

Molekylærbiologisk deteksjon av genmodifisert sebrafisk (GloFish)

*Linda Emanuelsen
Ragnhild Bleken Rud
Knut G. Berdal
Arne Holst-Jensen*





Veterinærinstituttets rapportserie · 18 - 2009

Tittel

Molekylærbiologisk deteksjon av genmodifisert sebrafisk (GloFish)

Publisert av

Veterinærinstituttet · Pb. 750 Sentrum · 0106 Oslo

Form: Graf AS

Hanne Mari Jordsmyr, Veterinærinstituttet

Forsidefoto: GloFish fotografert i normalt lys

(kilde: www.glofish.com)

Bestilling

kommunikasjon@vetinst.no

Faks: 23 21 60 01

Tel: 23 21 63 66

ISSN 1890-3290 elektronisk utgave

Forslag til sitering:

Emanuelsen L., Rud, RB, Berdal KG, Holst-Jensen A. Molekylærbiologisk deteksjon av genmodifisert sebrafisk (GloFish). Veterinærinstituttets rapportserie 18-2009. Oslo: Veterinærinstituttet; 2009.

© Veterinærinstituttet

Kopiering tillatt når kilde gjengis



Veterinærinstituttets rapportserie
National Veterinary Institute's Report Series
Rapport 18 · 2009

Molekylærbiologisk deteksjon av genmodifisert sebrafisk (GloFish)

Forfattere

Linda Emanuelsen

Ragnhild Bleken Rud

Knut G. Berdal

Arne Holst-Jensen

15. desember 2009

ISSN 1890-3290 elektronisk utgave



Veterinærinstituttet
National Veterinary Institute

Innhold

1. Sammendrag	5
Bakgrunn og oppdrag.....	5
Metode og materiale.....	5
Resultater.....	5
2. Introduksjon	7
3. Materiale og metoder	10
3.1. Sebrafisk og referansematerialer.....	10
3.2. Prøveopparbeiding og DNA isolering.....	11
3.3. Primere og prober for PCR.....	11
3.4. PCR betingelser.....	13
3.5. Beregning av kopitall for målsekvensene og tillaging av standardløsninger for kvantitativ PCR.....	14
4. Resultater	14
4.1. Metodeutvikling og -etablering.....	14
4.2. Analyser av akvariefisk.....	17
5. Diskusjon	18
5.1. PCR metoder.....	18
5.2. Genmodifisert fisk internasjonalt og i Norge.....	19
6. Referanser	20

1. Sammendrag

Bakgrunn og oppdrag

Genmodifisert akvariefisk er utviklet og omsettes kommersielt i flere land. Den best kjente er en type sebrafisk (*Danio rerio*) som er tilført et gen som gjør den selvlysende (GloFish). Det finnes flere varianter av sebrafisk med gener som gjør dem selvlysende grønne, gule, oransje eller røde. Ingen genmodifiserte akvariefisk er tillatt i Norge, og Direktoratet for naturforvaltning har derfor ønsket å få etablert metoder for å kunne kontrollere om GloFish eller andre tilsvarende typer av akvariefisk er innført og eventuelt omsettes i Norge.

Veterinærinstituttet er nasjonalt referanselaboratorium for genmodifisert mat og fôr. Direktoratet for naturforvaltning rettet høsten 2008 en forespørsel til Veterinærinstituttet om muligheten for å få på plass egnede analysemetoder for genmodifisert sebrafisk. Kontrakt for prosjektet ble inngått og prosjektet ble gjennomført i løpet av 2009 med finansiering fra Direktoratet for naturforvaltning.

Prosjektets formål var:

- Å utvikle metode for å påvise genmodifisert sebrafisk med innsatt gen for grønt fluoreserende protein (GFP) og rødt fluoreserende protein (RFP).
- Innhente og analysere et lite antall sebrafisk fra norske dyrebutikker.

Metode og materiale

Sanntids polymerase kjede reaksjon (real-time PCR) er den teknikken som oftest brukes for å påvise genmodifisert materiale ved Veterinærinstituttet og andre europeiske analyselaboratorier. Denne teknologien er både svært følsom og svært nøyaktig. Det ble derfor besluttet å benytte real-time PCR metodikk til påvisning av genmodifisert sebrafisk.

Det kan finnes flere typer av genmodifisert sebrafisk med GFP eller RFP enn de offisielle GloFish typene. I dette prosjektet ble det utviklet og etablert analysemetoder som kunne påvise den antatt vanligste GFP og RFP typen.

Som referansemateriale for GFP sebrafisk ble det benyttet en GFP sebrafisk fra Aleströms sebrafiskgruppe ved Norges Veterinærhøgskole. Denne sebrafisken er utviklet og brukes kun til forskningsformål. Som referansemateriale for RFP sebrafisk ble det benyttet kommersiell RFP akvariefisk innkjøpt i Kina. Denne ble avlivet umiddelbart etter innkjøp, for å unngå å bryte forbudet mot innførsel av levende genmodifisert akvariefisk.

Som referansemateriale for ikke-genmodifisert sebrafisk ble det benyttet villtype sebrafisk fra sebrafiskgruppen ved Norges Veterinærhøgskole. Som kontrollmateriale for metodenes pålitelighet ble det benyttet andre fiskearter enn sebrafisk. Disse kom dels fra akvariebutikker, dels fra Christer R. Nielsen og Øivind Øines ved Veterinærinstituttet.

Resultater

Det ble utviklet og etablert tre real-time PCR metoder:

- Metode for påvisning av sebrafisk. Denne fungerer som kontroll for å bekrefte at materialet ikke kommer fra en annen fiskeart enn antatt. Metoden kan også brukes ved behov for å kvantifisere andelen av for eksempel fiskemel, som kommer fra sebrafisk.
- Metode for påvisning av GFP genet. Denne brukes til å avsløre genmodifisering. Metoden kan også benyttes kvantitativt sammen med førstnevnte metode dersom man har behov for å kvantifisere andelen av for eksempel sebrafiskemel som kommer fra GFP sebrafisk.
- Metode for påvisning av RFP genet. Denne brukes til å avsløre genmodifisering. Metoden kan også benyttes kvantitativt sammen med førstnevnte metode dersom man har behov for å kvantifisere andelen av for eksempel sebrafiskemel som kommer fra RFP sebrafisk.

Siden analysene ble utført på enkeltfisk, og hver enkelt fisk enten er genmodifisert eller ikke genmodifisert, ble metodene utført kvalitativt (påvist eller ikke påvist). Metodene kan imidlertid også benyttes kvantitativt ved fremtidig behov.

Totalt 20 sebrafisk ble hentet inn fra fire ulike dyrebutikker i Oslo og Akershus. Genmateriale (DNA) ble isolert fra alle fiskene og analysert med alle de tre real-time PCR metodene. Alle 20 fisk ble bekreftet å være sebrafisk ved hjelp av real-time PCR metode. Dermed var det også vist at det var isolert genmateriale egnet til real-time PCR analyser. Gen som koder for GFP eller RFP ble ikke påvist i noen av prøvene.

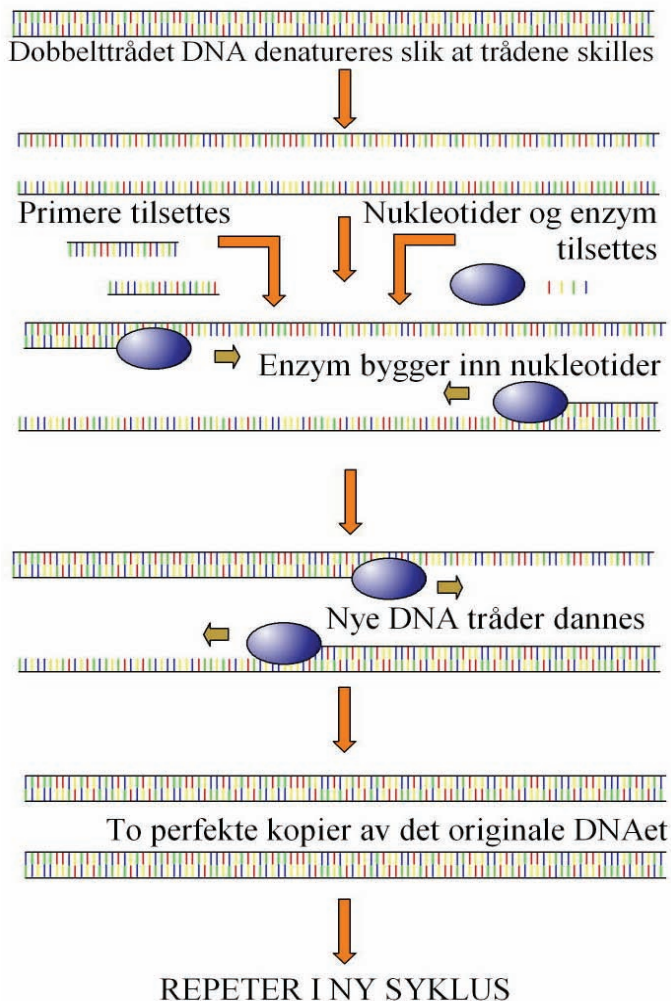
Takk til

Peter Aleström ved Norges veterinærhøgskole (NVH), for prøver av sebrafisk, og til Øyvind Øines og Christer Nielsen ved Veterinærinstituttet for prøver av ulike fiskearter som kontrollprøver.

2. Introduksjon

Sebrafisk (*Danio rerio*) er en populær akvariefisk, også i Norge. Genmodifisering er tatt i bruk for å utvikle spesielle varianter av sebrafisk med evne til å sende ut nyanser av grønt eller rødt lys, og slike genmodifiserte sebrafisk er lovlig kommersialisert i flere ikke-europeiske land. Levende genmodifiserte organismer omfattes i Norge av genteknologiloven (Miljøverndepartementet, 1993). Det er ikke søkt om eller gitt tillatelse til å holde eller omsette levende genmodifiserte sebrafisk i Norge eller EU. Bekreftede funn av genmodifiserte sebrafisk bl.a. i flere EU-land (Nederland, Tsjekkia, Tyskland, Storbritannia og Østerrike (FERA 2006; 2007) har medført behov for at også myndighetene i Norge kan kontrollere om genmodifiserte sebrafisk holdes og/eller omsettes i Norge. På denne bakgrunn fikk Veterinærinstituttet i oppdrag av Direktoratet for naturforvaltning å etablere og om nødvendig utvikle egnet metodikk for å påvise sebrafisk genmodifisert for å uttrykke grønne eller røde fluoresens proteiner (GFP og RFP).

Genmodifisering utføres ved å tilføre og endre deler av arvestoff (DNA) i mottakerorganismen. Genmodifisering vil som regel medføre at mottakerorganismen får evnen til å produsere et eller flere nye proteiner, men denne evnen kan være avhengig av flere forhold. Den sikreste måten å påvise og identifisere en genmodifisering på er derfor å påvise selve det endrede DNAet. En spesielt velegnet metode kalles polymerase kjede reaksjon (forkortet PCR, fra engelsk polymerase chain reaction; se **faktaboks 1**).



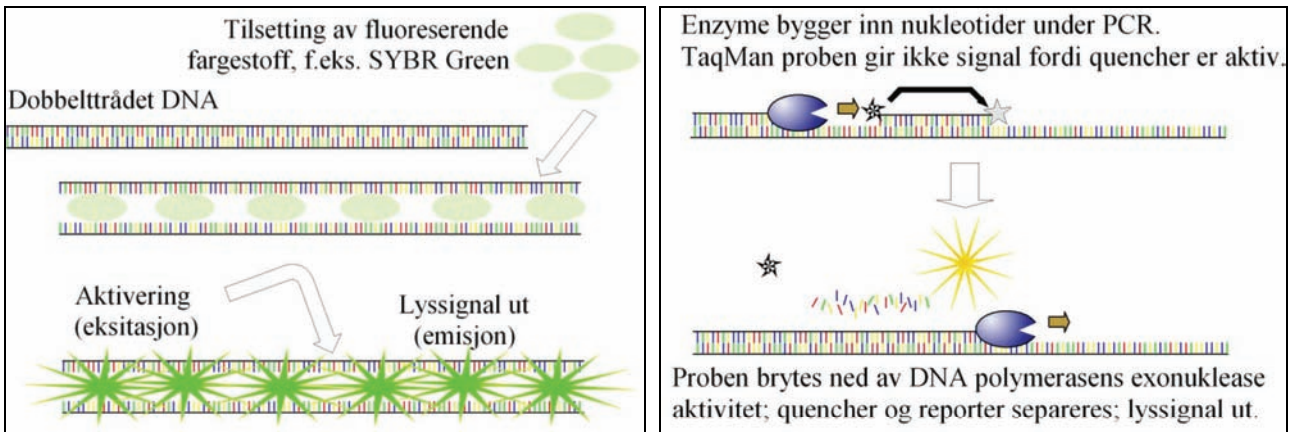
FAKTABOKS 1: Polymerase kjede reaksjon.

Et DNA fragment som skal studeres kan oppformeres til flere hundre millioner like kopier i løpet av en halv til tre timer ved hjelp av polymerase kjede reaksjon (PCR).

DNA er et dobbeltrådet molekyl, der rekkefølgen av baser (nukleotider) på den ene tråden er komplementær til rekkefølgen av baser på den andre tråden. DNA er sammensatt av fire baser som kalles A, C, G og T. Basepar dannes ved at en base på den ene tråden finner sin komplementære base på den andre tråden. Slike basepar består enten av A og T eller av C og G. På figuren har hver av de fire basene fått sin egen farge (blå, grønn, rød og gul).

Forutsetningen for å kunne utføre PCR er at man kjenner til DNA fragmentets baserekkefølge i hver ende av det fragmentet som skal studeres. En liten primer (ca. 20 baser lang) i hver ende fremstilles syntetisk og blir så tilsatt til PCRen. Primeren fungerer som start for en ny DNA tråd, og må basepare perfekt i den enden hvor syntese skal starte. DNA-tråden forlenges i en fast retning (kalt 5'-3') ved at hver ny nukleotid hektes på trådens 3'-ende av enzymet DNA polymerase (blå ellipse), så hver primer må ha komplementaritet til den motsatte trådens 3'-ende.

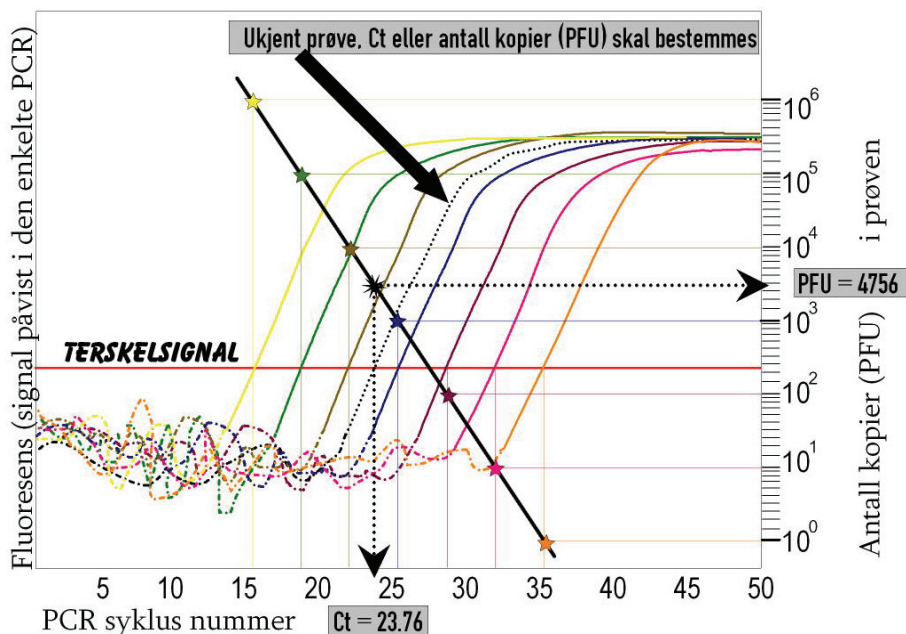
For hver syklus (illustrert) dobles antall kopier av det aktuelle DNA fragmentet, dersom PCRen fungerer optimalt. Antall kopier kan derfor øke med 2^n i løpet av n sykluser.



FAKTABOKS 2: Sanntids-PCR (real-time PCR). Sanntids-PCR (real-time PCR) kan benyttes til å øke spesifisiteten til en PCR metode. Man kan (**øverst til venstre**) benytte et molekyl som interkalierer DNAet (dvs. setter seg mellom DNA trådene) og som responderer på et lyssignal av en gitt bølgelengde (farge) ved å skille ut lyssignal av en annen bølgelengde. Dette vil bare fortelle hvor mye nytt DNA som lages. Det kan videre kombineres med bruk av smeltepunktanalyse som forteller om smeltepunktet er det samme som smeltepunktet for den baserekkefølgen man tror man har oppformert.

Alternativt kan man benytte en såkalt probe (en søker; **øverst til høyre**) som binder seg til det aktuelle DNA fragmentet og ikke til noen annen DNA sekvens. Proben blir ødelagt av DNA polymerasen hvis proben sitter i veien for polymerasen. Proben er laget med to fluoreserende forbindelser, en i hver ende. Den ene er en såkalt quencher, som kveler lyssignal fra den andre. Når proben ødelegges vil den andre fluoroforen (reporteren) kunne sende ut signal og man får da bekreftet at DNA som dannes under en PCR faktisk har den forventede baserekkefølgen.

I de innledende syklusene (**figuren under**) vil fluoresenssignalet være så svakt at det ikke er mulig å skille mellom bakgrunnsstøy og ekte signal fra en PCR. Men etter hvert som mengden av den aktuelle DNA sekvensen øker vil signalet også bli sterkere. Når signalet når en viss styrke (terskelsignalet) blir det registrert som en positiv reaksjon (at målsekvensen er påvist) og det leses evt. av hvor mange PCR sykluser (Ct) som har passert før signalet ble sterkt nok. Real-time PCRen utføres som regel med både ukjente prøver og kontroller med kjent mengde (kalibranter). Hver prøve vises grafisk med egen farge. Kalibrantene (her gul, grønn, oliven, blå, fiolett, rosa og oransje) kan benyttes til å fremstille en standardkurve, dvs. en linjær sammenheng mellom mengde av målsekvensen og Ct. For en ukjent prøve (her svart stiplet linje) kan avlest Ct (lodrett stiplet pil) derfor oversettes til mengde av målsekvensen (horisontal stiplet pil).



Denne metoden gjør at man kan formere opp en kort bit av DNAet mange millioner ganger i løpet av få timer. Når mengden av denne biten øker fra noen få til mange millioner kopier blir den både enklere å påvise og studere. PCR er en syklisk prosess hvor hver kopi av den aktuelle biten av DNA gir opphav til en ny kopi i løpet av en syklus. Dermed får man teoretisk sett en eksponensiell økning i antall kopier. En syklus gir dobbelt så mange kopier, to sykluser gir fire ganger så mange, tre sykluser gir åtte ganger så mange, fire sykluser gir 16 ganger så mange, osv.

Ved å koble inn enda en faktor, en såkalt hydrolyseringsprobe, kan man oppnå en meget spesifikk identifisering av oppformert DNA. Den formen for hydrolyseringsprobe og PCR som ble benyttet i dette prosjektet kalles TaqMan PCR og er klassifisert som en sanntids-PCR (eng: real-time PCR; se **faktaboks 2**) og gir også mulighet for å kvantifisere mengden av den aktuelle biten av DNA mens PCR pågår.

I TaqMan PCR vil hydrolyseringsproben bli brutt ned underveis i PCRen. Dette skjer kun dersom proben passer perfekt til den aktuelle biten av DNA. En probe brytes ned for hver ny kopi som lages av den aktuelle biten av DNA. Nedbrytingen gjør at proben vil begynne å skille ut et lyssignal som kan måles. Når en viss mengde hydrolyseringsprober er brutt ned vil det utskilte lyssignalet bli så kraftig at det registreres som et positivt signal, dvs. at den aktuelle biten av DNA anses som sikkert påvist. Mengden lyssignal som skal til betegnes gjerne som threshold (terskelen på norsk). Det antal sykluser som må gå før en konkret prøve når terskelen kalles gjerne Ct (for cycle threshold). Jo tidligere i en PCR terskelen nås (dvs. jo lavere Ct), jo mer av den aktuelle biten av DNA kan man anta var tilstede ved starten på PCRen. Kvantifisering ved hjelp av real-time PCR gjøres vanligvis på grunnlag av sammenligning med et sett av standarder med kjent mengde. Standardene gir grunnlag for å etablere et linjært forhold mellom Ct og antall kopier av den aktuelle biten av DNA som finnes ved starten av PCR. Når en ukjent prøve produserer en Ct kan man derfor gå inn på denne linjen for standardene og beregne omtrentlig antall kopier av den aktuelle biten av DNA i den ukjente prøven.

Holst-Jensen og Berdal (2004) introduserte begrepet PCR forming units (PFU) som en molekylær analog til mikrobiologiens kolonidannende enheter (KDE, engelsk: CFU). En PFU er en kopi eller en samling av kopier av en DNA bit som per definisjon vil bli oppformert i en PCR. Mens en kopi av DNA biten kan være skadet eller på annen måte forhindret fra å bli oppformert i PCR, tar definisjonen av PFU kun hensyn til om resultatet blir positivt eller negativt i PCR.

Dersom man analyserer på en prøve som inneholder en blanding av antatt genmodifiserte og ikke-genmodifiserte individer så vil det være av interesse å vite omtrentlig hvor stor andel av de analyserte individene som er genmodifisert. For dette formålet kan man benytte en sammenligning av antall kopier av to biter av DNA, der den ene biten finnes både i genmodifiserte og ikke-genmodifiserte individer (referanse), mens den andre biten bare finnes i genmodifiserte individer. Forholdstallet mellom de to bitene kan uttrykkes i %.

Det kan også være av interesse å finne ut om en tilført bit av DNA er satt inn i en eller flere kopier i forbindelse med genmodifiseringen. Dette kan være noe vanskeligere å avgjøre, men en mulig framgangsmåte er å benytte statistikk og sannsynlighetsregning. I dette prosjektet ble en slik framgangsmåte, kalt SIMQUANT, benyttet (Berdal *et al.* 2008). SIMQUANT ble også benyttet til å beregne metodenes følsomhet (påvisningsgrense = LOD).

EU innførte fra 2003 et krav om at ingen ny GMO kunne godkjennes uten at en validert kvantitativ påvisningsmetode for den aktuelle GMOen også er tilgjengelig for EUs analyselaboratorier. European Network of GMO Laboratories (ENGL) har formulert noen konkrete krav til PCR metoder for GMO påvisning (ENGL, 2008). Disse kravene ble utformet for at bedrifter som ønsker å få sine GMOer godkjent for EU markedet skal vite hvilke krav som stilles til en deteksjonsmetode for deres GMOer. Kravene brukes også når nye PCR metoder utvikles for eksempel ved Veterinærinstituttet. De viktigste parametere som omfattes gjelder spesifisitet, deteksjons og kvantifiseringsgrense, amplifiseringseffektivitet og standardkurvens linearitet. Metoder som ble utviklet i forbindelse med dette oppdragsprosjektet ble også evaluert opp mot ENGLs krav.

Fordi PCR er en svært følsom teknologi er det en reell risiko for at man får falske positiver hvis man ikke tar nødvendige forholdsregler mot å få forurenset prøver med kopier av den aktuelle biten av DNA. Spesielt er det fare for å overføre slike kopier fra tidligere PCRer fordi konsentrasjonen etter PCR kan

være ekstremt høy og kopiene så små at de kan overføres med mikroskopiske væskepartikler (aerosoler). I tillegg til god laboratorieteknikk er en god forholdsregel å benytte et enzym som kalles urasil-N-glykosylase (UNG) i PCRen. Dette enzymet ødelegger DNA fra PCR, men ikke DNA fra levende organismer. Enzymet får lov til å virke i starten av en PCR men vil bli ødelagt på grunn av høy temperatur så snart selve PCRen setter i gang. UNG vil derfor kun ødelegge DNA fra forurensinger, ikke kopier som blir laget underveis i PCRen.

Det er tidligere publisert to PCR metoder for å påvise genmodifisert sebrafisk med innsatt RFP-gen (Ji *et al.*, 2005; Rehbein & Bogerd, 2007), men ingen for å påvise sebrafisk med innsatt GFP-gen. Det er også publisert en TaqMan PCR metode som kan fungere som kvantitativ referanse for sebrafisk (Ji *et al.* 2005). De publiserte metodene var bare delvis egnet til prosjektets formål, og det ble derfor utviklet alternative metoder for påvisning og kvantifisering av både GFP og RFP. De nyutviklede metodene vil bli gjort tilgjengelige internasjonalt i etterkant av prosjektet.

Et av hovedformålene med prosjektet har vært å undersøke om genmodifiserte sebrafisk holdes eller omsettes i Norge. Totalt 20 sebrafisk ble derfor hentet inn fra til sammen 4 butikker som selger akvariefisk i Akershus og Oslo, og fiskene ble analysert med de nyetablerte metodene.

3. Materiale og metoder

3.1. Sebrafisk og referansematerialer

Som referansemateriale for kontroll med PCR metodene ble det benyttet materiale av en genmodifisert sebrafiskelinje med innsatt GFP, en med innsatt RFP, og ikke-genmodifisert materiale av ti fiskearter (ni arter i tillegg til sebrafisk; Tabell 1). Totalt 20 sebrafisk til undersøkelse ble kjøpt inn fra til sammen 5 butikker som selger akvariefisk i Akershus og Oslo, i løpet av sommeren 2009 (Tabell 2).

Tabell 1. Kontrollprøver (referansemateriale) av fisk.

ID	Art	Latinsk navn	Funksjon	Kilde
RM1	Sebrafisk (ikke genmodifisert)	<i>Danio rerio</i>	Positiv kontroll for sebrafisk, negativ kontroll for genmodifisering	Aleström, NVH
RM2	Sebrafisk (grønn GloFish; genmodifisert)	- <i>Tg(bactin2:EGFP) zp5/+ (AB)</i>	Positiv kontroll for sebrafisk, positiv kontroll for GFP genmodifisering	Aleström, NVH
RM3	Sebrafisk (rød GloFish; genmodifisert)	- typebetegnelse ikke oppgitt	Positiv kontroll for sebrafisk, positiv kontroll for RFP genmodifisering	Dyrehandel Kina
RM4	Lange	<i>Molva molva</i>	Spesifisitettskontroll for alle PCR metodene	Christer Nielsen
RM5	Horngjel	<i>Belone belone</i>	Spesifisitettskontroll for alle PCR metodene	C. Nielsen
RM6	Atlanterhavskveite	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	Spesifisitettskontroll for alle PCR metodene	C. Nielsen
RM7	Sjørret	<i>Salmo trutta trutta</i>	Spesifisitettskontroll for alle PCR metodene	Øivind Øines
RM8	Sild	<i>Clupea harengus</i>	Spesifisitettskontroll for alle PCR metodene	Ø. Øines
RM9	Atlanterhavskveite	-	Spesifisitettskontroll for alle PCR metodene	C. Nielsen
RM10	Atlanterhavslaks	<i>Salmo salar</i>	Spesifisitettskontroll for alle PCR metodene	C. Nielsen
RM11	Kileflekkrasbora	<i>Trigonostigma heteromorpha</i>	Spesifisitettskontroll for alle PCR metodene	Exotic Zoo, Oslo
RM12	Glødebåndstetra	<i>Hemigrammus erythrozonus</i>	Spesifisitettskontroll for alle PCR metodene	Exotic Zoo
RM13	Atlanterhavstorsk	<i>Gadus morhua</i>	Negativ kontroll for sebrafisk og genmodifisering (standard negativ kontroll)	Ø. Øines

Tabell 2. Prøver innhentet til undersøkelse for genmodifisering.

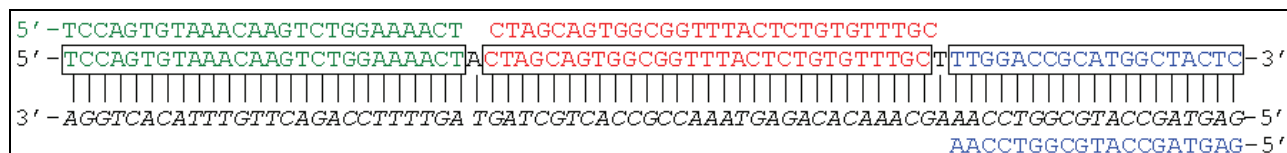
ID	Prøvetype	Innkjøpssted
U1	Antatt sebrafisk, til undersøkelse for genmodifisering	Tam Alna, Strømsveien 245, Oslo
U2	Antatt sebrafisk, til undersøkelse for genmodifisering	Tam Alna
U3	Antatt sebrafisk, til undersøkelse for genmodifisering	Tam Alna
U4	Antatt sebrafisk, til undersøkelse for genmodifisering	Tam Alna
U5	Antatt sebrafisk, til undersøkelse for genmodifisering	Tam Alna
U6	Antatt sebrafisk, til undersøkelse for genmodifisering	Exotic Zoo, Vitaminveien 7, Oslo
U7	Antatt sebrafisk, til undersøkelse for genmodifisering	Exotic Zoo
U8	Antatt sebrafisk, til undersøkelse for genmodifisering	Exotic Zoo,
U9	Antatt sebrafisk, til undersøkelse for genmodifisering	Exotic Zoo
U10	Antatt sebrafisk, til undersøkelse for genmodifisering	Exotic Zoo
U11	Antatt sebrafisk, til undersøkelse for genmodifisering	Strømmen Zoosenter AS, Støperiveien 5, Strømmen
U12	Antatt sebrafisk, til undersøkelse for genmodifisering	Strømmen Zoosenter AS
U13	Antatt sebrafisk, til undersøkelse for genmodifisering	Strømmen Zoosenter AS
U14	Antatt sebrafisk, til undersøkelse for genmodifisering	Strømmen Zoosenter AS
U15	Antatt sebrafisk, til undersøkelse for genmodifisering	Strømmen Zoosenter AS
U16	Antatt sebrafisk, til undersøkelse for genmodifisering	Akvariemagasinet, Lørenveien 38, Oslo
U17	Antatt sebrafisk, til undersøkelse for genmodifisering	Akvariemagasinet
U18	Antatt sebrafisk, til undersøkelse for genmodifisering	Akvariemagasinet
U19	Antatt sebrafisk, til undersøkelse for genmodifisering	Akvariemagasinet
U20	Antatt sebrafisk, til undersøkelse for genmodifisering	Akvariemagasinet

3.2. Prøveopparbeiding og DNA isolering

Fisk ble avlivet etter en generell metode (Sissener *et al.* 2009). Det ble tatt ut prøver av 15-20 mg vev fra halesiden på hver fisk. Vevet ble kuttet opp i små biter og deretter ble DNA rensset ut ved bruk av DNeasy Blood & Tissue Kit fra Qiagen, i henhold til produsentens anbefalinger (DNeasy®Blood & Tissue Handbook, Qiagen). DNA ble isolert to ganger fra hver prøve, og hvert av DNA isolatene ble fortynnet til to ulike konsentrasjoner (fortynningsfaktor 10 i forskjell). Det isolerte DNAet ble kvantifisert ved hjelp av en NanoDrop Spectrophotometer ND 1000.

3.3. Primere og prober for PCR

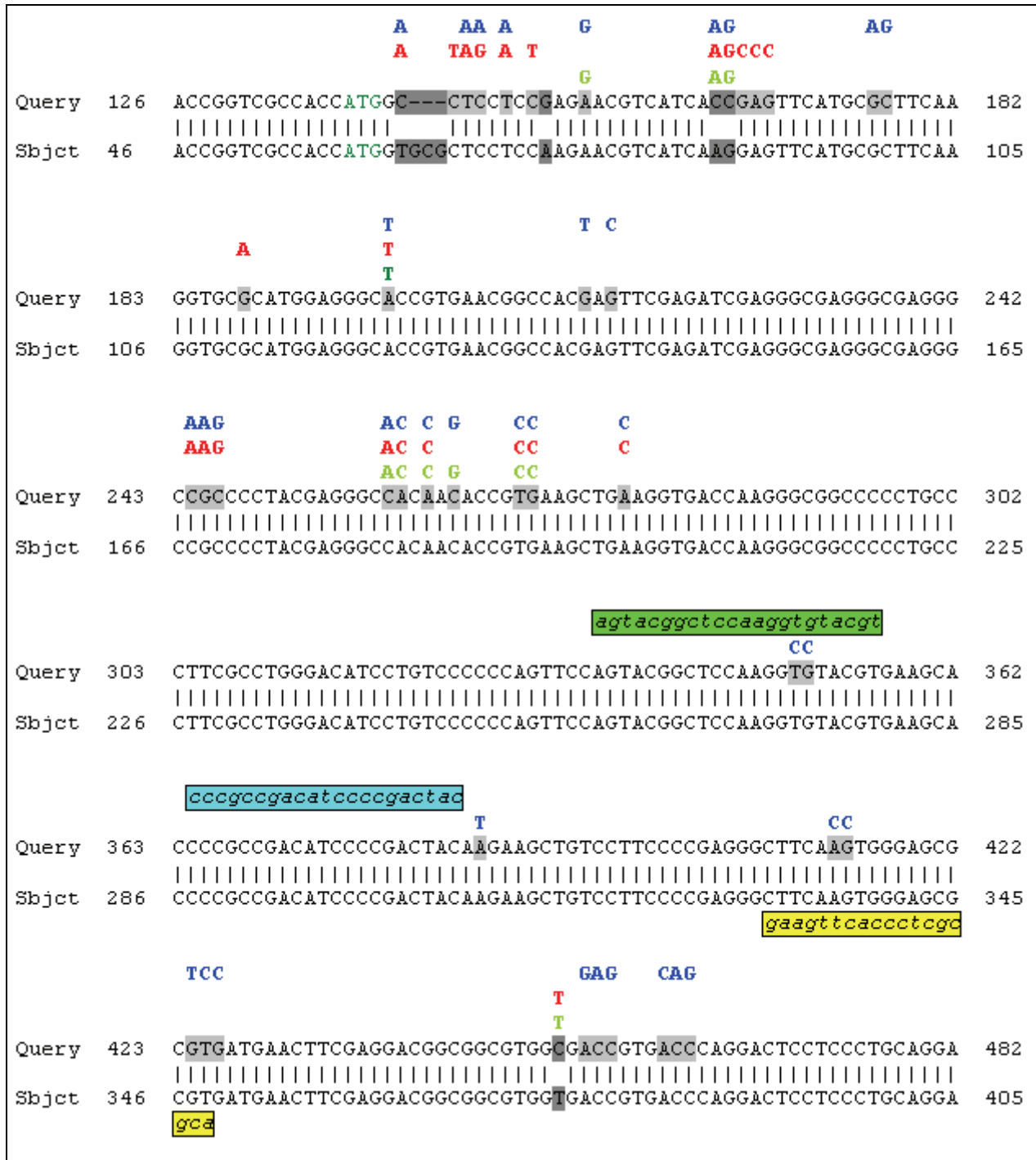
Som kontroll for å bekrefte at DNA fra sebrafisk var rensset ut og kunne oppformeres ved hjelp av PCR ble det tatt i bruk en PCR metode for et referanseggen antatt å være spesifikt for sebrafisk ((Ji *et al.* 2005) Tabell 3). Det er ikke kjent hvilken egenskap sekvensen er knyttet til. PCR metoden oppformerer en DNA bit på 76 bp med en intern TaqMan probe (Fig. 1).



Figur 1. Amplikon for artskontroll. Første primer er angitt i grønt og proben i rødt, og for begge disse gjelder at baserekkefølgen tilsvarer baserekkefølgen på den øverste av DNA-trådene i målsekvensen. Andre primer er angitt i blått og for denne er baserekkefølgen komplementær til den øverste av DNA-trådene. Legg også merke til at nederste tråd og andre primer har motsatt leseretning av øverste tråd.

Det finnes flere varianter av konstrukt med gener som koder for GFP (green fluorescent protein) og RFP (red fluorescent protein), og som dermed kan tenkes å ha blitt benyttet til å lage genmodifiserte sebrafisk. For at metodene som ble utviklet skulle kunne brukes på så mange av disse variantene som mulig ble de ulike konstruktene lastet ned og DNA sekvensene sammenstilt i tabellform slik at forskjeller

og likheter ble synlige (Fig. 2). Egnete DNA sekvensmotiver for utvikling av PCR primere og prober ble identifisert og softwareprogrammet Primer Express 2.0 (Applied Biosystems) benyttet til å identifisere egnete primere og prober. Brukerdefinerte innstillinger var optimalt smeltepunkt for primere og prober mellom 59 og 69°C, GC innhold mellom 30 og 80 % og lengde på målsekvensmotivet mellom 50 og 150 basepar.



Figur 2. Sammenligning av ulike RFP gener i ulike vektorer fra clontech, og plassering av primere og probe for RFP gen PCR metoden. Query = sekvensen i vektor DsRed2, Sbjct = DsRed1. Mørk grå markering indikerer forskjell mellom Query og Sbjct, mens lys grå markering for Query indikerer hvor det er forskjell mellom Query/Sbjct på den ene siden og en av de øvrige vektorene på den andre siden. Grønne baser over query sekvensen = DsRed-Express, røde baser over query = DsRed-Express2, blå baser over query = DsRed-monomer. Første primer er vist i kursiv i grønn boks, andre primere er vist i kursiv i gul boks, mens proben er vist i kursiv i blå boks.

Alle primere og prober (Tabell 3) ble syntetisert av DNA Technology A/S (Risskov, Danmark). Alle prober ble merket med med 5`-FAM og 3`-TAMRA.

Tabell 3. Oligonukleotider (primere og prober)

	PCR metode	Artskontroll (antatt spesifikk for sebrafisk)	GFP gen (påvisning av grønn GloFish)	RFP gen (påvisning av rød GloFish)
	Lengde, PCR produkt	76 bp	60 bp	91 bp
Første (forward) primer	Navn	DaReFo	GrFPFo	ReFPFo
	Sekvens ^a	TCC AGT GTA AAC AAG TCT GGA AAA CT	GCT ACC CCG ACC ACA TGA AG	AGT ACG GCT CCA AGG TGT ACG T
Andre (reverse) primer	Navn	DaReRe	GrFPre	ReFPre
	Sekvens ^a	GAG TAG CCA TGC GGT CCA A	CGG CGC GGG TCT TGT A	ACG CGC TCC CAC TTG AAG
Probe	Navn	DaReTa	GrFPTa	ReFPTa
	Sekvens ^{a, b}	CTA GCA GTG GCG GTT TAC TCT GTG TTT GC	ATG CCC GAA GGC TAC GTC CAG GA	CCC GCC GAC ATC CCC GAC TAC
	Kilde/referanse	Ji et al. (2005)	Denne rapporten	Denne rapporten

^a Alle oligonukleotidsekvenser er oppgitt i 5'-3' retning.

^b Alle probene er merket med 5'-FAM og 3'-TAMRA fluoroforer.

3.4. PCR betingelser

PCR ble utført på en Stratagene Mx3005P termosyklus med standard PCR program for alle tre PCR metoder: Initiell UNG-behandling (120 sek, 50°C), deretter aktivering av DNA polymerase og denaturering av templat (600 sek, 95°C), fulgt av 50 sykler med denaturering (15 sek, 95°C) og hybridisering og polymerisering (60 sek, 60°C). Hver PCR ble utført i et totalvolum på 25 µl, med PCR spesifikke reagenskonsentrasjoner (Tabell 4). Det ble benyttet 96-brønners mikrotiterplater (Stratagene) for real-time PCR med optiske lokk. For hver kjøring (plate og PCR metode) ble det inkludert to paralleller av positiv kontroll for PCR metoden, to paralleller av PCR reagens kontroll (nukleasefritt) og to paralleller av negativ kontroll for PCR metoden (NK = RM13; Tabell 1).

Tabell 4. Oppsett av PCR med reagenser og konsentrasjoner.

Reagens	Konsentrasjon	Kontroll PCR		GFP PCR		RFP PCR	
		Mengde tilsatt (µl)	Sluttkonsentrasjon	Mengde tilsatt (µl)	Sluttkonsentrasjon	Mengde tilsatt (µl)	Sluttkonsentrasjon
Prøve DNA (templat)	50±21 ng/µl ^a	5 µl	25±10,5 og 2,5±1,05 ng/µl	5 µl	25±10,5 og 2,5±1,05 ng/µl	5 µl	25±10,5 og 2,5±1,05 ng/µl
Første primer	10 µM for kontroll og RFP, 1 µM for GFP	1 µl	0,4 µM	1,25 µl	0,05 µM	1 µl	0,4 µM
Andre primer	10 µl	1 µl	0,4 µM	1,5 µl	0,6 µM	1 µl	0,4 µM
Probe	5 µM	1,25 µl	0,25 µM	1,25 µl	0,25 µM	1,25 µl	0,25 µM
Universal mastermix	2 ×	12,5 µl	1 ×	12,5 µl	1 ×	12,5 µl	1 ×
Nukleasefritt H₂O	-	4,25 µl	-	3,5 µl	-	4,25 µl	-
Sluttvolum		25 µl		25 µl		25 µl	

^a Konsentrert stock ble målt til 29-71 ng/µl (målte prøve U1,U5,U10,U15 og U20). Tilsatte 1:10 og 1:100 fortyninger til hver PCR

3.5. Beregning av kopitall for målsekvensene og tillaging av standardløsninger for kvantitativ PCR

Antall kopier av hver målsekvens var ikke kjent men ble anslått på grunnlag av initielle antakelser og etterfølgende analyser av fortyninger etter SIMQUANT prinsippet (Berdal *et al.* 2008). Så snart dette antallet var anslått ble dette tallet benyttet videre i tillaging av standardløsninger for kvantitativ PCR. Massen av et haploid genom av sebrafisk er anslått til 1,7 pg (Postlethwait *et al.* 1999). Antall haploide sebrafiskgenomer i templatet ble derfor anslått å være massen av DNA i templatløsningen dividert på massen av et haploid genom av sebrafisk. Ved å korrigere videre for antall kopier av hver målsekvens i et haploid sebrafiskgenom ble det mulig å lage fem standardkonsentrasjoner for hver av mål DNAene (for referanse, GFP og RFP).

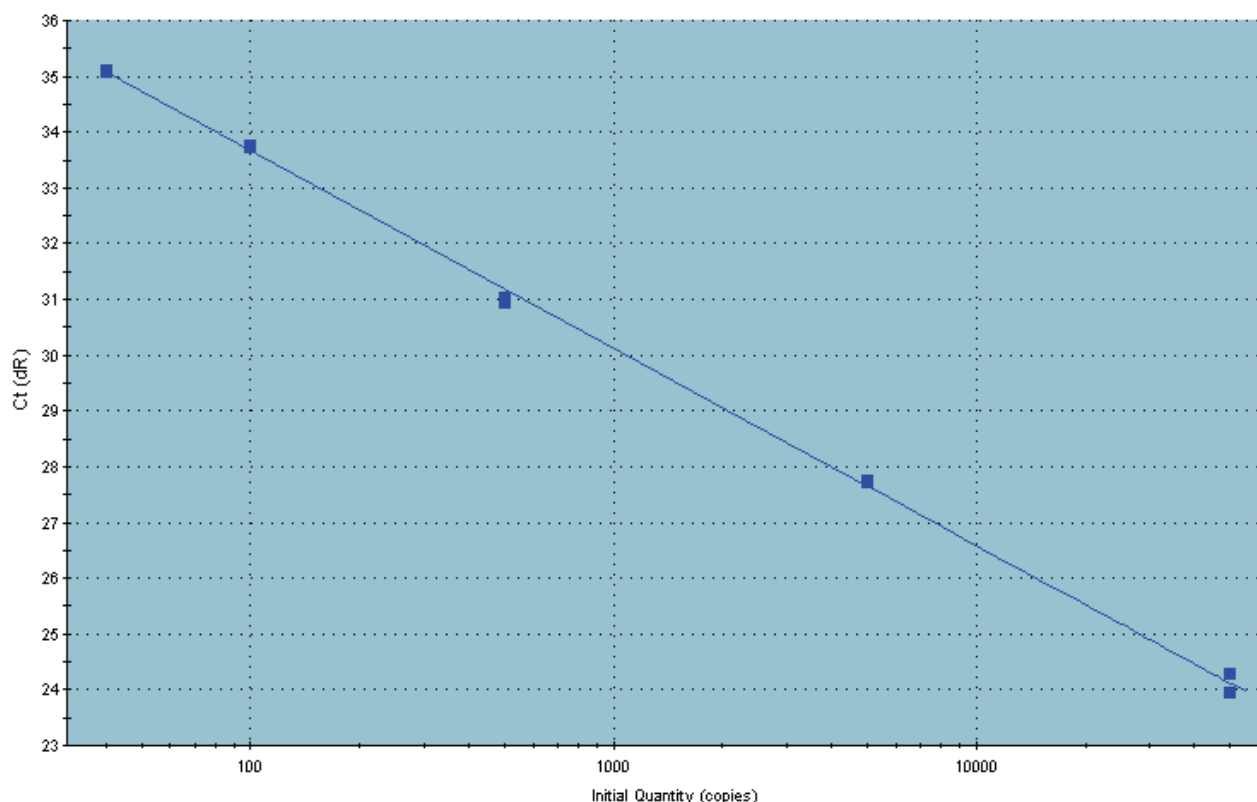
4. Resultater

4.1. Metodeutvikling og -etablering

4.1.1. PCR metode for artsidentifisering (artskontroll)

PCR metoden som ble valgt for artsidentifisering (artskontroll) er publisert av Ji *et al.*, (2005). Det var derfor ikke nødvendig å utvikle en egen metode, men å tilpasse metoden til eget behov og å validere den for eget bruk.

Det ble antatt at målsekvensen for PCR metoden for artsidentifisering var tilstede i en kopi i hvert haploid genom (kromosomsett fra en forelder). Et haploid genom har i følge Postlethwait *et al.* (1999) en masse på ca. 1,7 pg. På denne bakgrunn ble DNA isolert fra sebrafisk fortynnet til et nivå som tilsvarer ca. et haploid genom per PCR. Det ble så utført SIMQUANT analyse på dette DNAet, med 20 parallelle PCRer. Resultatet ble 8 positive og 12 negative reaksjoner, noe som gir et estimert kopitall på ca. 0,5 (0,34-0,71) haploide genomer per PCR.



Figur 3. Standardkurve for PCR metoden for artsidentifisering. Fem standarder med (fra venstre) forventet 40, 100, 500, 5000 og 50000 PFU av målsekvensen ble analysert. Linjær regresjonskoeffisient = 0,999. Stigningstallet til kurven = -3,536 som gir 91,8 % amplifiseringseffektivitet. Skjæringspunktet for vertikal akse (Ct-verdi) = 40,73.

Ut fra SIMQUANT resultatene ble det laget fem kalibrantkonsentrasjoner, tilsvarende 40, 100, 500, 5000 og 50000 PFU per PCR og disse ble så benyttet til å etablere en standardkurve (Figur 3). Fra standardkurven ble det beregnet at amplifiseringseffektiviteten var 91,8 % og lineariteten (R²) ble beregnet til 0,999. Med ca. 10 PFU per PCR i 20 paralleller ble samtlige paralleller positive, og deteksjonsgrensen ble derfor bestemt til ≤ 10 PFU per PCR.

To av de negative kontrollartene (Tabell 1) ga positivt signal med kontrollmetoden for artsidentifisering, noe som tyder på at metoden ikke er så spesifikk som antatt. De to artene som ga positivt resultat med metoden er Kileflekkrasbora (*Trigonostigma heteromorpha*; RM11) og Glødebåndstetra (*Hemigrammus erythrozonus*; RM12).

4.1.2. PCR metode for påvisning av GFP gen

Det eksisterte ikke noen egnet PCR metode for påvisning av GFP gen, så det ble besluttet å utvikle og validere en egnet metode. I følge Gong *et al.* (2003) er kloningsvektoren pEGFP-1 fra Clontech benyttet som del av det inntransformerte konstruktet i transgen GFP sebrafisk. Sekvensen for pEGFP-1 ble lastet ned fra EMBL/GenBank (aksjesjonsnr. U55761, versjon U55761.1 GI:1377908). Primere for spesifikk påvisning av GFP ble utviklet ved hjelp av Primer Express 2.0 (Tabell 3). Primerene og proben ble deretter sjekket for spesifisitet ved hjelp av BlastN på NCBI's internettside (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) med tilleggssøkeord "Clontech". Søket returnerte 100 % treff for begge primere og proben på til sammen 13 kloningsvektorer (Tabell 5).

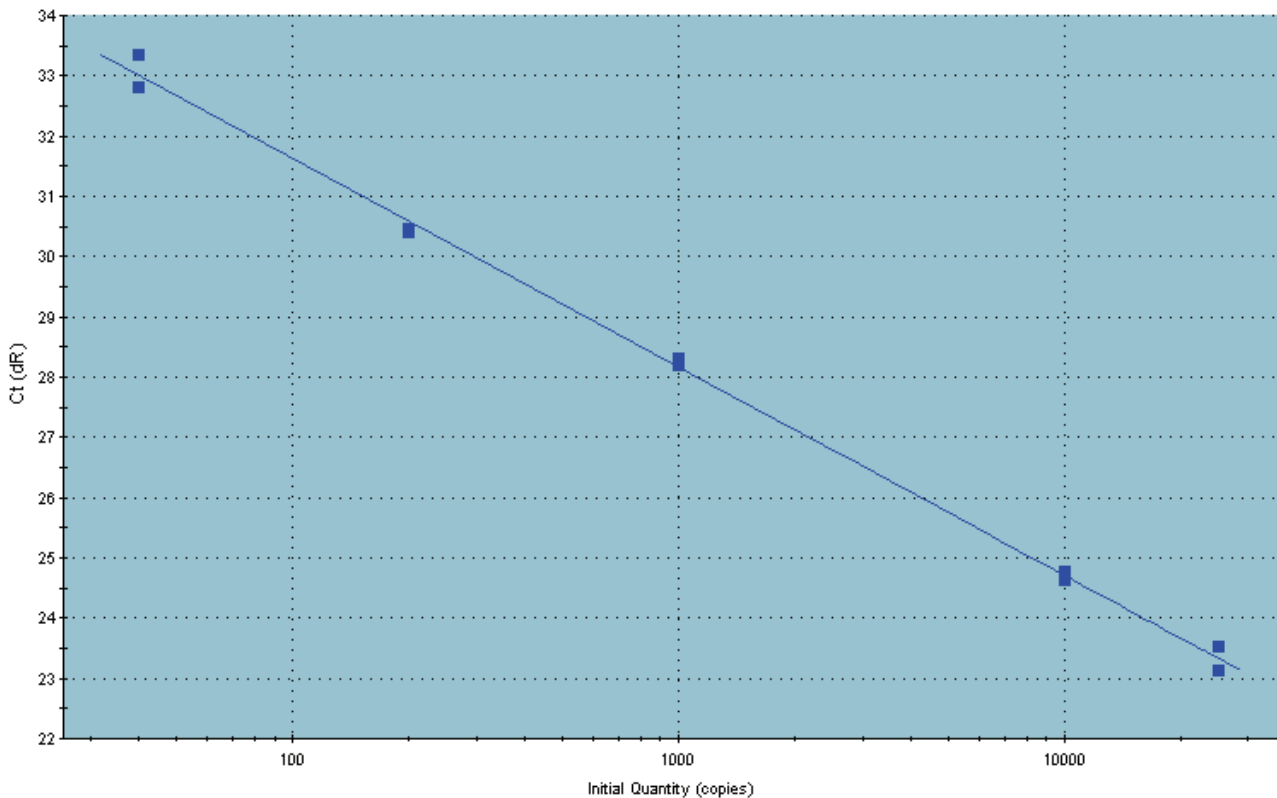
Tabell 5. Kloningsvektorer fra Clontech som inneholder GFP gen med probemotivet og begge primermotivene for PCR metoden for GFP gen.

Vektor	EMBL/GenBank aksjesjonsnr.
Fusion vector pDsred-express::plac::prn::pd1egfp	GQ268961.1
Trafficking reporter vector pIN-G pIN-G mRNA	AY841887.1
Cloning vector pEGFP-N3 with enhanced green fluorescent protein gene	U57609.1
Cloning vector pEGFP-N2 with enhanced green fluorescent protein gene	U57608.1
Cloning vector pEGFP-C3 with enhanced green fluorescent protein gene	U57607.1
Cloning vector pEGFP-N1, complete sequence, enhanced green fluorescent protein (egfp) and neomycin phosphotransferase genes	U55762.1
H-Stinger GFP transformation vector	AF242365.2
Stinger GFP transformation vector	AF242364.2
Cloning vector pEGFP	U76561.1
Cloning vector pEGFP-C1, complete sequence, enhanced green fluorescent protein (egfp) and neomycin phosphotransferase genes	U55763.1
Cloning vector pEGFP-1, complete sequence, enhanced green fluorescent protein (egfp) and neomycin phosphotransferase genes	U55761.1 ^a
Cloning vector pEGFP-C2 with enhanced green fluorescent protein	U57606.1
Cloning vector pHGFP-S65T, complete sequence, green fluorescent protein (gfp) gene	U43284.1

^a Vektoren som ble brukt som utgangspunkt for metodeutvikling.

Den positive kontrollen for PCR metoden for påvisning av GFP gen var en heterozygot sebrafisklinje (RM2; *Tg(bactin2:EGFP)zp5/+* (AB). Dette var den eneste av kontrollmateriale (Tabell 1) som ga positivt resultat med PCR metoden for GFP gen.

Det at den positive kontrollinjen er heterozygot medfører at målsekvensen kun finnes i et av de to haploide genomene i den diploide fisken. Det ble ikke utført SIMQUANT analyse for denne metoden, fordi det var kjent på forhånd hvor mange kopier av målsekvensen som finnes per genom i referansematerialet.



Figur 4. Standardkurve for PCR metoden for påvisning av GFP gen. Fem standarder med (fra venstre) forventet 40, 200, 1000, 10000 og 25000 PFU av målsekvensen ble analysert. Linjær regresjonskoeffisient = 0,998. Stigningstallet til kurven = -3,461 som gir 94,5 % amplifiseringseffektivitet. Skjæringspunktet for vertikal akse (Ct-verdi) = 38,56.

Det ble på dette grunnlag laget fem kalibrantkonsentrasjoner, tilsvarende 40, 200, 1000, 10000 og 25000 PFU per PCR, og disse ble benyttet til å etablere en standardkurve (Fig. 4). Fra standardkurven ble det beregnet at amplifiseringseffektiviteten var 94,5 % og lineariteten (R^2) ble beregnet til 0,998. Med ca. 5 PFU per PCR i 20 paralleller ble samtlige paralleller positive, og deteksjonsgrensen ble derfor bestemt til ≤ 5 PFU per PCR.

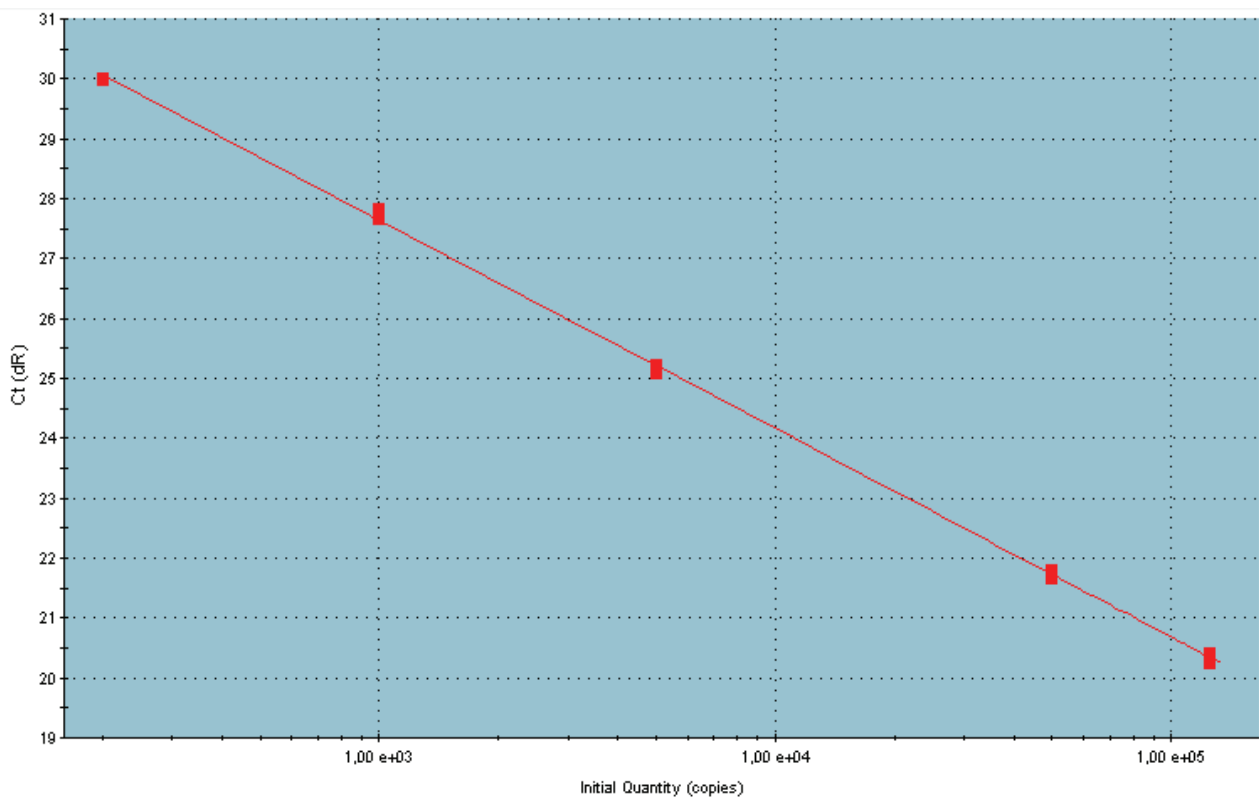
4.1.3. PCR metode for påvisning av RFP gen

Flere ulike kloningsvektorer med ulike varianter av RFP gen er benyttet til å transformere sebrafisk. Kloningsvektorer fra Clontech (<http://www.clontech.com>) omfatter DsRed (*Discosoma* sp. red fluorescent) genene DsRed1, DsRed2, DsRed-Express og DsRed-Express2). Sekvensen for alle disse fire genene ble derfor lastet ned fra Clontech's internettside og sammenstilt (Figur 2). Gong *et al.* (2003) benyttet kloningsvektoren pDsRed-1 som del av det intransformerte konstruktet i transgen RFP sebrafisk. Det eksisterte ikke noen egnet PCR metode for påvisning av alle de fire variantene av RFP gen, selv om Rehbein & Bogerd (2007) publiserte en kvalitativ PCR metode for påvisning av pDsRed2-N1 vektoren fra Clontech (med DsRed2 versjonen av genet). Det ble derfor besluttet å utvikle og validere en egnet metode. Primere for spesifikk påvisning av dsRed gener (RFP gen) ble utviklet ved hjelp av Primer Express 2.0 (Tabell 3).

Den positive kontrollen for PCR metoden for påvisning av RFP gen var kommersielt omsatt akvariefisk innkjøpt i Kina. Dette var det eneste kontrollmaterialet (Tabell 1) som ga positivt resultat med PCR metoden for RFP gen.

Det var ikke kjent hvor mange kopier av målsekvensen som var satt inn i det aktuelle referansematerialet, men det ble antatt at to kopier var innsatt per diploid genom. DNA isolert fra referansematerialet ble deretter fortynt til et nivå som tilsvarte det som ble antatt å være ca. en PFU per PCR. Det ble så utført SIMQUANT analyse på dette DNAet, med 20 parallelle PCRer. Samtlige var positive, og det ble derfor satt opp en ny serie av fortyninger med utgangspunkt i forventning om fem innsatte kopier av målsekvensen per diploid genom. Ny SIMQUANT analyse med 20 parallelle PCRer ga 4 negative og 16 positive reaksjoner, noe som gir et estimert PFU innhold på ca. 1,6 (1,24 - 2,2) per PCR.

Ut fra SIMQUANT resultatene ble det laget fem kalibrantkonsentrasjoner, tilsvarende 200, 1000, 5000, 50000 og 125000 PFU per PCR og disse ble så benyttet til å etablere en standardkurve (Figur 5). Fra standardkurven ble det beregnet at amplifiseringseffektiviteten var 93,9 % og lineariteten (R^2) ble beregnet til 0,999. Med ca. 6 PFU per PCR i 20 parallelle PCRer ble samtlige positive, og deteksjonsgrensen ble derfor bestemt til ≤ 6 PFU per PCR.



Figur 5. Standardkurve for PCR metoden for påvisning av GFP gen. Fem standarder med (fra venstre) forventet 200, 1000, 5000, 50000 og 125000 PFU av målsekvensen ble analysert. Linjær regresjonskoeffisient = 0,999. Stigningstallet til kurven = -3,478 som gir 93,9 % amplifiseringseffektivitet. Skjæringspunktet for vertikal akse (Ct-verdi) = 38,56.

4.2. Analyser av akvariefisk

Til sammen 20 sebrafisk innkjøpt i fem forskjellige butikker i Oslo og Akershus (Tabell 2) ble undersøkt for tilstedeværelse av GFP og RFP gen, og PCR metoden for artsidentifisering ble benyttet til å bekrefte at samtlige faktisk var sebrafisk.

Analysene viste at samtlige var sebrafisk, og det ble ikke påvist GFP eller RFP gen i noen av disse fiskene.

5. Diskusjon

5.1. PCR metoder

5.1.1. PCR metode for artsidentifisering (artskontroll)

Som kontrollmetode for artsidentifisering og potensiell referanse for kvantifisering av andelen genmodifisert sebrafisk ble en metode publisert av Ji *et al.* (2005) benyttet. Denne metoden er i følge originalpublikasjonen spesifikk for sebrafisk, og teoretisk spesifisitsanalyse ved hjelp av analyseverktøyet UniquePrimer (Nakken *et al.* 2009) på internett (<http://snp.uio.no/up/>) mot den samlede nukleotidsekvensdatabasen ved the European Molecular Biology Laboratory (EMBL) ga utelukkende treff på sebrafisk. Det var derfor forventet at metoden skulle kunne skille mellom sebrafisk (100 % positive med metoden) og negative kontroller (andre fiskearter, 100 % negative med metoden). To andre arter ga imidlertid positivt signal med artskontroll PCR metoden. Kileflekkrasbora er i likhet med sebrafisk klassifisert i karpfamilien (Cyprinidae), underfamilie Rasborinae, orden karpfisker (Cypriniformes), klasse beinfisker (Actinopterygii), mens Glødebåndstetra er klassifisert i familien karpelakser (Characidae), orden karpelaksfisker (Characiformes), klasse beinfisker. For begge disse artene var Ct-verdiene vesentlig høyere enn for tilsvarende mengde DNA fra sebrafisk, noe som tilsier at metoden hadde en viss seleksjon mot DNA fra disse artene.

SIMQUANT analyse viste at målsekvensen for metoden sannsynligvis er tilstede i en kopi i hvert haploid sebrafiskgenom. Siden sebrafisk er diploid og det ikke er grunn til å anta at målsekvensen er knyttet til kjønnskromosomet må det antas at målsekvensen finnes i begge haploide genomer i sebrafisken, dvs. at den er tilstede i to kopier i hver cellekjerne hos sebrafisk. Målsekvenser som kun finnes i en kopi i hvert haploide genom har minst sannsynlighet for å gi gale mengdeestimer, og er derfor foretrukket i de fleste tilfeller (Rønning *et al.* 2006). Metodens amplifiseringseffektivitet, linearitet for standardkurven (R^2) og deteksjonsgrense ≤ 10 PFU per PCR gir indikasjoner på at metoden er egnet også som kvantitativ referansemetode. Den oppfylder også ENGLs akseptanskrav til GMO testmetoder (ENGL, 2008), med hensyn til amplifiseringseffektivitet, linearitet og deteksjonsgrense. Derimot er metoden ikke så spesifikk som forventet og ønsket, så den kan under spesielle omstendigheter være upålitelig til dette formål. Dersom PCR metoden skal brukes kvantitativt vil det være nødvendig å forbedre den for å oppnå 100 % artsspesifisitet.

5.1.2. PCR metode for påvisning av GFP gen

Siden det ikke eksisterte noen egnet PCR metode for å påvise GFP gen var det nødvendig å utvikle en egnet metode i dette prosjektet. Metoden som ble utviklet ga som forventet kun positivt signal med den positive kontrollen (RM2) blant referansematerialene (RM1 - RM13). Genvarianten som er satt inn i kontrollen er også benyttet i GloFish (Gong *et al.* 2003) og er konserveret i en lang rekke kloningsvektorer fra bl.a. Clontech (Tabell 5), men det kan ikke utelukkes at andre varianter av GFP gen også kan være benyttet til transformasjon av sebrafisk (eller andre akvariefisk). I så fall kan det heller ikke utelukkes at PCR metoden vil mislykkes i å avsløre genmodifiseringen. Det foreligger imidlertid ingen opplysninger som skulle tilsi at slike transformerte fisk er på det internasjonale markedet. Inntil videre forventes det derfor at den utviklede metoden vil oppfylle forvaltningsmyndighetenes behov for metodikk for å kunne avsløre eventuelle genmodifiserte fisk med tilført GFP gen.

5.1.3. PCR metode for påvisning av RFP gen

Siden ingen publisert metode for å påvise RFP gen har tilstrekkelig universell spesifisitet til å fange opp de ulike RFP gen variantene som er benyttet i Clontechs vektorer, var det nødvendig å utvikle en egnet metode i dette prosjektet (se Fig. 2). Metoden som ble utviklet ga som forventet kun positivt signal med den positive kontrollen (RM2) blant referansematerialene (RM1 - RM13). Genvarianten som er satt inn i kontrollen er også benyttet i GloFish (Gong *et al.* 2003). Som det fremgår av sammenstillingen av de ulike genvariantene (Fig. 2), har heller ikke den metoden som ble utviklet i dette prosjektet perfekt samsvar mellom primere og probesekvensene og samtlige kloningsvektorer. Kloningsvektoren DsRed-monomer har så mye som fire baseforskjeller i andre primer og to i første primer, så sannsynligheten er stor for at PCR metoden for påvisning av RFP genet ikke vil fungere for genvarianten fra denne vektoren. Det kan heller ikke utelukkes at andre varianter av RFP gen også kan være benyttet til transformasjon av sebrafisk (eller andre akvariefisk). I så fall kan det heller ikke utelukkes at PCR metoden vil mislykkes i å avsløre genmodifiseringen. Det foreligger imidlertid ingen opplysninger som skulle tilsi at slike transformerte fisk

er på det internasjonale markedet. Inntil videre forventes det derfor at den utviklede metoden vil oppfylle forvaltningsmyndighetenes behov for metodikk for å kunne avsløre eventuelle genmodifiserte fisk med tilført RFP gen.

5.2. Genmodifisert fisk internasjonalt og i Norge

En rekke fiskearter har blitt genmodifisert, hovedsakelig for forskningsformål eller for å øke produktiviteten innen fiskeoppdrett, for eksempel ved tilførsel av et veksthormongen. Blant arter som er genmodifisert for akvakulturformål er både Atlanterhavslaks (*Salmo salar*), ulike arter av Stillehavslaks (*Oncorhynchus clarki*, *O. keta*, *O. kisutch*, *O. tshawytscha* og *O. masou ishikawae*), Regnbueørret (*O. mykiss*), Harr (*Salvelinus alpinus*), Tilapia (*Oreochromis niloticus*, *O. hornorum*), Roho labeo (*Labeo rohita*), værål (*Misgurnus mizolepis*), Gjedde (*Esox lucius*), Sjøbrasme (*Sparus sarba*), Rød sjøbrasme (*Pagrosomus major*), Dvergmalle (*Ictalurus punctatus*), Afrikansk malle (*Clarias gareipinus*), Indisk malle (*Heteropneustes fossilis*), Vanlig karpe (*Cyprinus carpio*), Catla (*Catla catla*), Indisk karpe (*Cirrihinus mrigala*) og Gullfisk (*Carassius auratis*) (Butler & Fletcher, 2009; Devlin *et al.* 1995; Dunham *et al.* 1999; Gross *et al.* 1992; Guan *et al.* 2008; Lu *et al.* 2009; Lu *et al.* 2002; Martinez *et al.* 1996; Muller *et al.* 1993; Nakamura *et al.* 2009; Nam *et al.* 2001; Pitkanen *et al.* 1999; Rokkones *et al.* 1989; Sarangi *et al.* 1999; Sheela, Pandian & Mathavan, 1999; Zhang *et al.* 1998; Zhu *et al.* 1985). Foreløpig er ingen av disse tillatt brukt i kommersiell produksjon eller markedsført i noe land.

Ulike fluoresensproteiner, både gule, grønne, blå og røde kan nå settes inn i kloningsvektorer og brukes til ulike formål (Saeed & Ashraf, 2009). Genmodifiserte sebrafisk med fluoresensgener ble opprinnelig utviklet av Gong og hans medarbeidere i Singapore (Ju *et al.* 1999) for å effektivisere miljøovervåking i elver og vassdrag. Det ble imidlertid raskt klart at det kommersielle potensialet ved å utvikle selvlysende akvariefisk var betydelig, samtidig som skepsis til utsetting av genmodifisert fisk i naturen var sterk. De første genmodifiserte sebrafiskene fikk tilført GFP, mens RFP og YFP (gult fluoresensgen) kom senere (Gong *et al.* 2003). Senere har Gongs gruppe også genmodifisert to andre arter av akvariefisk ved tilførsel av henholdsvis GFP og RFP gener (japansk risfisk [Medaka], *Oryzias latipes*; Zeng *et al.* 2005), og RFP gen alene (skjørteetra, *Gymnocorymbus ternetzi*; Pan, Zhan & Gong, 2008). For ulike forskningsformål, gjerne knyttet til å kunne følge og måle genuttrykk på en enkel måte, er det utviklet en rekke fusjonsvektorer. Fusjonsvektorer er kloningsvektorer med to (eller flere) funksjonelle gener, hvor særlig GFP gen er vanlig. Innsetting av slike fusjonsvektorer vil resultere i at mottakerdyret blir selvlysende der hvor vektoren er satt inn og uttrykkes. Fluoresens er altså ikke hensikten men midlet til å studere genmodifiseringen i slike fisker.

Det foreligger ingen indikasjoner på at genmodifisert fisk, verken akvariefisk eller oppdrettsfisk, finnes i norske hobbyakvarier eller på det norske markedet. Det er imidlertid god grunn til å være oppmerksom på fenomenet, ikke minst for butikker som selger akvariefisk og akvarieentusiaster med kontakter eller på reiser utenlands. Genmodifisert sebrafisk har blitt innført ulovlig til flere andre europeiske land de senere årene (FERA 2006; 2007). Innførsel og/eller omsetning av genmodifisert fisk er både ulovlig og straffbart. Ved mistanke om forekomst av akvariefisk med tilførte GFP og/eller RFP gener kan metodene som er utviklet og beskrevet i denne rapporten benyttes til å bekrefte eller avkrefte mistanken.

6. Referanser

- Berdal, K.G., Bøydler, C., Tengs, T. & Holst-Jensen, A. (2008). A statistical approach for evaluation of PCR results to improve the practical limit of quantification (LOQ) of GMO analyses (SIMQUANT). *European Food Research and Technology* 227:1149-1157.
- Butler, T. & Fletcher, G. (2009). Promoter analysis of a growth hormone transgene in Atlantic salmon. *Theriogenology* 72(1):62-71.
- Devlin, R., Yesaki, T., Donaldson, E., Du, S. & Hew, C. (1995). Production of germline transgenic Pacific salmonids with dramatically increased growth performance. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 52(7):1376-1384.
- Dunham, R., Chitmanat, C., Nichols, A., Argue, B., Powers, D. & Chen, T. (1999). Predator avoidance of transgenic channel catfish containing salmonid growth hormone genes. *Marine Biotechnology* 1(6):545-551.
- European Network of GMO Laboratories . Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing. http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/Min_Perf_Requir_Analyt_methods_131008.pdf
- FERA - The Food and Environment Research Agency . UK trade in tropical fish and recent GM fish incidents recorded in the UK during 2006. <http://www.gm-inspectorate.gov.uk/gmfish/GMfish2006.cfm> . 2006.
- FERA - The Food and Environment Research Agency . UK trade in tropical fish and recent GM fish incidents recorded in the UK during 2007. <http://www.gm-inspectorate.gov.uk/gmfish/GMfish2007.cfm> . 2007.
- Gong, Z., Wan, H., Tay, T., Wang, H., Chen, M. & Yan, T. (2003). Development of transgenic fish for ornamental and bioreactor by strong expression of fluorescent proteins in the skeletal muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 308(1):58-63.
- Gross, M., Schneider, J., Moav, N., Moav, B., Alvarez, C., Myser, S., Liu, Z., Hallerman, E., Hackett, P., Guise, K., Faras, A. & Kapuscinski, A. (1992). Molecular analysis and growth evaluation of Northern Pike (*Esox lucius*) microinjected with growth-hormone genes. *Aquaculture* 103(3-4):253-273.
- Guan, B., Hu, W., Zhang, T., Wang, Y. & Zhu, Z. (2008). Metabolism traits of 'all-fish' growth hormone transgenic common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture* 284(1-4):217-223.
- Holst-Jensen, A. & Berdal, K.G. (2004). The modular analytical procedure and validation approach and the units of measurement for genetically modified materials in foods and feeds. *Journal of AOAC International* 87(4):927-936.
- Ji, W., Zhou, W., Abruzzese, R., Guo, W., Blake, A., Davis, S., Davis, S. & Polejaeva, I. (2005). A method for determining zygosity of transgenic zebrafish by TaqMan real-time PCR. *Analytical Biochemistry* 344:240-246.
- Ju, B., XU, X., He, J., Liao, J., Yan, T., Hew, C., Lam, T. & Gong, Z. (1999). Faithful expression of green fluorescent protein (GFP) in transgenic zebrafish embryos under control of zebrafish gene promoters. *Developmental Genetics* 25(2):158-167.
- Lu, J., Li, J., Furuya, Y., Yoshisaki, G., Sun, H., Endo, M., Haga, Y., Satoh, S. & Takeuchi, T. (2009). Efficient productivity and lowered nitrogen and phosphorus discharge load from GH-transgenic tilapia (*Oreochromis niloticus*) under visual satiation feeding. *Aquaculture* 293(3-4):241-247.

- Lu, J., Fu, B., Wu, J. & Chen, T. (2002). Production of transgenic silver sea bream (*Sparus sarba*) by different gene transfer methods. *Marine Biotechnology* 4(3):328-337.
- Martinez, R., Estrada, M., Berlanga, J., Guillen, I., Hernandez, O., Cabrera, E., Pimentel, R., Morales, R., Herrera, F., Morales, A., Pina, J., Abad, Z., Sanchez, V., Melamed, P., Lleonart, R. & de la Fuente, J. (1996). Growth enhancement in transgenic tilapia by ectopic expression of tilapia growth hormone. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 5(1):62-70.
- Miljøverndepartementet, Genteknologiloven - LOV 1993-04-02 nr 38: Lov om framstilling og bruk av genmodifiserte organismer m.m. (1993) LOV-1993-04-02-38,
- Muller, F., Lele, Z., Varadi, L., Menczel, L. & Orban, L. (1993). Efficient transient expression system based on square pulse electroporation and in vivo luciferase assay of fertilized fish eggs. *FEBS Letters* 324(1):27-32.
- Nakamura, R., Satoh, R., Nakajima, Y., Kawasaki, N., Yamaguchi, T., Sawada, J., Nagoya, H. & Teshima, R. (2009). Comparative study of GH-transgenic and non-transgenic amago salmon (*Oncorhynchus masou ishikawae*) allergenicity and proteomic analysis of amago salmon allergens. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 55(3):300-308.
- Nakken, S., Aussedat, O., Kristoffersen, A., Holst-Jensen, A. & Tengs, T. (2009). UniquePrimer - a web utility for design of specific PCR primers and probe. *Annals of Microbiology* 59(2):391-393.
- Nam, Y., Noh, J., Cho, Y., Cho, H., Cho, K.-N., Kim, C. & Kim, D. (2001). Dramatically accelerated growth and extraordinary gigantism of transgenic mud loach *Misgurnus mizolepis*. *Transgenic Research* 10(4):353-362.
- Pan, X., Zhan, H. & Gong, Z. (2008). Ornamental expression of red fluorescent protein in transgenic founders of white skirt tetra (*Gymnocorymbus ternetzi*). *Marine Biotechnology* 10(5):497-501.
- Pitkanen, T., Krasnov, A., Teerijoki, H. & Molsa, H. (1999). Transfer of growth hormone (GH) transgenes into Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) - I. Growth response to various GH constructs. *Genetic Analysis - Biomolecular Engineering* 15(3-5):91-98.
- Postlethwait, J., Amores, A., Force, A. & Yan, Y. (1999). The zebrafish genome. *Methods in Cell Biology* 60:149-163.
- Rehbein, H. & Bogerd, J. (2007). Identification of Genetically Modified Zebrafish (*Danio rerio*) by Protein- and DNA-Analysis. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 2(2):122-125.
- Rokkones, E., Alestrom, P., Skjervold, H. & Gautvik, K. (1989). Microinjection and expression of a mouse metallothionein human growth hormone fusion gene in fertilized salmonid eggs. *Journal of Comparative Physiology B - Biochemical Systemic and Environmental Physiology* 158(6):751-758.
- Rønning, S.B., Berdal, K.G., Andersen, C.B. & Holst-Jensen, A. (2006). Novel reference gene, *PKABA1*, used in a duplex real-time polymerase chain reaction for detection and quantitation of wheat- and barley-derived DNA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:682-687.
- Saeed, I. & Ashraf, S. (2009). Denaturation studies reveal significant differences between GFP and blue fluorescent protein. *International Journal of Biological Macromolecules* 45:236-241.
- Sarangji, N., Mandall, A., Bandyopadhyay, A., Venugopal, T., Mathavan, S. & Pandian, T. (1999). Electroporated sperm mediated gene transfer in Indian major carps. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 7(2):151-158.
- Sheela, S., Pandian, T. & Mathavan, S. (1999). Electroporatic transfer, stable integration, expression and transmission of pZp beta ypGH and pZp beta rtGH in Indian catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Aquaculture Research* 30(4):233-248.

- Sissener, N., Johannessen, L., Hevrøy, E., Wiik-Nielsen, C., Berdal, K., Nordgreen, A. & Hemre, G. (2009). Zebrafish (*Danio rerio*) as a model for investigating the safety of GM feed ingredients (soya and maize); performance, stress response and uptake of dietary DNA sequences. *British Journal of Nutrition* in press.
- Zeng, Z., Liu, X., Seebah, S. & Gong, Z. (2005). Faithful expression of living color reporter genes in transgenic medaka under two tissue-specific zebrafish promoters. *Developmental Dynamics* 234(2):387-392.
- Zhang, P., Xu, Y., Liu, Z., Xiang, Y., Du, S. & Hew, C. (1998). Gene transfer in red sea bream (*Pagrosomus major*). In *New developments in marine biotechnology*, pp. 15-18. (Eds Y. LeGal and H. Halvorson). New York: Plenum Press.
- Zhu, Z., Li, G., He, L. & Chen, S. (1985). Novel gene transfer into the fertilized eggs of gold fish (*Carassius auratus* L. 1758). *Journal of Applied Ichthyology* 1(1):31-34.



Veterinærinstituttet er et nasjonalt forskningsinstitutt innen dyrehelse, fiskehelse, mattrygghet og dyrevelferd med uavhengig forvaltningsstøtte til departementer og myndigheter som primæroppgave. Beredskap, diagnostikk, overvåking, referansefunksjoner, rådgivning og risikovurderinger er de viktigste virksomhetsområdene.

Veterinærinstituttet har hovedlaboratorium i Oslo og regionale laboratorier i Sandnes, Bergen, Trondheim, Harstad og Tromsø, med til sammen ca. 360 ansatte.

www.vetinst.no

Tromsø

Stakkevollvn. 23 b · 9010 Tromsø
9010 Tromsø
t 77 61 92 30 · f 77 69 49 11
vitr@vetinst.no

Harstad

Havnegata 4 · 9404 Harstad
9480 Harstad
t 77 04 15 50 · f 77 04 15 51
vih@vetinst.no

Bergen

Bontelabo 8 b · 5003 Bergen
Pb 1263 Sentrum · 5811 Bergen
t 55 36 38 38 · f 55 32 18 80
post.vib@vetinst.no

Sandnes

Kyrkjeve. 334 · 4325 Sandnes
Pb 295 · 4303 Sandnes
t 51 60 35 40 · f 51 60 35 41
vis@vetinst.no

Trondheim

Tungasletta 2 · 7047 Trondheim
7485 Trondheim
t 73 58 07 27 · f 73 58 07 88
vit@vetinst.no

Oslo

Ullevålsveien 68 · 0454 Oslo
Pb 750 Semtrum · 0106 Oslo
t 23 21 60 00 · f 23 21 60 01
post@vetinst.no

