc gactcgctga acttagatga gttctgtaac	840
tgctctgacc atatcccatc cacaatagca gtggctgggg caaccgggtc aggaatctcc	900
acggctgtgg ccaatctatt gggattatth tacattccac aggtcagcta tgcctctcg	960
agcaggctgc tcagcaacaa gaatgagtac aaggccttcc tgaggaccat cccaatgat	1020
gagcaacagg ccacggccat ggccgagatc atcgagcact tccagtggaa ctgggtggga	1080
accctggcag ccgacgatga ctatggccgc ccaggcattg acaagttccg ggaggaggcc	1140
gttaagaggg acatctgtat tgacttcagt gagatgatct ctcagtacta caccagaag	1200
cagttggagt tcatcgccga cgtcatccag aactcctcgg ccaaggatcat cgtgggtcttc	1260
tccaatggcc ccgacctgga gccgctcatc caggagatag ttcggagaaa catcacgat	1320
cggatctggc tggccagcga ggcttgggccc agctcttcgc tcattgcca gccagagtac	1380
ttccacgtgg tcggcggcac catcggttc gctctcaggg cggggcgat cccagggttc	1440
aacaagttcc tgaaggaggt ccaccccagc aggtcctcgg acaatgggtt tgtcaaggag	1500
ttctgggagg agacctcaa ctgctacttc accgagaaga ccctgacgca gctgaagaat	1560

tccaaggtgc cctcgacagg accggcggct caaggggacg gctccaaggc ggggaactcc	1620
agacggacag ccctacgcca cccctgcact ggggaggaga acatcaccag cgtggagacc	1680
ccctacctgg attatacaca cctgaggatc tcctacaatg tatacgtggc cgtctactcc	1740
attgctcacg ccctgcaaga catccactct tgcaaaccgg gcaaggggcat ctttgcaaac	1800
ggatcttgtg cagatattaa aaaagttgag gcctggcagg tcctcaacca tctgctgcat	1860
ctgaagttaa ccaacagcat gggtgagcag gttgactttg acgatcaagg tgacctcaag	1920
gggaactaca ccattatcaa ctggcagctc tcgcagagg atgaatcggg gttgttccat	1980
gaggtgggca actacaacgc ctacgctaag cccagtgacc gactcaacat caacgaaaag	2040
aaaatcctct ggagtggctt ctccaaagtg gtccctttct ccaactgcag tcgagactgt	2100
gtgccgggca ccaggaaggg gatcatcgag ggggagccca cctgctgctt tgaatgcatg	2160
gcatgtgcag agggagagtt cagtgatgaa aacgatgcaa gtgcgtgtac aaagtgcccg	2220
aatgatttct ggtcgaatga gaaccacacg tcgtgcatcg ccaaggagat cgagtacctg	2280
tcgtggacgg agcccttcgg gatcgctctg accatcttcg ccgtactggg catcctgac	2340
acctccttcg tgctgggggt cttcatcaag ttcaggaaca ctcccatcgt gaaggccacc	2400
aaccgggagt tgctctacct gctgctcttc tcctcatctt gctgcttctc cagctcgctc	2460
atcttcatcg gcgagcccag ggactggacc tgtoggctcc gccaacggc ctttggcatc	2520
agcttcgtcc tgtgcatctc ctgcatcctg gtgaagacca accgggtgct gctggtcttc	2580
gaggccaaga tcccaccag cctccaccgc aagtgggtgg gcctcaacct gcagttcctc	2640
ctggctcttc tctgcatcct ggtgcaaate gtcacctgca tcatctggct ctacaccgg	2700
cctccctcca gctacaggaa ccatgagctg gaggacgagg tcattctcat cacctgagac	2760
gagggtctcg tcatggcgct gggcttctc atcggctaca cctgcctcct cgcgcctac	2820
tgcttcttct tcgccttcaa gtcccgtgag ctgcccggaga acttcaacga ggctaagtct	2880
atcaccttca gcatgttgat cttcttcatc gtctggatct ccttcatccc cgcctatgtc	2940
agcacctacg gcaagtttgt gtcggcctg gaggtgattg ccatcctggc ctccagcttc	3000
gggctgctgg gctgcattta cttcaacaag tgttacatca tcctgttcaa gccgtgccgt	3060
aacaccatcg aggaggtgcg ctgcagcacg gcggcccacg ccttcaaggt ggcgggccgg	3120
gccaccttc ggcgagcgc gcgctctcg aagcgctcca gcagcctgtg cggtccacc	3180
atctcctcgc ccgcctcgtc cacctgcggg ccgggctca ccatggagat gcagcgctgc	3240
agcacgcaga aggtcagctt cggcagcggc accgtcacc tgctcgtcag cttcgaggag	3300
acaggccgat acgccacct cagccgcacg gcccgagca ggaactcggc ggatggccgc	3360
agcggcgacg acctgccatc tagacaccac gaccagggcc cgcctcagaa atgcgagccc	3420

9/15

cagcccgcca acgatgcccg atacaaggcg gcgccgacca agggcaccct agagtgcgcg 3480
ggcggcagca aggagcgccc cacaactatg gaggaacct aatccaactc ctccatcaac 3540
cccaagaaca tcctccacgg cagcacgctc gacaactgac atcaactcct aaccggtggc 3600
tgcccaacct ctcccctctc oggcactttg cgttttgctg aagattgcag catctgcagt 3660
tccttttata cctgattttc tgacttggat atttactagt gtgcgatgga atatcacaac 3720
ataatgagtt gcacaattag gtgagcagag ttgtgtcaaa gtatctgaac tatctgaagt 3780
atctgaacta ctttattctc tcgaattgta ttacaaacat ttgaagtatt tttagtgaca 3840
ttatgttcta acattgtcaa gataatttgt tacaacatat aagggtaccac ctgaagcagt 3900
gactgagatt gccactgtga tgacagaact gttttataac atttatcatt gaaacctgga 3960
ttgcaacagg aatataatga ctgtaacaaa aaaattgttg attatcttaa aaatgcaaat 4020
tgtaatcaga tgtgtaaaat tggttaattac ttctgtacat taaatgcata tttcttgata 4080
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaagcgg cccgacagca acgg 4134

<210> 8

<211> 1027

<212> PRT

<213> Squalus acanthias

<400> 8

Met Ala Gln Leu His Cys Gln Leu Leu Phe Leu Gly Phe Thr Leu Leu
1 5 10 15

Gln Ser Tyr Asn Val Ser Gly Tyr Gly Pro Asn Gln Arg Ala Gln Lys
20 25 30

Lys Gly Asp Ile Ile Leu Gly Gly Leu Phe Pro Ile His Phe Gly Val
35 40 45

Ala Ala Lys Asp Gln Asp Leu Lys Ser Arg Pro Glu Ala Thr Lys Cys
50 55 60

Ile Arg Tyr Asn Phe Arg Gly Phe Arg Trp Leu Gln Ala Met Ile Phe
65 70 75 80

Ala Ile Glu Glu Ile Asn Asn Ser Met Thr Phe Leu Pro Asn Ile Thr
85 90 95

' 10/15

Leu Gly Tyr Arg Ile Phe Asp Thr Cys Asn Thr Val Ser Lys Ala Leu
100 105 110

Glu Ala Thr Leu Ser Phe Val Ala Gln Asn Lys Ile Asp Ser Leu Asn
115 120 125

Leu Asp Glu Phe Cys Asn Cys Ser Asp His Ile Pro Ser Thr Ile Ala
130 135 140

Val Val Gly Ala Thr Gly Ser Gly Ile Ser Thr Ala Val Ala Asn Leu
145 150 155 160

Leu Gly Leu Phe Tyr Ile Pro Gln Val Ser Tyr Ala Ser Ser Ser Arg
165 170 175

Leu Leu Ser Asn Lys Asn Glu Tyr Lys Ala Phe Leu Arg Thr Ile Pro
180 185 190

Asn Asp Glu Gln Gln Ala Thr Ala Met Ala Glu Ile Ile Glu His Phe
195 200 205

Gln Trp Asn Trp Val Gly Thr Leu Ala Ala Asp Asp Asp Tyr Gly Arg
210 215 220

Pro Gly Ile Asp Lys Phe Arg Glu Glu Ala Val Lys Arg Asp Ile Cys
225 230 235 240

Ile Asp Phe Ser Glu Met Ile Ser Gln Tyr Tyr Thr Gln Lys Gln Leu
245 250 255

Glu Phe Ile Ala Asp Val Ile Gln Asn Ser Ser Ala Lys Val Ile Val
260 265 270

Val Phe Ser Asn Gly Pro Asp Leu Glu Pro Leu Ile Gln Glu Ile Val
275 280 285

Arg Arg Asn Ile Thr Asp Arg Ile Trp Leu Ala Ser Glu Ala Trp Ala
290 295 300

Ser Ser Ser Leu Ile Ala Lys Pro Glu Tyr Phe His Val Val Gly Gly
305 310 315 320

Thr Ile Gly Phe Ala Leu Arg Ala Gly Arg Ile Pro Gly Phe Asn Lys
325 330 335

Phe Leu Lys Glu Val His Pro Ser Arg Ser Ser Asp Asn Gly Phe Val
340 345 350

11/15

Lys Glu Phe Trp Glu Glu Thr Phe Asn Cys Tyr Phe Thr Glu Lys Thr
355 360 365

Leu Thr Gln Leu Lys Asn Ser Lys Val Pro Ser His Gly Pro Ala Ala
370 375 380

Gln Gly Asp Gly Ser Lys Ala Gly Asn Ser Arg Arg Thr Ala Leu Arg
385 390 395 400

His Pro Cys Thr Gly Glu Glu Asn Ile Thr Ser Val Glu Thr Pro Tyr
405 410 415

Leu Asp Tyr Thr His Leu Arg Ile Ser Tyr Asn Val Tyr Val Ala Val
420 425 430

Tyr Ser Ile Ala His Ala Leu Gln Asp Ile His Ser Cys Lys Pro Gly
435 440 445

Thr Gly Ile Phe Ala Asn Gly Ser Cys Ala Asp Ile Lys Lys Val Glu
450 455 460

Ala Trp Gln Val Leu Asn His Leu Leu His Leu Lys Phe Thr Asn Ser
465 470 475 480

Met Gly Glu Gln Val Asp Phe Asp Asp Gln Gly Asp Leu Lys Gly Asn
485 490 495

Tyr Thr Ile Ile Asn Trp Gln Leu Ser Ala Glu Asp Glu Ser Val Leu
500 505 510

Phe His Glu Val Gly Asn Tyr Asn Ala Tyr Ala Lys Pro Ser Asp Arg
515 520 525

Leu Asn Ile Asn Glu Lys Lys Ile Leu Trp Ser Gly Phe Ser Lys Val
530 535 540

Val Pro Phe Ser Asn Cys Ser Arg Asp Cys Val Pro Gly Thr Arg Lys
545 550 555 560

Gly Ile Ile Glu Gly Glu Pro Thr Cys Cys Phe Glu Cys Met Ala Cys
565 570 575

Ala Glu Gly Glu Phe Ser Asp Glu Asn Asp Ala Ser Ala Cys Thr Lys
580 585 590

12/15

Cys Pro Asn Asp Phe Trp Ser Asn Glu Asn His Thr Ser Cys Ile Ala
595 600 605

Lys Glu Ile Glu Tyr Leu Ser Trp Thr Glu Pro Phe Gly Ile Ala Leu
610 615 620

Thr Ile Phe Ala Val Leu Gly Ile Leu Ile Thr Ser Phe Val Leu Gly
625 630 635 640

Val Phe Ile Lys Phe Arg Asn Thr Pro Ile Val Lys Ala Thr Asn Arg
645 650 655

Glu Leu Ser Tyr Leu Leu Leu Phe Ser Leu Ile Cys Cys Phe Ser Ser
660 665 670

Ser Leu Ile Phe Ile Gly Glu Pro Arg Asp Trp Thr Cys Arg Leu Arg
675 680 685

Gln Pro Ala Phe Gly Ile Ser Phe Val Leu Cys Ile Ser Cys Ile Leu
690 695 700

Val Lys Thr Asn Arg Val Leu Leu Val Phe Glu Ala Lys Ile Pro Thr
705 710 715 720

Ser Leu His Arg Lys Trp Val Gly Leu Asn Leu Gln Phe Leu Leu Val
725 730 735

Phe Leu Cys Ile Leu Val Gln Ile Val Thr Cys Ile Ile Trp Leu Tyr
740 745 750

Thr Ala Pro Pro Ser Ser Tyr Arg Asn His Glu Leu Glu Asp Glu Val
755 760 765

Ile Phe Ile Thr Cys Asp Glu Gly Ser Leu Met Ala Leu Gly Phe Leu
770 775 780

Ile Gly Tyr Thr Cys Leu Leu Ala Ala Ile Cys Phe Phe Phe Ala Phe
785 790 795 800

Lys Ser Arg Lys Leu Pro Glu Asn Phe Asn Glu Ala Lys Phe Ile Thr
805 810 815

Phe Ser Met Leu Ile Phe Phe Ile Val Trp Ile Ser Phe Ile Pro Ala
820 825 830

Tyr Val Ser Thr Tyr Gly Lys Phe Val Ser Ala Val Glu Val Ile Ala
835 840 845

13/15

Ile Leu Ala Ser Ser Phe Gly Leu Leu Gly Cys Ile Tyr Phe Asn Lys
850 855 860

Cys Tyr Ile Ile Leu Phe Lys Pro Cys Arg Asn Thr Ile Glu Glu Val
865 870 875 880

Arg Cys Ser Thr Ala Ala His Ala Phe Lys Val Ala Ala Arg Ala Thr
885 890 895

Leu Arg Arg Ser Ala Ala Ser Arg Lys Arg Ser Ser Ser Leu Cys Gly
900 905 910

Ser Thr Ile Ser Ser Pro Ala Ser Ser Thr Cys Gly Pro Gly Leu Thr
915 920 925

Met Glu Met Gln Arg Cys Ser Thr Gln Lys Val Ser Phe Gly Ser Gly
930 935 940

Thr Val Thr Leu Ser Leu Ser Phe Glu Glu Thr Gly Arg Tyr Ala Thr
945 950 955 960

Leu Ser Arg Thr Ala Arg Ser Arg Asn Ser Ala Asp Gly Arg Ser Gly
965 970 975

Asp Asp Leu Pro Ser Arg His His Asp Gln Gly Pro Pro Gln Lys Cys
980 985 990

Glu Pro Gln Pro Ala Asn Asp Ala Arg Tyr Lys Ala Ala Pro Thr Lys
995 1000 1005

Gly Thr Leu Glu Ser Pro Gly Gly Ser Lys Glu Arg Pro Thr Thr
1010 1015 1020

Met Glu Glu Thr
1025

<210> 9

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptide for antibody production

14/15

<400> 9

Ala Asp Asp Asp Tyr Gly Arg Pro Gly Ile Glu Lys Phe Arg Glu Glu
1 5 10 15

Ala Glu Glu Arg Asp Ile Cys
20

<210> 10

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptide for antibody production

<400> 10

Asp Asp Tyr Gly Arg Pro Gly Ile Glu Lys Phe Arg Glu Glu Ala Glu
1 5 10 15

Glu Arg Asp Ile Cys Ile
20

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptide for antibody production

<400> 11

Ala Arg Ser Arg Asn Ser Ala Asp Gly Arg Ser Gly Asp Asp Leu Pro
1 5 10 15

Cys

<210> 12
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer for PCR
<220>
<221> misc_feature
<223> K=T or G
Y=C or T
R=A or G

<400> 12
tgtckttggac ggagccctty ggratcgc

28

<210> 13
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer for PCR
<220>
<221> misc_feature
<223> K=T or G
R=A or G

<400> 13
ggckggratg aargakatcc aracratgaa g

31

P A T E N T K R A V

1. Metode for innprenting av fisk i vann med minst en odorant for nevnte fisk og forårsake at den innprentede fisken reagerer på nevnte odorant,
5 k a r a k t e r i s e r t v e d a t nevnte metode omfatter:
 - a) tilsetning av minst en polyvalent kationfølende reseptor (PVCR)-modulator til vannet i en mengde tilstrekkelig til å modulere ekspresjon og/eller sensitivitet av i det minste en PVCR, nevnte PVCR-modulator er en som endrer luktesansen
10 til fisken for odoranten;
 - b) tilsetning av fôr til vannet for konsumering av fisken, nevnte fôr inneholder et middel tilstrekkelig til å bidra med et betydelig øket nivå av nevnte PVCR-modulator i serum av fisken ved konsumering av fôret, hvorved fisken
15 innprentes med odoranten;
 - c) eksponering av fisken for nevnte odorant enten ved tilsetning av odoranten til fôret, eller til ferskvannet, hvorved fisken innprentes med odoranten; og
 - 20 d) tilveiebringe en kilde av nevnte odorant i vannet i hvilket fisken holdes eller overføres til, for derved å forårsake at den innprentede fisken reagerer med nevnte odorant.
2. Metode ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t fisken som
25 innprentes er en anadrom fisk.
3. Metode ifølge krav 2, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den anadrome fisken innprentes i ferskvann.
- 30 4. Metode i følge krav 3, k a r a k t e r i s e r t v e d a t metoden ytterligere inkluderer overføring av den anadrome fisken til sjøvann, hvorved nevnte kilde av odoranten er tilveiebrakt i sjøvannet og den anadrome fisken reagerer med nevnte odorant.

5. Metode ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, karakterisert ved at
- (i) fisken er laks;
 - 5 (ii) fisken er anadrom og valgt fra gruppen bestående av arktisk røye og regnbueørret; eller
 - (iii) fisken er marin fisk valgt fra gruppen bestående av torsk, hyse, lysing, kveite, makrell, pollock, sjøabbor, sverdfisk, tunfisk, vinter og sommerflyndre.
- 10 6. Metode ifølge krav 4 eller krav 5, karakterisert ved at middelet som bidrar til betydelig øket nivå av nevnte PVCR-modulator i fiskeserum er NaCl, og eventuelt hvor mengden av NaCl er mellom 10 000 mg/kg og omtrent 100 000 mg/kg.
- 15 7. Metode ifølge krav 6, karakterisert ved at tilsetning av minst en PVCR-modulator til vannet i en mengde tilstrekkelig til å modulere ekspresjon og/eller sensitivitet til minst en PVCR inkluderer å tilsette magnesium, kalsium, eller begge til ferskvannet i en mengde tilstrekkelig til å modulere ekspresjon og/eller sensitivitet av i det minst en PVCR, og eventuelt
- 20 hvor magnesium tilsettes i en mengde mellom omtrent 0,5 mM og omtrent 10,0 mM og kalsium tilsettes i en mengde mellom omtrent 2,0 mM og omtrent 10mM.
8. Metode ifølge krav 3 eller krav 7, karakterisert ved at den
- 25 ytterligere inkluderer tilsetning av minst en aminosyre til ferskvannet, eller fôret eller begge.
9. Metode ifølge krav 8, karakterisert ved at i det minste en aminosyre omfatter tryptofan.
- 30 10. Metode ifølge krav 7, karakterisert ved at en tilleggs PVCR-modulator tilsettes til ferskvannet.
11. Metode ifølge krav 7, karakterisert ved at en tilleggs PVCR-

modulator tilsettes til fôret.

12. Metode for oppdrett av fisk ved å fôre fisken i vann med minst en attraktant for nevnte fisk, k a r a k t e r i s e r t v e d a t fisken har blitt
5 innprentet i vann med attraktanten hvor nevnte metode omfatter tilsetning av fôr for fiskekonsumering til vannet, nevnte fôr inneholder nevnte attraktant og en kilde for ernæring, derved forårsakende at den innprentede fisken reagerer på attraktanten og konsumerer fôret, og hvor fisken er innprentet med attraktanten ved:
- 10
- c) tilsetning av minst en PVCR-modulator til vannet i en mengde tilstrekkelig til å modulere ekspresjon og/eller sensitivitet til minst en PVCR, nevnte PVCR-modulator er en som endrer det olfaktoriske føleapparatet til fisken for odoranten;

15

 - d) tilsetning av fôr for fiskekonsumering til vannet, nevnte fôr inneholdende en mengde av et middel tilstrekkelig til betydelig å øke nivået av nevnte PVCR-modulator i serum av fisken ved konsumering av fôret; og

20

 - e) eksponering av fisken for nevnte odorant enten ved å tilsette odoranten til fôret, eller til vannet eller til begge, hvorved fisken innprentes med odoranten.
- 25
13. Metode ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, k a r a k t e r i s e r t v e d a t fisken innprentes på larvestadiet.

1/22

```

cttggcatta tgctctgtgc tgggggtatt cttgacagca ttcgtgatgg gagtgtttat 60
caaatctcgc aacaccccaa ttgttaaggg cacaacacaga gagctatcct acctcctcct 120
gttctcactc atctgtgtgt tctccagttc cctcatcttc attggtgaac cccaggactg 180
gacatgccgt ctaogccagc ctgcattcgg gataagtttt gttctctgca tctcctgcac 240
cctggtaaaa actaaccagc tacttctagt gttcgaagcc aagatcccca ccagtctcca 300
tcgtaagtgg tgggggctaa acttgcagtt cctgttagtg ttccctgttc catttgtgca 360
agtgatgata tgtgtggtct ggctttacaa tgcctcctcc gcgagctaca ggaaccatga 420
cattgatgag ataattttca ttacatgcaa tgagggtctc atgatggcgc ttggcttcc 480
aattgggtac acatgcctgc tggcagccat atccttcttc tttgcattta aatcacgaaa 540
actgccagag aactttactg aggctaagtt catcaccttc agcatgctca tctt 594

```

```

Leu Ala Leu Cys Ser Val Leu Gly Val Phe Leu Thr Ala Phe Val Met
1 5 10 15
Gly Val Phe Ile Lys Phe Arg Asn Thr Pro Ile Val Lys Ala Thr Asn
20 25 30
Arg Glu Leu Ser Tyr Leu Leu Leu Phe Ser Leu Ile Cys Phe Ser
35 40 45
Ser Ser Leu Ile Phe Ile Gly Glu Pro Gln Asp Trp Thr Cys Arg Leu
50 55 60
Arg Gln Pro Ala Phe Gly Ile Ser Phe Val Leu Cys Ile Ser Cys Ile
65 70 75 80
Leu Val Lys Thr Asn Arg Val Leu Leu Val Phe Glu Ala Lys Ile Pro
85 90 95
Thr Ser Leu His Arg Lys Trp Trp Gly Leu Asn Leu Gln Phe Leu Leu
100 105 110
Val Phe Leu Phe Thr Phe Val Gln Val Met Ile Cys Val Val Trp Leu
115 120 125
Tyr Asn Ala Pro Pro Ala Ser Tyr Arg Asn His Asp Ile Asp Glu
130 135 140
Ile Ile Phe Ile Thr Cys Asn Glu Gly Ser Met Met Ala Leu Gly Phe
145 150 155
Leu Ile Gly Tyr Thr Cys Leu Leu Ala Ala Ile Xaa Phe Phe Phe Ala
160 165 170 175
Phe Lys Ser Arg Lys Leu Pro Glu Asn Phe Thr Glu Ala Lys Phe Ile
180 185 190
Thr Phe Ser Met Leu Ile Phe
195

```

Xaa = hvilken som helst aminosyre

FIG. 1

2/22

```

cttggcatta tgcctctgtgc tgggggtatt cttgacagca ttctgtatgg gagtgtttat 60
cagatttcgc aacaccccaa ttgttaaggc cacaacacaga gagctatcct acctcctcct 120
gttctcactc atctgtctgtt tctccagctc cctcatcttc attgggtgaa cccaggactg 180
gacatgccgt ctacgccagc ctgcattcgg gataagtttt gttctctgca tctcctgcat 240
cctgggtcaaa actaaccgag tacttctagt gttogaagcc aagatcccca ccagtctcca 300
tcgtaagtgg tgggggctaa acttgcagtt cctgttggtg ttcctgttca catttgtgca 360
agtgatgata tgtgtggtct ggctttacaa tgctcctccg gcgagctaca ggaacctga 420
cattgatgag ataattttca ttacatgcaa tgagggtctc atgatggcgc tcggcttctc 480
aattgggtac acatgcctgc tggcagccat atgcttcttc tttgcattta aatcacgaaa 540
actgccagag aactttaccg aggctaagtt catcaccttc agcatgctca tctt 594

```

```

Leu Ala Leu Cys Ser Val Leu Gly Val Phe Leu Thr Ala Phe Val Met
1 5 10 15
Gly Val Phe Ile Arg Phe Arg Asn Thr Pro Ile Val Lys Ala Thr Asn
20 25 30
Arg Glu Leu Ser Tyr Leu Leu Leu Phe Ser Leu Ile Cys Cys Phe Ser
35 40 45
Ser Ser Leu Ile Phe Ile Gly Glu Pro Gln Asp Trp Thr Cys Arg Leu
50 55 60
Arg Gln Pro Ala Phe Gly Ile Ser Phe Val Leu Cys Ile Ser Cys Ile
65 70 75 80
Leu Val Lys Thr Asn Arg Val Leu Leu Val Phe Glu Ala Lys Ile Pro
85 90 95
Thr Ser Leu His Arg Lys Trp Trp Gly Leu Asn Leu Gln Phe Leu Leu
100 105 110
Val Phe Leu Phe Thr Phe Val Gln Val Met Ile Cys Val Val Trp Leu
115 120 125
Tyr Asn Ala Pro Pro Ala Ser Tyr Arg Asn His Asp Ile Asp Glu
130 135 140
Ile Ile Phe Ile Thr Cys Asn Glu Gly Ser Met Met Ala Leu Gly Phe
145 150 155
Leu Ile Gly Tyr Thr Cys Leu Leu Ala Ala Ile Cys Phe Phe Phe Ala
160 165 170 175
Phe Lys Ser Arg Lys Leu Pro Glu Asn Phe Thr Glu Ala Lys Phe Ile
180 185 190
Thr Phe Ser Met Leu Ile Phe
195

```

Xaa = hvilken som helst aminosyre

FIG. 2

3/22

```

ttggcattat gctctgtgct ggggggtattc ttgacagtat tctgtgatggg agtgtttatc 60
agatttcgca acaccccatt tgtaaaggcc acaaacagag agctatccta cctcctcctg 120
ttctcactta totgtgtgtt ctccagctcc ctcatcttca ttgggtgaacc ccaggactgg 180
acatgccgtc taogccagcc tgcattcggg ataagttttg ttctctgcat ctctcgcac 240
ctgggtcaaaa ctaaccgagt acttctagtg ttggaagcaa agatcccccac cagtctccat 300
cgtaagtggg ggggggctaaa cttgcagttc ctgttggtgt tccgtgtcac atttgtgcaa 360
gtgatgatat gtgtgggtctg gctttacaat gctcctccgg cgagctacag gaaccatgac 420
attgatgaga tcattttcat tacatgcaat gagggctcta tgatggcgct tggcttcta 480
attgggtaca catgctgtct ggcagccata tgcctttctt ttgcatttaa atcacgaaaa 540
ctgccagaga attttaccga ggctaagttc atcaccttca gcctgctcat ctt 593

```

```

Leu Ala Leu Cys Ser Val Leu Gly Val Phe Leu Thr Val Phe Val Met
 1          5          10          15
Gly Val Phe Ile Arg Phe Arg Asn Thr Pro Ile Val Lys Ala Thr Asn
 20          25          30
Arg Glu Leu Ser Tyr Leu Leu Leu Phe Ser Leu Ile Cys Cys Phe Ser
 35          40          45
Ser Ser Leu Ile Phe Ile Gly Glu Pro Gln Asp Trp Thr Cys Arg Leu
 50          55          60
Arg Gln Pro Ala Phe Gly Ile Ser Phe Val Leu Cys Ile Ser Cys Ile
 65          70          75          80
Leu Val Lys Thr Asn Arg Val Leu Leu Val Phe Glu Ala Lys Ile Pro
 85          90          95
Thr Ser Leu His Arg Lys Trp Trp Gly Leu Asn Leu Gln Phe Leu Leu
100          105          110
Val Phe Leu Phe Thr Phe Val Gln Val Met Ile Cys Val Val Trp Leu
115          120          125
Tyr Asn Ala Pro Pro Ala Ser Tyr Arg Asn His Asp Ile Asp Glu
130          135          140
Ile Ile Phe Ile Thr Cys Asn Glu Gly Ser Met Met Ala Leu Gly Phe
145          150          155
Leu Ile Gly Tyr Thr Cys Leu Leu Ala Ala Ile Cys Phe Phe Phe Ala
160          165          170          175
Phe Lys Ser Arg Lys Leu Pro Glu Asn Phe Thr Glu Ala Lys Phe Ile
180          185          190
Thr Phe Ser Met Leu Ile Phe
195

```

Xaa = hvilken som helst aminosyre

FIG. 3

4/22

aattccgttg ctgtcgggttc agtccaagtc .tccocagtg caaaatgaga aatgggtggtc 60
 gccattacag gaacatgcac tacatctgtg ttaatgaaat attgtcagtt atctgaagggt 120
 tattaaaatg tttctgcaag gatggcttca cgagaaatca attctgcacg tttccatt 180
 gtcattgtat gaataactga ccaaagggat gtaacaaaat ggaacaaagc tgaggaccac 240
 gttcacccctt tcttgagca tacgatcaac cctgaaggag atggaagact tgaggaggaa 300
 atggggattg atcttcagg agttctgtg taaagcgatc cctcaccatt acaaagataa 360
 gcagaaatcc tccaggcatc ctctgtaaac gggctggcgt agtgtggctt ggtcaaggaa 420
 cagagacagg gctgcaca atg gct cag ctt cac tgc caa ctc tta ttc ttg 471
 Met Ala Gln Leu His Cys Gln Leu Leu Phe Leu
 1 5 10

gga ttt aca ctc cta cag tgc tac aat gtc tca ggg tat ggt oca aac 519
 Gly Phe Thr Leu Gln Ser Tyr Asn Val Ser Gly Tyr Gly Pro Asn
 15 20 25

caa agg gcc cag aag aaa gga gac atc ata ctg gga ggt ctc ttc oca 567
 Gln Arg Ala Gln Lys Lys Gly Asp Ile Ile Leu Gly Gly Leu Phe Pro
 30 35 40

ata cac ttt gga gta gcc gcc aag gat cag gac tta aaa tgc aga ccg 615
 Ile His Phe Gly Val Ala Ala Lys Asp Gln Asp Leu Lys Ser Arg Pro
 45 50 55

gag gcg aca aaa tgt att cgg tac aat ttt oga ggc ttc oga tgg ctc 663
 Glu Ala Thr Lys Cys Ile Arg Tyr Asn Phe Arg Gly Phe Arg Trp Leu
 60 65 70 75

cag gcg atg ata ttc gca att gaa gag att aac aac agt atg act ttc 711
 Gln Ala Met Ile Phe Ala Ile Glu Glu Ile Asn Asn Ser Met Thr Phe
 80 85 90

ctg ccc aat atc acc ctg gga tat cgc ata ttt gac acg tgt aac acc 759
 Leu Pro Asn Ile Thr Leu Gly Tyr Arg Ile Phe Asp Thr Cys Asn Thr
 95 100 105

gtg tcc aag gcg cta gag gca aca ctc agc ttt gtg gcc cag aac aaa 807
 Val Ser Lys Ala Leu Glu Ala Thr Leu Ser Phe Val Ala Gln Asn Lys
 110 115 120

atc gac tgc ctg aac tta gat gag ttc tgt aac tgc tct gac cat atc 855
 Ile Asp Ser Leu Asn Leu Asp Glu Phe Cys Asn Cys Ser Asp His Ile
 125 130 135

cca tcc aca ata gca gtg gtc ggg gca acc ggg tca gga atc tcc acc 903
 Pro Ser Thr Ile Ala Val Val Gly Ala Thr Gly Ser Gly Ile Ser Thr
 140 145 150 155

gct gtg gcc aat cta ttg gga tta ttt tac att cca cag gtc agc tat 951
 Ala Val Ala Asn Leu Leu Gly Leu Phe Tyr Ile Pro Gln Val Ser Tyr
 160 165 170

gcc tcc tgc agc agg ctg ctc agc aac aag aat gag tac aag gcc ttc 999
 Ala Ser Ser Ser Arg Leu Leu Ser Asn Lys Asn Glu Tyr Lys Ala Phe
 175 180 185

ctg agg acc atc ccc aat gat gag caa cag gcc acg gcc atg gcc gag 1047
 Leu Arg Thr Ile Pro Asn Asp Glu Gln Gln Ala Thr Ala Met Ala Glu
 190 195 200

FIG. 4A.

5/22

atc atc gag cac ttc cag tgg aac tgg gtg gga acc ctg gca gcc gac Ile Ile Glu His Phe Gln Trp Asn Trp Val Gly Thr Leu Ala Ala Asp 205 210 215	1095
gat gac tat ggc cgc cca ggc att gac aag ttc cgg gag gag gcc gtt Asp Asp Tyr Gly Arg Pro Gly Ile Asp Lys Phe Arg Glu Glu Ala Val 220 225 230 235	1143
aag agg gac atc tgt att gac ttc agt gag atg atc tct cag tac tac Lys Arg Asp Ile Cys Ile Asp Phe Ser Glu Met Ile Ser Gln Tyr Tyr 240 245 250	1191
acc cag aag cag ttg gag ttc atc gcc gac gtc atc cag aac tcc tcc Thr Gln Lys Gln Leu Glu Phe Ile Ala Asp Val Ile Gln Asn Ser Ser 255 260 265	1239
gcc aag gtc atc gtg gtc ttc tcc aat ggc ccc gac ctg gag ccg ctc Ala Lys Val Ile Val Val Phe Ser Asn Gly Pro Asp Leu Glu Pro Leu 270 275 280	1287
atc cag gag ata gtt cgg aga aac atc acc gat cgg atc tgg ctg gcc Ile Gln Glu Ile Val Arg Arg Asn Ile Thr Asp Arg Ile Trp Leu Ala 285 290 295	1335
agc gag gct tgg gcc agc tct tcc ctc att gcc aag cca gag tac ttc Ser Glu Ala Trp Ala Ser Ser Ser Leu Ile Ala Lys Pro Glu Tyr Phe 300 305 310 315	1383
cac gtg gtc ggc ggc acc atc ggc ttc gct ctc agg gcg ggg cgt atc His Val Val Gly Gly Thr Ile Gly Phe Ala Leu Arg Ala Gly Arg Ile 320 325 330	1431
cca ggg ttc aac aag ttc ctg aag gag gtc cac ccc agc agg tcc tcc Pro Gly Phe Asn Lys Phe Leu Lys Glu Val His Pro Ser Arg Ser Ser 335 340 345	1479
gac aat ggg ttt gtc aag gag ttc tgg gag gag acc ttc aac tgc tac Asp Asn Gly Phe Val Lys Glu Phe Trp Glu Glu Thr Phe Asn Cys Tyr 350 355 360	1527
ttc acc gag aag acc ctg acg cag ctg aag aat tcc aag gtg ccc tcc Phe Thr Glu Lys Thr Leu Thr Gln Leu Lys Asn Ser Lys Val Pro Ser 365 370 375	1575
cac gga ccg gcg gct caa ggg gac ggc tcc aag gcg ggg aac tcc aga His Gly Pro Ala Ala Gln Gly Asp Gly Ser Lys Ala Gly Asn Ser Arg 380 385 390 395	1623
cgg aca gcc cta cgc cac ccc tgc act ggg gag gag aac atc acc agc Arg Thr Ala Leu Arg His Pro Cys Thr Gly Glu Glu Asn Ile Thr Ser 400 405 410	1671
gtg gag acc ccc tac ctg gat tat aca cac ctg agg atc tcc tac aat Val Glu Thr Pro Tyr Leu Asp Tyr Thr His Leu Arg Ile Ser Tyr Asn 415 420 425	1719
gta tac gtg gcc gtc tac tcc att gct cac gcc ctg caa gac atc cac Val Tyr Val Ala Val Tyr Ser Ile Ala His Ala Leu Gln Asp Ile His 430 435 440	1767

FIG. 4B

6/22

tct tgc aaa ccc ggc acg ggc atc ttt gca aac gga tct tgt gca gat Ser Cys Lys Pro Gly Thr Gly Ile Phe Ala Asn Gly Ser Cys Ala Asp 445 450 455	1815
att aaa aaa gtt gag gcc tgg cag gtc ctc aac cat ctg ctg cat ctg Ile Lys Lys Val Glu Ala Trp Gln Val Leu Asn His Leu Leu His Leu 460 465 470 475	1863
aag ttt acc aac agc atg ggt gag cag gtt gac ttt gac gat caa ggt Lys Phe Thr Asn Ser Met Gly Glu Gln Val Asp Phe Asp Asp Gln Gly 480 485 490	1911
gac ctc aag ggg aac tac acc att atc aac tgg cag ctc tcc gca gag Asp Leu Lys Gly Asn Tyr Thr Ile Ile Asn Trp Gln Leu Ser Ala Glu 495 500 505	1959
gat gaa tgc gtg ttg ttc cat gag gtg ggc aac tac aac gcc tac gct Asp Glu Ser Val Leu Phe His Glu Val Gly Asn Tyr Asn Ala Tyr Ala 510 515 520	2007
aag ccc agt gac cga ctc aac atc aac gaa aag aaa atc ctc tgg agt Lys Pro Ser Asp Arg Leu Asn Ile Asn Glu Lys Lys Ile Leu Trp Ser 525 530 535	2055
ggc ttc tcc aaa gtg gtt cct ttc tcc aac tgc agt cga gac tgt gtg Gly Phe Ser Lys Val Val Pro Phe Ser Asn Cys Ser Arg Asp Cys Val 540 545 550 555	2103
cgc ggc acc agg aag ggg atc atc gag ggg gag ccc acc tgc tgc ttt Pro Gly Thr Arg Lys Gly Ile Ile Glu Gly Glu Pro Thr Cys Cys Phe 560 565 570	2151
gaa tgc atg gca tgt gca gag gga gag ttc agt gat gaa aac gat gca Glu Cys Met Ala Cys Ala Glu Gly Glu Phe Ser Asp Glu Asn Asp Ala 575 580 585	2199
agt gcg tgt aca aag tgc ccg aat gat ttc tgg tgc aat gag aac cac Ser Ala Cys Thr Lys Cys Pro Asn Asp Phe Trp Ser Asn Glu Asn His 590 595 600	2247
acg tgc tgc atc gcc aag gag atc gag tac ctg tgc tgg acg gag ccc Thr Ser Cys Ile Ala Lys Glu Ile Glu Tyr Leu Ser Trp Thr Glu Pro 605 610 615	2295
ttc ggg atc gct ctg acc atc ttc gcc gta ctg ggc atc ctg atc acc Phe Gly Ile Ala Leu Thr Ile Phe Ala Val Leu Gly Ile Leu Ile Thr 620 625 630 635	2343
tcc ttc gtg ctg ggg gtc ttc atc aag ttc agg aac act ccc atc gtg Ser Phe Val Leu Gly Val Phe Ile Lys Phe Arg Asn Thr Pro Ile Val 640 645 650	2391
aag gcc acc aac cgg gag ttg tcc tac ctg ctg ctc ttc tcc ctc atc Lys Ala Thr Asn Arg Glu Leu Ser Tyr Leu Leu Leu Phe Ser Leu Ile 655 660 665	2439
tgc tgc ttc tcc agc tgc ctc atc ttc atc ggc gag ccc agg gac tgg Cys Cys Phe Ser Ser Ser Leu Ile Phe Ile Gly Glu Pro Arg Asp Trp 670 675 680	2487

FIG. 4C

7/22

acc tgt cgg ctc cgc caa ccg gcc ttt ggc atc agc ttc gtc ctg tgc Thr Cys Arg Leu Arg Gln Pro Ala Phe Gly Ile Ser Phe Val Leu Cys 685 690 695	2535
atc tcc tgc atc ctg gtg aag acc aac cgg gtg ctg ctg gtc ttc gag Ile Ser Cys Ile Leu Val Lys Thr Asn Arg Val Leu Leu Val Phe Glu 700 705 710 715	2583
gcc aag atc ccc acc agc ctc cac cgc aag tgg gtg ggc ctc aac ctg Ala Lys Ile Pro Thr Ser Leu His Arg Lys Trp Val Gly Leu Asn Leu 720 725 730	2631
cag ttc ctc ctg gtc ttc ctc tgc atc ctg gtg caa atc gtc acc tgc Gln Phe Leu Leu Val Phe Leu Cys Ile Leu Val Gln Ile Val Thr Cys 735 740 745	2679
atc atc tgg ctc tac acc gcg cct ccc tcc agc tac agg aac cat gag Ile Ile Trp Leu Tyr Thr Ala Pro Pro Ser Ser Tyr Arg Asn His Glu 750 755 760	2727
ctg gag gac gag gtc atc ttc atc acc tgc gac gag ggc tgc ctc atg Leu Glu Asp Glu Val Ile Phe Ile Thr Cys Asp Glu Gly Ser Leu Met 765 770 775	2775
gcg ctg ggc ttc ctc atc ggc tac acc tgc ctc ctc gcc gcc atc tgc Ala Leu Gly Phe Leu Ile Gly Tyr Thr Cys Leu Leu Ala Ala Ile Cys 780 785 790 795	2823
ttc ttc ttc gcc ttc aag tcc cgt aag ctg ccg gag aac ttc aac gag Phe Phe Phe Ala Phe Lys Ser Arg Lys Leu Pro Glu Asn Phe Asn Glu 800 805 810	2871
gct aag ttc atc acc ttc agc atg ttg atc ttc ttc atc gtc tgg atc Ala Lys Phe Ile Thr Phe Ser Met Leu Ile Phe Phe Ile Val Trp Ile 815 820 825	2919
tcc ttc atc ccc gcc tat gtc agc acc tac ggc aag ttt gtg tgc gcc Ser Phe Ile Pro Ala Tyr Val Ser Thr Tyr Gly Lys Phe Val Ser Ala 830 835 840	2967
gtg gag gtg att gcc atc ctg gcc tcc agc ttc ggg ctg ctg gcc tgc Val Glu Val Ile Ala Ile Leu Ala Ser Ser Phe Gly Leu Leu Gly Cys 845 850 855	3015
att tac ttc aac aag tgt tac atc atc ctg ttc aag ccg tgc cgt aac Ile Tyr Phe Asn Lys Cys Tyr Ile Ile Leu Phe Lys Pro Cys Arg Asn 860 865 870 875	3063
acc atc gag gag gtg cgc tgc agc acg gcg gcc cac gcc ttc aag gtg Thr Ile Glu Glu Val Arg Cys Ser Thr Ala Ala His Ala Phe Lys Val 880 885 890	3111
gcg gcc cgg gcc acc ctc cgg cgc agc gcc gcg tct cgc aag cgc tcc Ala Ala Arg Ala Thr Leu Arg Arg Ser Ala Ala Ser Arg Lys Arg Ser 895 900 905	3159
agc agc ctg tgc ggc tcc acc atc tcc tgc ccc gcc tgc tcc acc tgc Ser Ser Leu Cys Gly Ser Thr Ile Ser Ser Pro Ala Ser Ser Thr Cys 910 915 920	3207

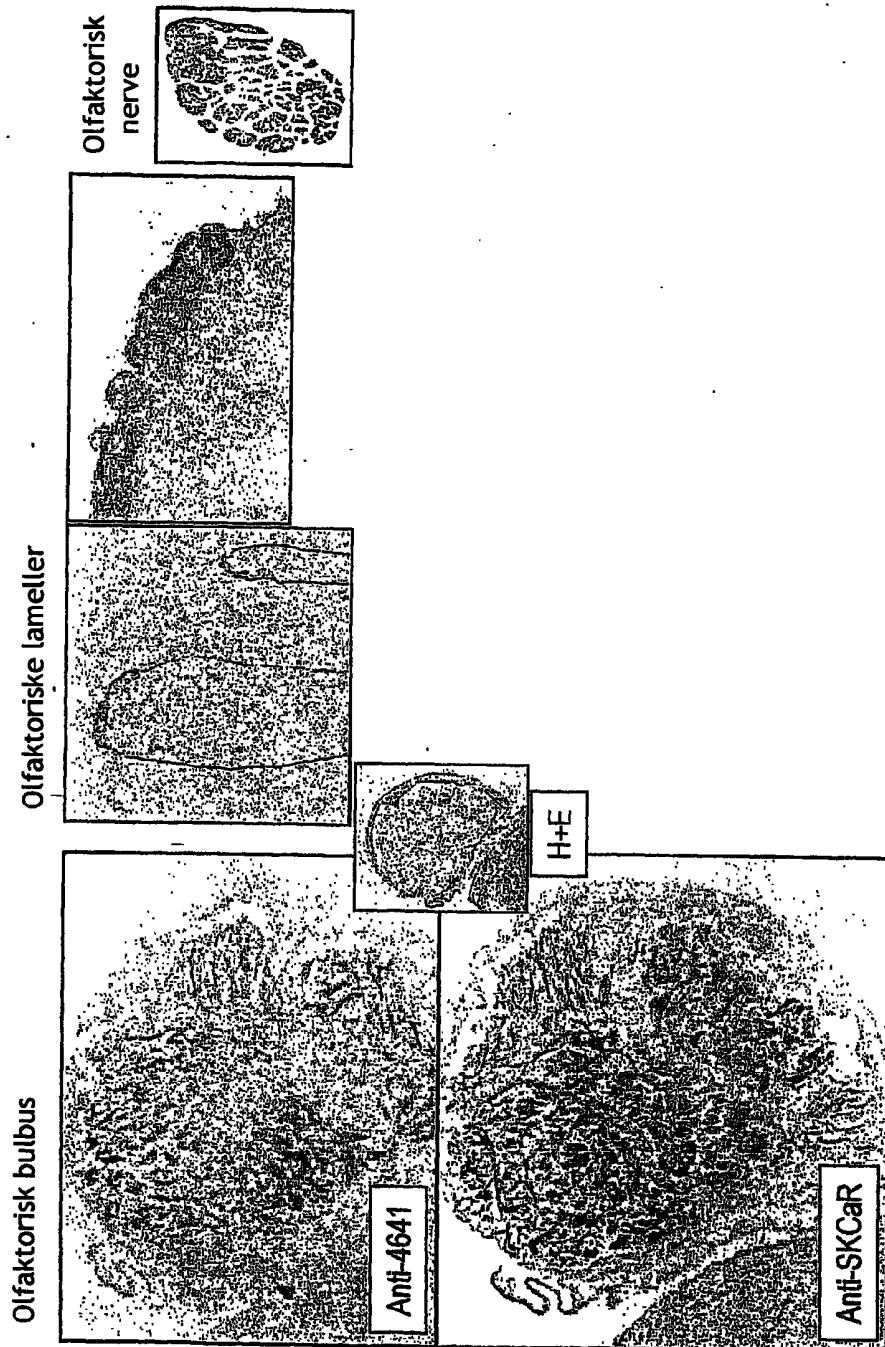
FIG. 4D

8/22

ggg ccg ggc ctc acc atg gag atg cag cgo tgc agc acg cag aag gtc	3255
Gly Pro Gly Leu Thr Met Glu Met Gln Arg Cys Ser Thr Gln Lys Val	
925 930 935	
agc ttc ggc agc ggc acc gtc acc ctg tgc ctc agc ttc gag gag aca	3303
Ser Phe Gly Ser Gly Thr Val Thr Leu Ser Leu Ser Phe Glu Glu Thr	
940 945 950 955	
ggc cga tac gcc acc ctc agc cgc acg gcc cgc agc agg aac tgc gcc	3351
Gly Arg Tyr Ala Thr Leu Ser Arg Thr Ala Arg Ser Arg Asn Ser Ala	
960 965 970	
gat ggc cgc agc ggc gac gac ctg cca tct aga cac cac gac cag gcc	3399
Asp Gly Arg Ser Gly Asp Asp Leu Pro Ser Arg His His Asp Gln Gly	
975 980 985	
ccg cct cag aaa tgc gag ccc cag ccc gcc aac gat gcc cga tac aag	3447
Pro Pro Gln Lys Cys Glu Pro Gln Pro Ala Asn Asp Ala Arg Tyr Lys	
990 995 1000	
gcc gcc ccg acc aag ggc acc cta gag tgc ccg ggc ggc agc aag gag	3495
Ala Ala Pro Thr Lys Gly Thr Leu Glu Ser Pro Gly Gly Ser Lys Glu	
1005 1010 1015	
cgc ccc aca act atg gag gaa acc taa tccaaactcct ccatcaaccc	3542
Arg Pro Thr Thr Met Glu Glu Thr *	
1020 1025	
caagaacatc ctccacggca gcaccgtcga caactgacat caactcctaa ccggtggctg	3602
cccaaactct cccctctccg gcactttgcg ttttgtgaa gattgcagca tctgcagttc	3662
cttttatccc tgattttctg acttggatat ttactagtgt gcgatggaat atcacaacat	3722
aatgagttgc acaattaggt gagcagagtt gtgtcaaagt atctgaaacta tctgaagtat	3782
ctgaactact ttattctctc gaattgtatt acaaacattt gaagtatttt tagtgacatt	3842
atgttctaac attgtcaaga taatttgta caacatataa ggtaccacot gaagcagtga	3902
ctgagattgc cactgtgatg acagaactgt tttataacat ttatcattga aacctggatt	3962
gcaacaggaa tataatgact gtaacaaaaa aattgttgat tatcttaaaa atgcaaattg	4022
taatcagatg tgtaaaattg gtaattactt ctgtacattt aatgcatatt tcttgataaa	4082
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaagcggcc cgacagcaac gg	4134

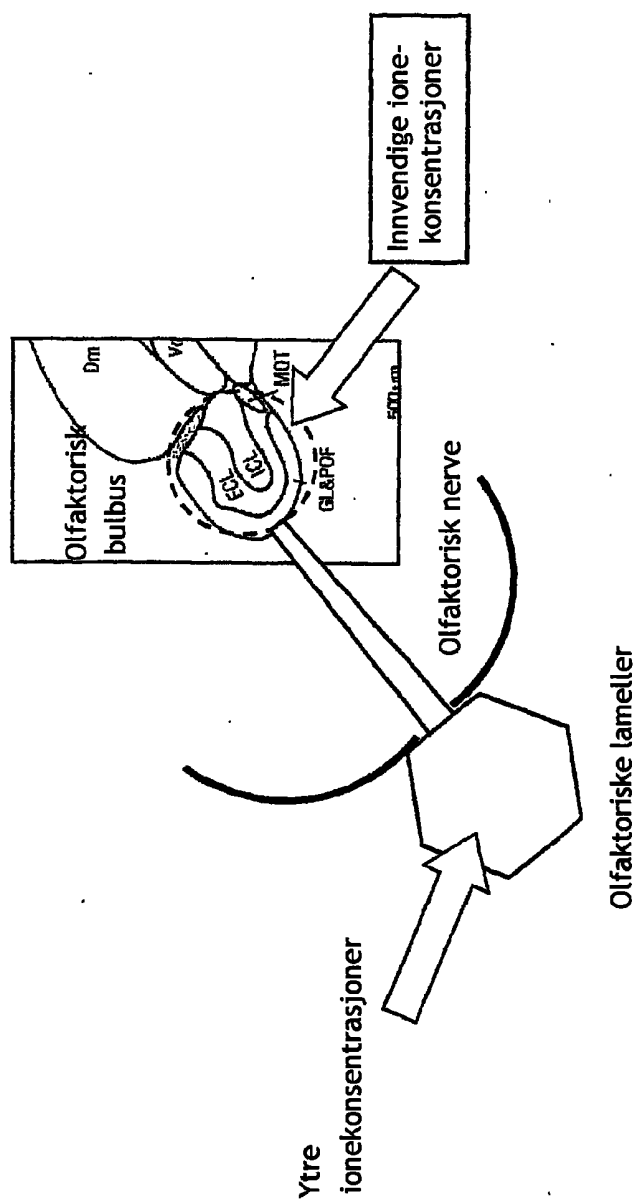
FIG. 4E

FIG. 5



10/22

FIG. 6



11/22

FIG. 7

Panel A



Panel B

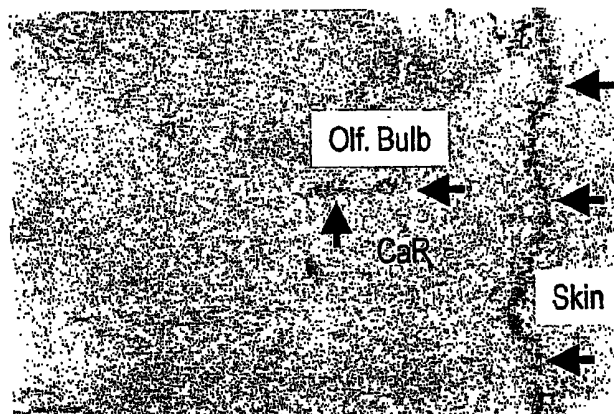


FIG. 8

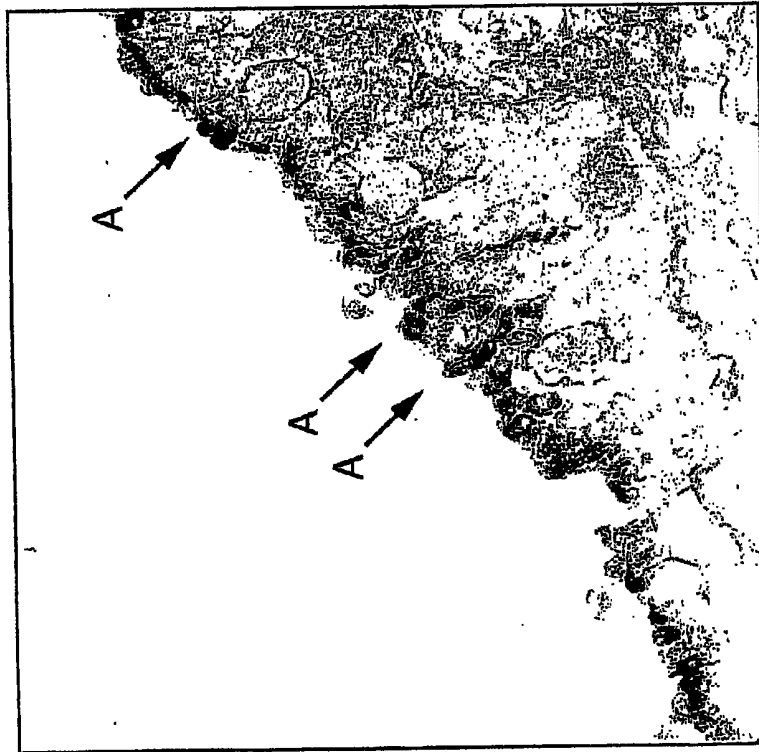
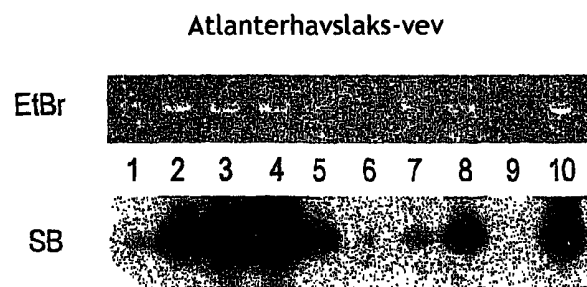
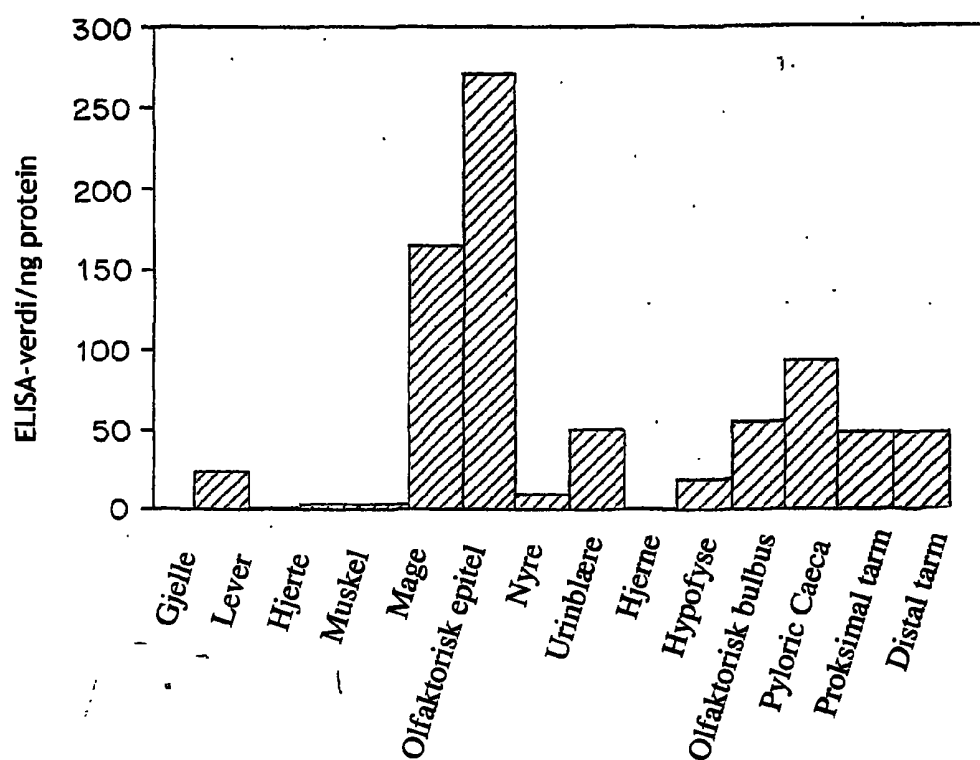


FIG. 9



14/22



Vevprøver fra en enkel fisk

FIG. 10

15/22

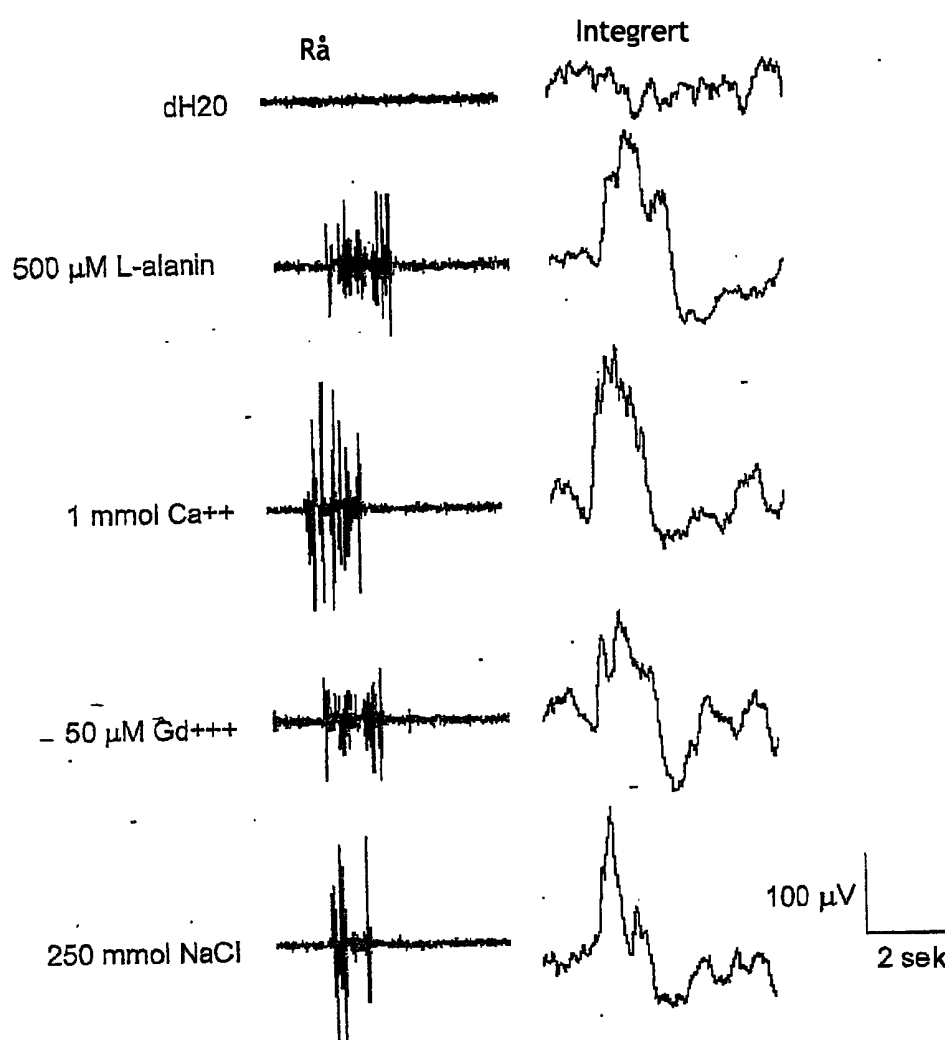


FIG. 11

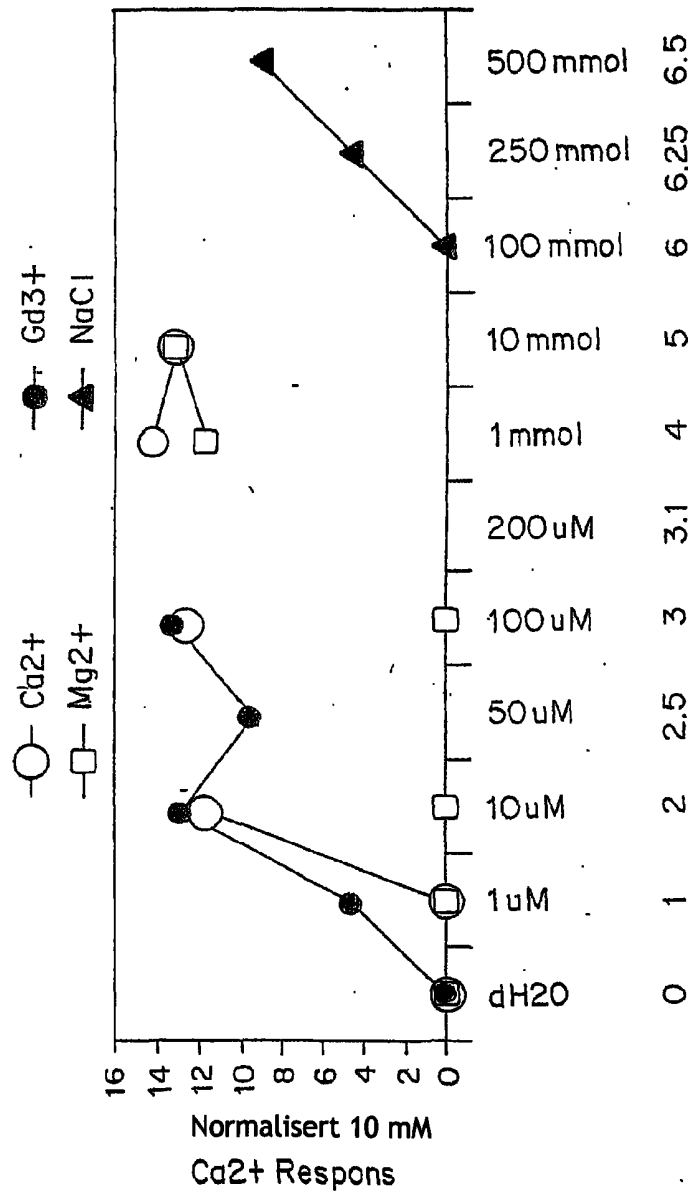


FIG. 12A

17/22

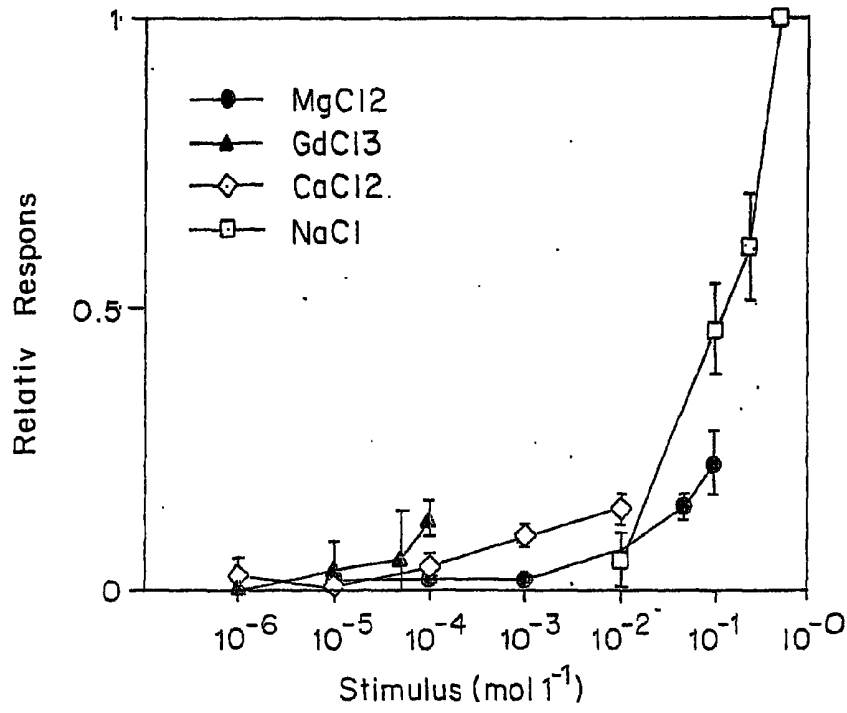


FIG. 12B

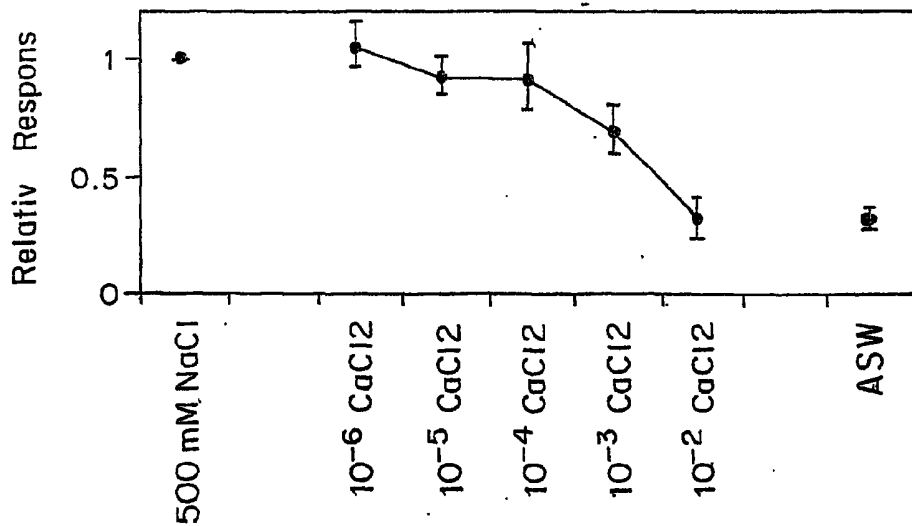


FIG. 12C

18/22

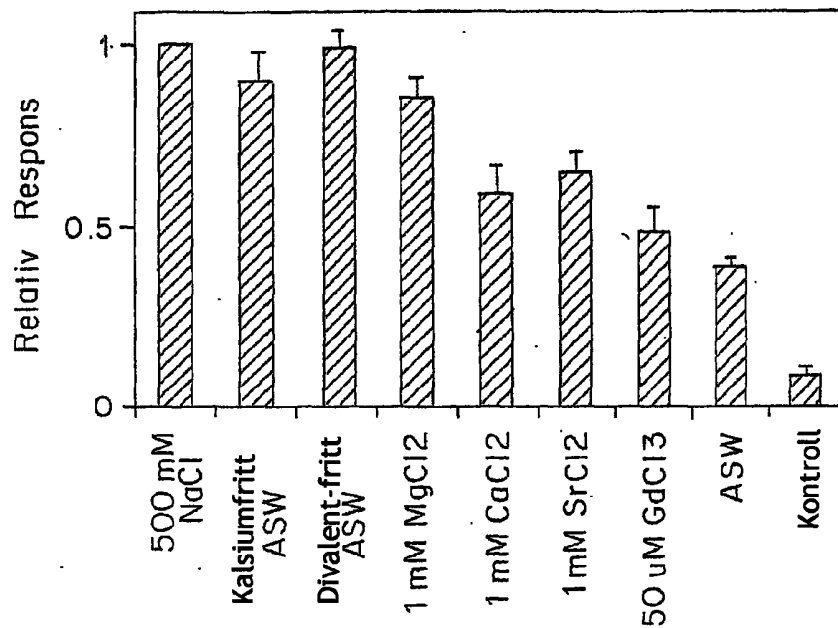


FIG. 12D

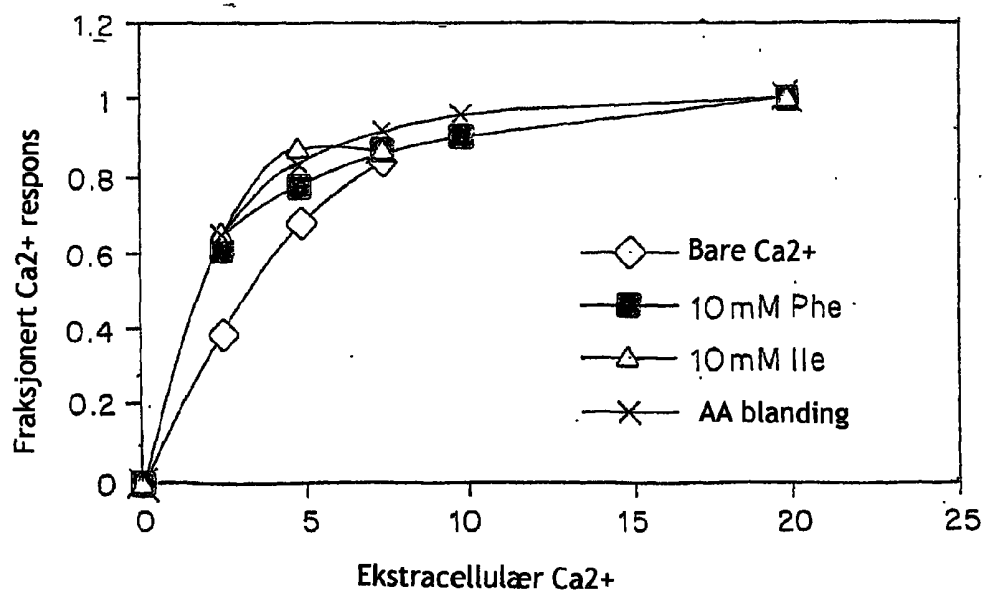
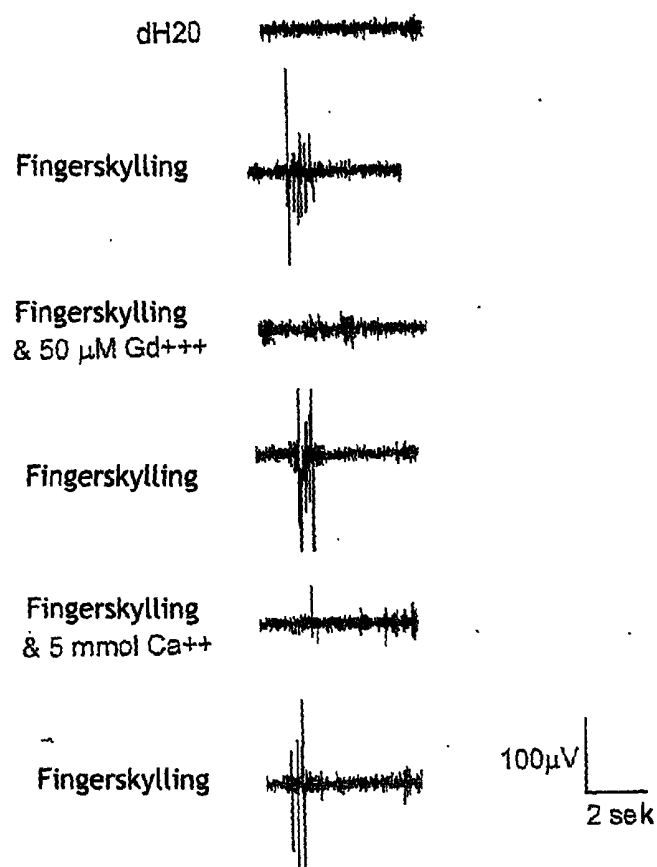


FIG. 16

19/22



Repetert stimulering av preparering
med enkel kontinuerlig registrering

FIG. 13

20/22

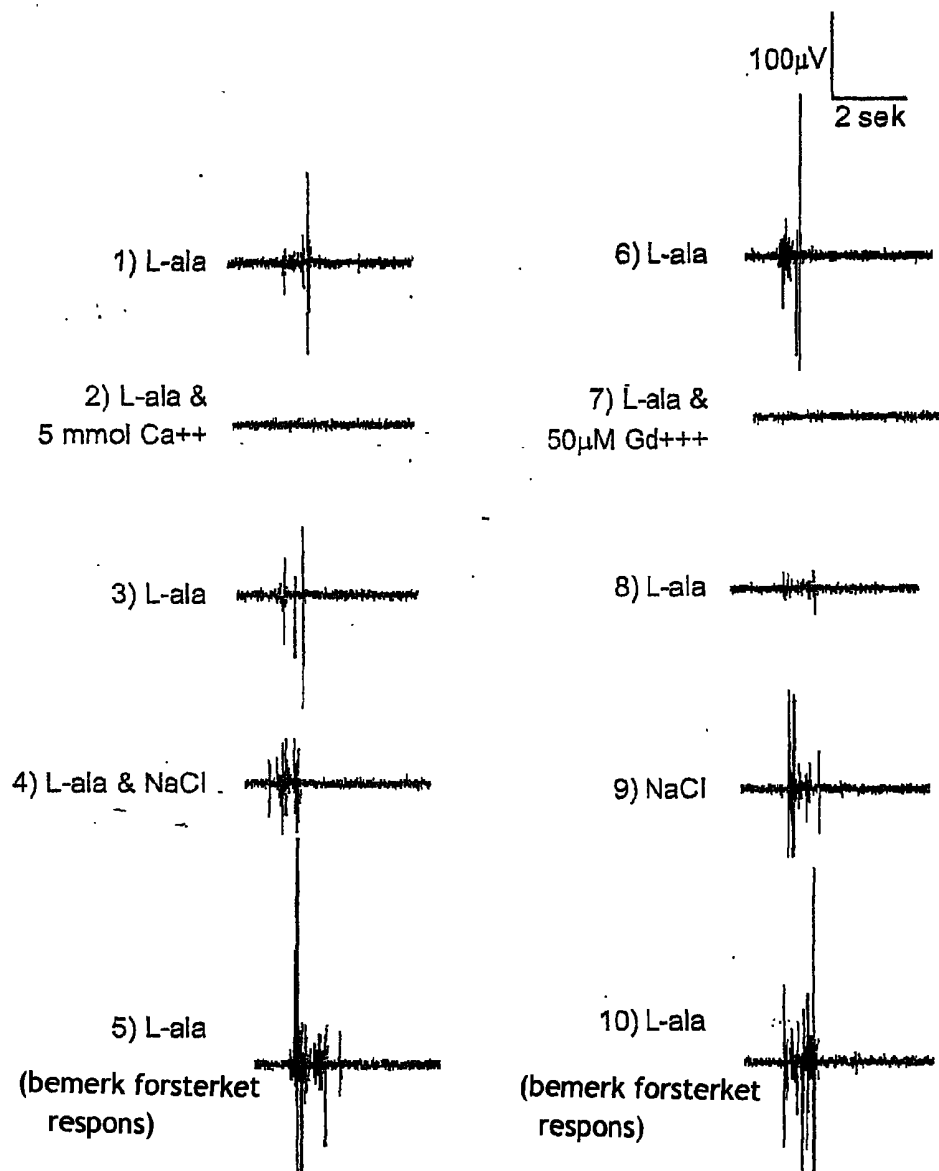


FIG. 14

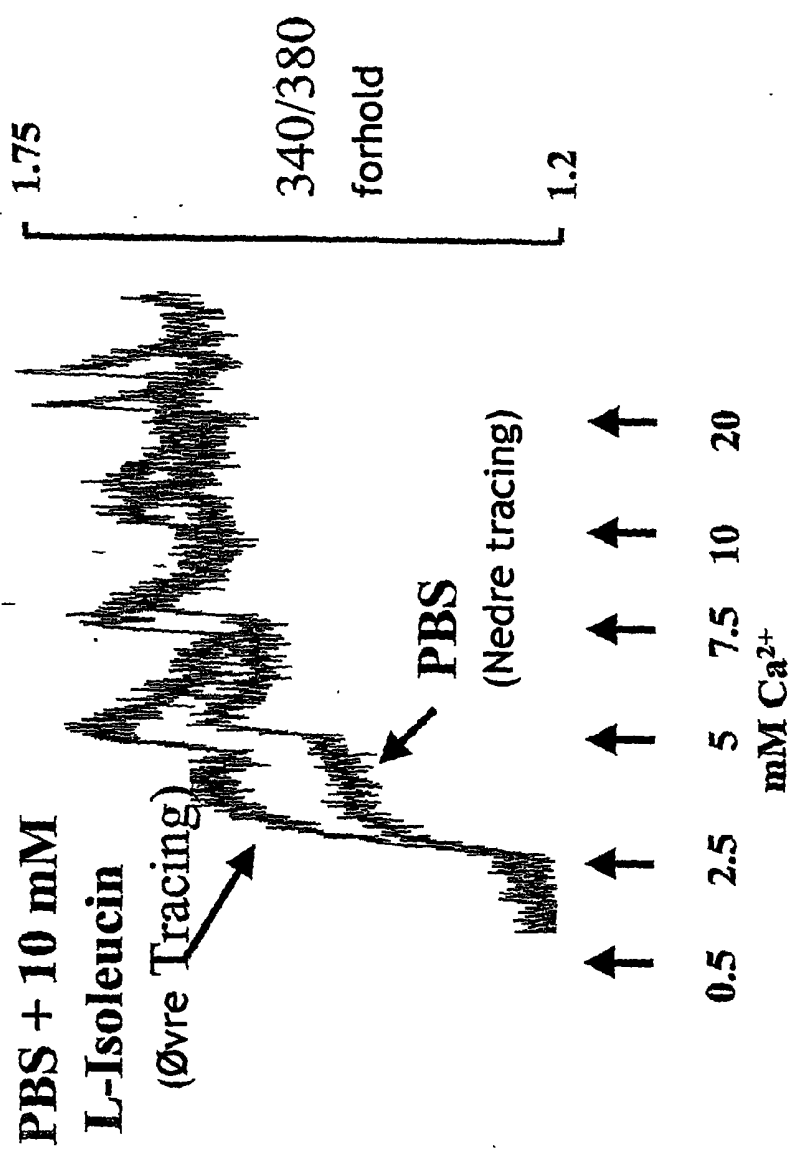


FIG. 15

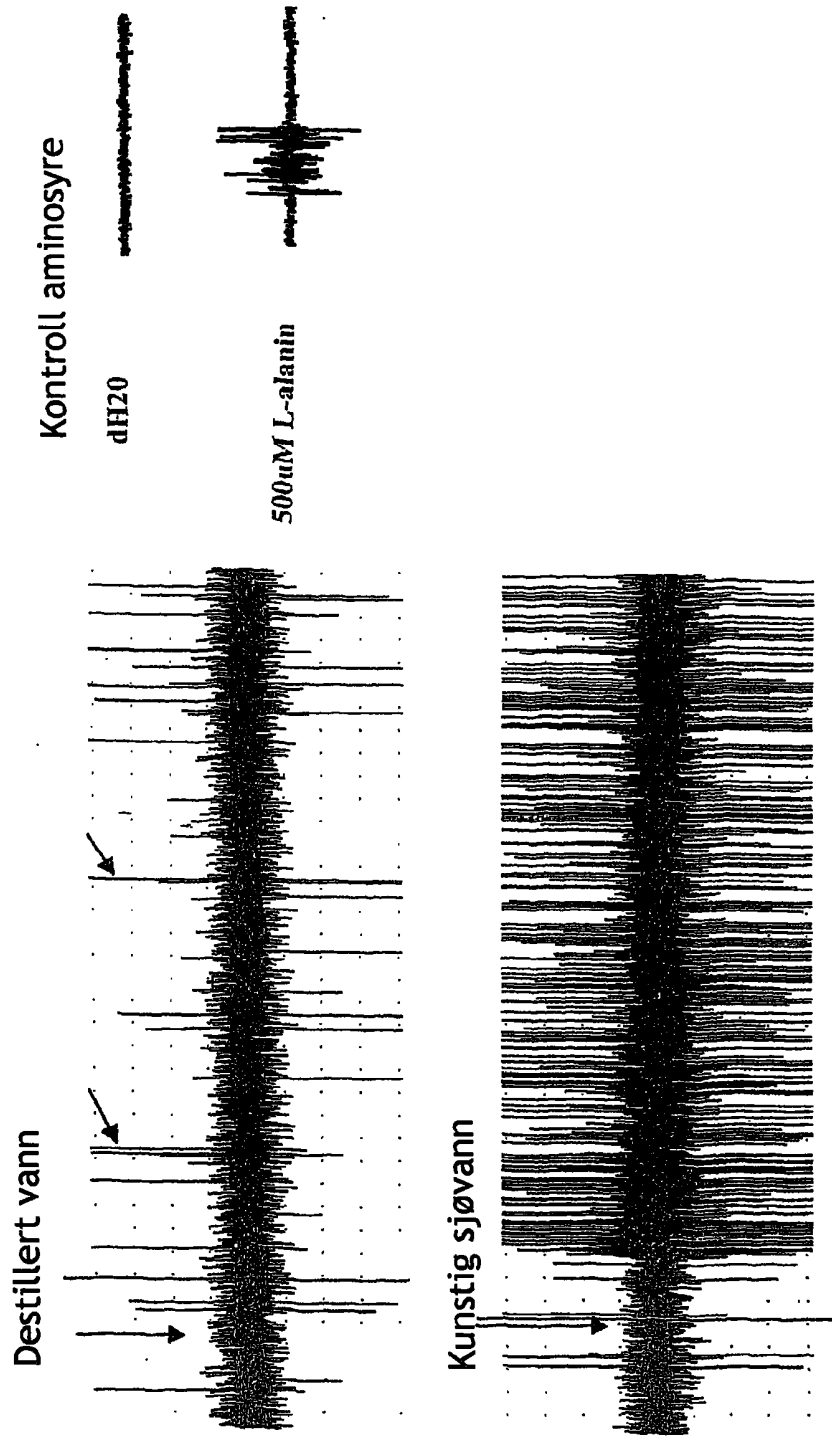


Fig. 17