

Vinnsla og vöruþróun
Processing and Product
Development

Líftækni
Biotechnology



Matvælaöryggi
Food Safety



Kyngreining fiska

Sigurlaug Skírnisdóttir
Eiríkur Briem
Hlynur Sigurgíslason
Guðmundur Ó. Hreggviðsson
Sigríður Valgeirsdóttir
Jónas Jónasson
Sigríður Hjörleifsdóttir

Líftækni

Skýrsla Matís 42-07
Nóvember 2007

ISSN 1670-7192



<i>Titill / Title</i>	Kyngreining fiska		
<i>Höfundar / Authors</i>	Dr. Sigurlaug Skírnisdóttir, Msc. Eiríkur Briem, Msc. Hlynur Sigurgíslason, Dr. Guðmundur Ó. Hreggviðsson, Dr. Sigríður Valgeirsdóttir, Dr. Jónas Jónasson, og Dr. Sigríður Hjörleifsdóttir		
<i>Skýrsla / Report no.</i>	42-07	<i>Útgáfudagur / Date:</i>	Nóvember 2007
<i>Verknr. / project no.</i>	1006		
<i>Styrktaraðilar / funding:</i>	Tækniþróunarsjóður (Rannsóknamiðstöðvar Íslands)		
<i>Ágrip á íslensku:</i>	<p>Markmið verkefnisins var að finna kynbundinn mun á milli erfðafnis hængs og hrygnu í laxi, lúðu og þorski. Þessar upplýsingar átti síðan að nota til að þróa kyngreiningarpróf fyrir þessar fisktegundir. Útbúin voru genasöfn fyrir hæng og hrygnu fyrir tegundirnar þrjár með frádráttarpörum. Raðirnar sem fengust í genasafninu voru raðgreindar, þreifarar útbúnir eftir þeim og þær síðan settar á örflögur. Síðan voru flögurnar þáttaparaðar við erfðafni við hænga og hrygnur og bindingin metin fyrir kynin. Í verkefninu fólst mikið tæknilegt og markaðslegt nýnæmi þar sem raðað var saman hátækniaðferðum úr sameindaerfðafræði og upplýsingatækni til að leysa fyrirliggjandi markaðslegt vandamál í kyngreiningu í fiskeldi. Áhættan í verkefninu fólst í því hvort nægilegur kynjamunur sé í erfðamengi þessara fiska til að greina hann með flögugreiningum. Þetta verkefni var mikil áskorun og þótt lokamarkmiðið hafi ekki náðs þá gekk það upp hvað varðar aðferðafræðina og mikilla niðurstaðna var aflað. Verkefnið var því mikilvægt fyrir þroska og aðferðaþróun innan fyrirtækjanna Stofnfisks, Matis-Prokaria og Nimblegen Systems á Íslandi.</p>		
<i>Lykilorð á íslensku:</i>	Kyngreining, lax, lúða, þorskur, örflögur, genasafn, frádráttarpörum		
<i>Summary in English:</i>	<p>The goal of the project was to develop a sex determination method for the three fish species, cod, salmon and halibut. Gene libraries for female and male fishes were produced for the three fish species by using the subtraction hybridization method from whole genomic DNA. Probes were designed for all the sequences obtained and the probes were put on microarrays. The microarrays were hybridized with DNA from both male and female fishes and the difference scored. The risk of the project was to determine if there is enough gene difference between the sexes of these three fish species to be analysed by using microarrays. The project did not reveal sex determination genes but this assignment was a big challenge for the three companies Stofnfiskur, Matis-Prokaria and Nimblegen Systems. Many new methods and technical solutions were solved during the project and a large set of results were built up. The project was an important part of the fast growing and development of the companies.</p>		
<i>English keywords:</i>	Sex determination, salmon, cod, halibut, microarray, gene library, subtraction hybridization		



Kyngreining fiska

Dr. Sigurlaug Skírnisdóttir, Msc. Eiríkur Briem, Msc. Hlynur Sigurgíslason, Dr. Guðmundur Ó. Hreggviðsson, Dr. Sigríður Valgeirsdóttir, Dr. Jónas Jónasson, og Dr. Sigríður Hjörleifsdóttir

Nóvember 2007

EFNISYFIRLIT

1. INNIHALD SKÝRSLUNNAR.....	1
2. INNGANGUR.....	2
3. EFNI OG AÐFERÐIR	4
3.1 Val á fiskum úr þremur tegundum fyrir gerð genasafna og fyrir þáttapörun.....	4
3.2 Auðgun kynbundins DNA og gerð genasafna.....	4
3.3 Raðgreiningar á genasöfnum og hönnun þreifara	6
3.4 Þróun á tækni til smíði á flögum með langa DNA þreifara (Nimblegen).....	6
3.5 Þrjár flögur fyrir lax: TIGR-EST þreifarar, þekkt kyntengd gen úr ýmsum lífverum og auðgaðar raðir	7
3.6 Flaga fyrir þorsk	7
3.7 Flaga fyrir lúðu	8
3.8 Undirbúningur DNA sýna og þáttapörun á flögur	8
3.9 Úrvinnsla gagna	9
3.10 Genaleit eftir flögugreiningu.....	10
3.11 Bandamunur hjá lúðu milli hængs og hrygnu.....	10
3.12 Greiningaraðferð stöðluð og prófuð.....	10
4. NIÐURSTÖÐUR.....	11
4.1 Val á fiskum úr þremur tegundum fyrir gerð genasafna og fyrir þáttapörun.....	11
4.2 Auðgun kynbundins DNA og gerð genasafna.....	11
4.3 Raðgreiningar á genasöfnum og hönnun þreifara	11
4.4 Þróun á tækni til smíði á flögum með langa DNA þreifara.....	12
4.5 Þrjár flögur fyrir lax: TIGR-EST þreifarar, þekkt kyntengd gen úr ýmsum lífverum og auðgaðar raðir	12
4.6 Flaga fyrir þorsk	13
4.7 Flaga fyrir lúðu	13
4.8 Þáttapörun á fiska-DNA og úrvinnsla úr flögum.....	15
4.9 Genaleit eftir flögugreiningu.....	16
4.10 Bandamunur hjá lúðu milli hængs og hrygnu.....	16
4.11 Greiningaraðferð stöðluð og prófuð.....	17
5. UMRÆÐUR.....	18
6. HEIMILDIR.....	20

1. INNIHALD SKÝRSLUNNAR

Þetta er lokaskýrsla verkefnisins “**Kyngreining fiska**” (verkefnisnúmer 041221005) sem skilað er til **Tækniþróunarsjóðs (Rannsóknamiðstöðvar Íslands)**.

Samstarfsaðilar verkefnisins voru Matís-Prokaria, Nimblegen Systems á Íslandi og Stofnfiskur hf.

Afrakstur verkefnisins er eftirfarandi:

1. Þrjú genasöfn af kyn auðguðu DNA úr laxi, þorski og lúðu (hvert safn með um 7000-9000 klóna).
2. Raðgreining á um 6000-7000 klónum úr hverju genasafni (fyrir lax, þorsk og lúðu).
3. Smíði á flögum með kyn auðguðum röðum úr laxi, þorski og lúðu.
4. Smíði á flögu með áður birtum laxaröðum.
5. Þáttapörun á laxa-, þorska- og lúðuflogum og greining gagna.
6. Þróun á aðferðum til þáttapörunar á flögu og greiningu gagna.
7. Endurbætt tækni til smíði á DNA flögum
8. Úrvinnsla á niðurstöðum af flögugreiningu fyrir lax, þorsk og lúðu.
9. Könnun á aðgreiningu milli kynja á völdum röðum fyrir lax, lúðu og þorsk.
10. Menntun og þjálfun ungra vísindamanna.

2. INNGANGUR

Eldisrými skiptir miklu máli í klakfiskaeldi. Markmið verkefnisins var að þróa greiningaraðferð til að kyngreina helstu tegundir eldisfiska snemma á æviskeiði þeirra. Mikil þörf er fyrir slíkt í hrognaframleiðslu þar sem verulegur ávinningur er af því að ala eingöngu hrygnur. Hængar verða t.d. kynþroska yngri en hrygnur og vaxa því hægar. Kyngreining snemma á æviskeiði myndi koma í veg fyrir tjón af þessum völdum með því að fækka hængum og stórauka framleiðslugetu. Núna er lax kyngreindur með sónar þegar hann er um 1 kg að þyngd og þ.a.l. væri mikill sparnaður í því að hreinsa hænga frá í eldiskerjum mun fyrr en nú er mögulegt. Það sama á við í lúðu- og þorskeldi.

Margbreytileg kynákvörðandi kerfi eru í fiskum og það er jafnvel mikill munur á milli skyldra tegunda þar sem kynákvörðunarkerfi virðast hafa þróast með mismikið ákvörðunarvægi erfðapátta og umhverfis (Devlin et al. 2002). Erfðapættir eru samt fæstir þekktir og rannsóknir hafa sýnt fram á að þeir geta verið mismunandi milli skyldra tegunda. Þá er oft um að ræða flókið samspil erfða, umhverfis og jafnvel atferlis, eins og hitastigs og samsetningar stofnsins (Baroiller et al. 2001). Í öðrum tegundum virðist kynákvörðunin algjörlega arfbundin og hefur í sumum tilvikum tekist að greina fasta kynlitninga eða kynákvörðandi svæði á litningum. Fjöldi tilbrigða er síðan við þetta og af þessu leiðir að gríðarlegur fjölbreytileiki finnst í kynákvörðun meðal fiska (Kondo et al. 2002).

Afar takmörkuð vitneskja er fyrirbyggjandi um kynákvörðandi kerfi hjá laxi, þorski og lúðu. Við samanburð á kynákvörðandi þáttum í ætt laxfiska kom fram að mismunandi Y litningar höfðu þróast í mismunandi tegundum. Lítil munur virðist vera á kynlitningum þessara tegunda og kynákvörðandi svæði vera lítil og á mismunandi litningum. Þar sem hænggerðar hrygnur gefa bara af sér hrygnur er talið víst að í laxinum sé erfðafræðilega kynákvörðandi gen eða litningur (Woram et al. 2003). Engin vitneskja er um tilvist kynlitninga eða kynákvörðandi gena í þorski eða lúðu. Þessir fiskar halda þó kyni sínu alla ævi þannig að líklegt þykir að kynákvörðun þeirra sé erfðafræðileg.

Hægt er að framleiða eingöngu hrygnur í fiskeldi með því að gefa hrygnum methyltestosteron hormón við frumfóðrun. Við kynþroska framleiða slíkar hrygnur svil. Með því að frjóvga hrogn með svilum undan hæggerðum hrygnum verða öll afkvæmin hrygnur. Ókostur við þessa aðferð í kynbótastarfinu er að það lengir ættliðabilið. Hingað til hefur hormónanotkun verið leyfð á undanþágu vegna hæggeringu á hrygnum til svilaframleiðslu. Gert er ráð fyrir að öll hormónanotkun í matvælaíðnaði verði bönnuð í framtíðinni þó svo hún tengist ekki framleiðslu á matfiski heldur klakfiski (El-Zaeem et al. 2006).

Frádráttar-pörun á erfðaeefni (subtractive hybridization) er notuð til að einangra frá DNA raðir eða svæði sem eru til staðar í einu erfðamengi en ekki í öðru náskyldu. Þessi aðferð hefur verið mikið notuð, sérstaklega í mannfæðisfræði, til að einangra erfðaeefni sem t.d. hefur tapast úr æxlisvef borið saman við heilbrigðan vef (Sagerstrom et al. 1997). Aðferðin gengur í stórum dráttum út á það að tveimur erfðamengjum er þáttarað saman. Erfðamengið (DNA- driver) sem talið er vanta það svæði sem einangra á er látið “draga út úr” hinu erfðamenginu (tester-DNA) það sem sameiginlegt er milli erfðamengjanna. Driver sýnið dregur út allt sem er sameiginlegt milli sýnanna og þá er mismunurinn einn eftir. Þennan mismun má einangra og greina á einn eða annan hátt eftir PCR mögnun (Akopyants et al. 1998; Lisitsyn et al. 1994a; Lisitsyn et al. 1994b). Helsta vandamál þessarar aðferðar er að bakgrunnur er óhjákvæmilegur þegar unnið er með svo stórum erfðamengi (billjón basapör). Kostirnir felast aftur á móti í auðgunarþættinum sem margfaldar líkurnar á að fá DNA sem einungis er til staðar í öðru kyninu (Cho et al. 1998).

Áhættan í verkefninu fólst þess vegna í því hvort nægilegur kynjamunur sé í erfðamengi þessara fiska til að greina hann með þessum aðferðum. Niðurstaðan var sú að einungis einstaklingsmunur greindist en ekki fastur kynbundinn munur.

3. EFNI OG AÐFERÐIR

3.1 Val á fiskum úr þremur tegundum fyrir gerð genasafna og fyrir þáttapörun

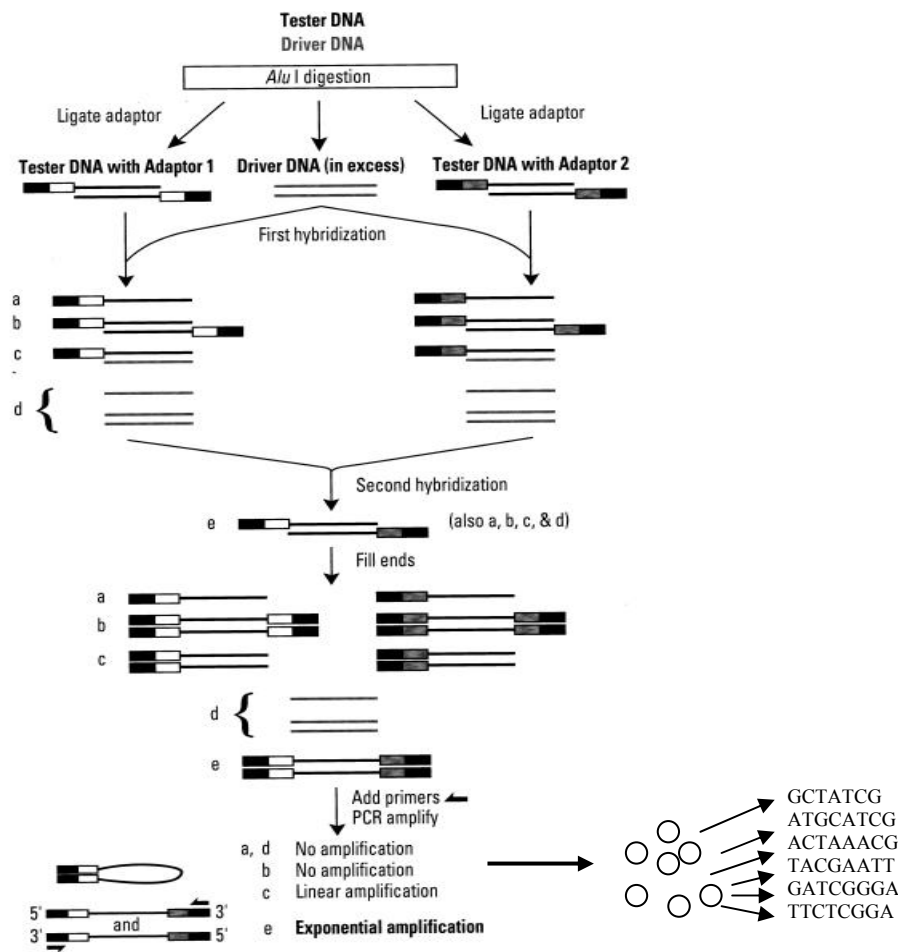
Mikilvægt var að hafa fiskana, sem notaðir voru til að útbúa genasöfnin, sem skyldasta til að minnka áhrif sem orsakast af einstaklings erfðabreytileika. Þess vegna voru systkini (hængur og hrygna) fengin frá fiskeldisstöðvum en fiskarnir þar eru merktir og foreldranir þekktir. Eitt systkini var fengið fyrir hverja tegund til að útbúa genasöfnin

Fyrir þáttapörun á flögurnar þurfti DNA úr bæði skyldum og óskyldum pörum. Fyrir laxinn var útbúin sérstök *Prokaria* fjölskylda þar sem hálf-systkinum af laxi var parað saman til að auka enn skyldleika sýnanna sem unnið var með. Einnig voru laxaflögurnar þáttaparaðar með einu óskyldu pari og tveimur öðrum systkinapörum, en annað systkinaparið var það saman og notað var við gerð genasafnsins. Þorskaflagan var þáttapöruð með tveimur systkinapörum og einu óskyldu pari, en annað systkinaparið var það saman og notað var við gerð genasafnsins. Lúðuflagan var þáttapöruð með einu systkinapari og tveimur óskyldum pörum, en systkinaparið var það saman og notað var við gerð genasafnsins.

3.2 Auðgun kynbundins DNA og gerð genasafna

Tálkn voru klippt úr eldisfiskunum og þau sett í 90% ETOH. DNA var einangrað með Puregene DNA Isolation Kit (Gentra) samkvæmt leiðarvísi fyrir vefi. Auðgun á DNA mismun í erfðamengi kynjanna með frádráttarpörun (subtractive hybridization) var gerð bæði fyrir hænga og hrygnu fyrir allar tegundirnar þrjár þar sem ekki var þekkt hvort kynadgreinandi svæði væru í hængum eða hrygnum fyrir tegundirnar þrjár. Notuð var auðgunaraðferð frá ClonTech, PCR-Select Differential Screening (Mountain View, Kalifornía, USA). Í stórum dráttum gengur aðferðin út á það að tveimur erfðamengjum er þáttaparað saman. Erfðamengið (DNA- driver) sem talið er vanta það svæði sem einangra á er látið “draga út úr” hinu erfðamenginu (tester-DNA) það sem sameiginlegt er milli erfðamengjanna. Driver sýnið dregur út allt sem er sameiginlegt milli sýnanna og þá er mismunurinn einn eftir. Þennan mismun má einangra eftir PCR mögnun (sjá mynd 1). Þetta auðgaða erfðaefti (fyrir hvort kyn; 3 tegundir) var síðan límt inn í Topo-

TA genaferju og ummyndað inn í TOP10 frumur (Invitrogen, Carlsbad, CA). Klónarnir voru pikkaðir í 96 holu bakka sem innihéldu 100 µl af LB-æti með ampicillini og þeir síðan ræktaðir upp yfir nótt við 37°C. Daginn eftir voru klónarnir settir í 18% glýseról og frystir við -80°C (Sambrook et al. 2001).



Tvöföld þáttapörun er gerð til að fá sem mesta auðgun Tester -DNA

Frádráttur sameiginlegs DNA skilur að mestu eftir Tester DNA

Seinni þáttapörun er gerð til að fá meiri auðgun á Tester- DNAinu

Fyllt er uppí enda

PCR mögnum

Klónun og “shotgun” DNA raðgreining á auðguðu Tester-DNA til gerðar á DNA flögu

Mynd 1. Aðferðafræði frádráttarpörunar.

3.3 Raðgreiningar á genasöfnum og hönnun þreifara

Innskotin í genaferjunum voru mögnuð upp með vísunum M13F og M13R. Síðan voru mögnunarafurðirnar raðgreindar en raðgreiningahvörfin voru gerð með BigDye terminators version 3.1v samkv. leiðbeiningum frá framleiðanda (Applied Biosystems, Foster City, CA). ABI PRISM 3730 raðgreinir var notaður í greininguna (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Eftir raðgreiningu voru raðgreiningagögnin flutt yfir í forritið Sequencher (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA). Þar voru raðirnar skoðaðar, lélegum röðum hent út, ferju- og tengiraðir klipptar af og röðum samraðað. Raðirnar voru síðan sendar til Nimblegen í Madison, Wisconsin USA og þar voru útbúnir þreifarar eftir röðunum. Hver röð var notuð til “fulls”, þ.e. búnir voru til þreifarar eftir allri röðinni og þeir látnir skarast um 10-20 basa. Útbúnir voru bæði fram (forward) og aftur (reverse) þreifarar af hverri röð til að auka næmni og minnka hættu á falskjákvæðum sýnum.

3.4 Þróun á tækni til smíði á flögum með langa DNA þreifara (Nimblegen)

Sótt var um styrk til þróunar og smíði á nýrri MAS vél til framleiðslu á DNA flögum með mikinn fjölda (385.000) og langa þreifara (60-80 basar). Smíði þreifara sem eru 60-80 basapör kallar á mikla nákvæmni í fókus og umhverfi véla. Hönnunar og þróunarvinna fór að mestu fram á tæknideild Nimblegen Systems í Madison, Wisconsin en starfsmaður hjá Nimblegen á Íslandi fór til Madison í 1-2 vikur til að læra á vélina og vinna við prófanir og uppfærslu. Síðan var vélin tekin í sundur og flutt til Íslands þar sem hún var sett saman aftur og prófuð frekar. Tölvubúnaður var tengdur við vélina og hún síðan prufukeyrð með tilraunaflögum. Einnig voru gerðar margvíslegar aðrar breytingar, m.a. á loftræstikerfi í vélaherbergi og skipt var um festingar fyrir speglakerfið í þeim tilgangi að gera það stöðugra en í festingarnar var notað Invar efni sem er mjög stöðugt m.t.t hitasveiflna. Að auki var 6 ása stillingu fyrir örspegla bætt við en hún býður upp á mun nákvæmari og markvissari stillingu, peruhúsið kringum útfjólubláu peruna var einangrað betur í þeim tilgangi að draga úr áhrifum lampans á örspeglakerfið, efnahólfíð þar sem þreifarasmiðin fer fram var einangrað frá speglakerfinu til að minnka hættu vegna leka og að gufur frá efnunum setjist á speglana.

Fyrst var ein vél sett í þessar breytingar en þegar hún var farin að virka vel þá voru fleiri vélar uppfærðar. Í kjölfarið voru nýjar vélar smíðaðar skv. þessari tækni.

3.5 Þrjár flögur fyrir lax: TIGR-EST þreifarar, þekkt kyntengd gen úr ýmsum lífverum og auðgaðar raðir

Útbúnar voru þrenns konar flögur fyrir laxinn og þreifararnir á þeim voru af þrenns konar uppruna. Í fyrsta lagi var lögð mikil vinna í að leita að þekktum kyntengdum genum og svæðum í öðrum fiskategundum og öðrum lífverum á netinu og í fræðigreinum. Þessi gen (102) voru sett á fyrstu flöguna (Flaga 1) en að auki voru þreifarar útbúnir eftir 119 röðum sem fengust úr fyrstu frádráttarpöruninni hjá Prokaria. Alls voru þreifarapör um 48.000 talsins en hvert þreifarapar var endurtekið 6 sinnum á flögunni. Þessi flaga var þáttapöruð við alsystkini.

Í öðru lagi voru útbúnir þreifarar eftir laxfiskaröðum úr gagnabanka “The Institute for Genomic Research” (TIGR) (www.tigr.org) en þeir fóru á Flögu 2. Við völdum þær EST raðir sem hafa hingað til hafa verið raðgreindar úr laxi og verið staðfestar af fleiri en einum aðila. Þetta voru alls rúmlega 4000 raðir af mismunandi lengd en meðallengdin var 1007 bp. Þessir þreifarar urðu alls 385.000 eða 192.525 þreifarar í hvora átt og alls voru rúmlega fjögur milljón basapör greind á þessari flögu en hver röð var höfð í sexriti. Þessi flaga var þáttapöruð við alsystkini.

Á Flögu 3 voru einungis settar raðir sem upprunnar voru úr frádráttarpöruninni fyrir hæng og hrygnu (hængur 2360 og hrygna 3578). Alls voru 91.888 þreifarar á flögunni og hver þeirra smíðaður tvisvar og í báðar áttir (367.552) en alls voru 1.908.847 bp greind. Þessi flaga var þáttapöruð við tvö alsystkinapör, eitt óskilyt þar og síðan við Prokaria fjölskylduna (sjá lið 3.1).

3.6 Flaga fyrir þorsk

Ein flaga var útbúin fyrir þorskin og þreifararnir voru úr frádráttarpöruninni fyrir bæði hæng og hrygnu. Efniviðurinn voru tæplega 5000 raðir sem fengust úr greiningunni á undan og meðallengd raða var 390 basar. Úr þessum upplýsingum voru hannaðir um 90.000 þreifarar og hver þreifari var um 50 basar að lengd. Þreifaranir voru smíðaðir með “tiling” aðferð þannig að þreifarar sköruðust um 20 basa millibili. Að auki voru þreifarar smíðaðir í báðar áttir (forward og reverse) til að auka nákvæmni. Alls voru

rúmlega 1,7 milljón basapör greind á þessari flögu. Þrjár flögur af þessari gerð voru smíðaðar og voru þær þáttaparaðar með tveimur systkinapörum og einu óskyldu pari.

3.7 Flaga fyrir lúðu

Ein flaga var útbúin fyrir lúðuna og þreifarnir voru úr frádráttarpöruninni fyrir bæði hæng og hrygnu. Lúðuflagan var hönnuð úr 2983 DNA röðum sem fengust úr frádráttarpöruninni. Meðallengd raða var 385 basar. Úr þessum upplýsingum voru hannaðir 67 303 þreifarar með 10 basapara skörun. Hver þreifari kom fyrir tvisvar sinnum í hvora átt (forward og reverse). Alls voru rúmlega 670.000 basapör greind á þessari flögu. Þrjár flögur voru smíðaðar af þessari tegund og voru þær paraðar við DNA úr einu systkinapari og tveimur óskyldum pörum en ekki var mögulegt að fá annað systkinapar.

3.8 Undirbúningur DNA sýna og þáttapörun á flögur

Hágæða DNA var einangrað úr tálknum úr laxi, þorski og lúðu með Puregene DNA Isolation Kit (Gentra) samkvæmt leiðarvísi fyrir vefi. DNA var síðan merkt og magnað upp og parað við DNA flögurnar sem lýst er í liðum 3.5, 3.6 og 3.7. Þegar verkefnið fór af stað fyrir þrem árum var verið að þróa hjá Nimblegen, nýja aðferð til samanburðagreininga á DNA. Þessi aðferð er kölluð CGH (comparative genome hybridisation) og nýtist hún einkar vel til að skoða breytileika milli genamengja, sem breytingar á erfðaefninu (mögnun, úrfellingar o.fl.). Þróun á sýnavinnslu og þáttapörun í þessu verkefni hefur haldist í hendur við þróun aðferðarinnar á síðustu þrem árum.

Í undirbúningi sýna fyrir fyrstu flögurnar (laxaflögur 1 og 2) var notuð svokölluð biotinmerking á sýnum en þá var erfðaefnið magnað upp og endamerkt með biotinmerktum bösum. Styrkur þáttapörunarinnar var metinn með því að láta biotinmerkt DNA bindast við Streptavidin tengt flúormerki sem síðan var greint með ljósmælingu (skönnun). Þegar kom að undirbúningi sýna fyrir Flögu 3, voru gerðar breytingar á undirbúningi í þeim tilgangi að fá betri mögnun og merkingu á DNA sýnum. Meginbreytingin var sú að í stað þess að merkja með biotini, þá var farið í það að merkja beint með flúorljómandi efnum (Cy3 og Cy5) með svonefndri “random primer aðferð”. Erfðaefni fiskanna var fyrst magnað upp (whole genome labeling) og DNA kynjanna síðan merkt með sitt hvorum flúorljómandi litnum (Cy3/Cy5) sem

greinist við mismunandi bylgjulengd í ljósmælingu (skönnun). Þetta merкта erfðaeefni var síðan bútað niður í 50-200 basa búta og látið þáttaparast við þreifarana á flögnum. Þar sem þáttapörun varð á milli þreifara og erfðaefnis fiskanna, kom fram flúorljómandi merki sem var greint með ljósmælingu (skönnun). Styrkur merkisins við sitt hvora bylgjulengdina sagði til um hvort DNA úr öðru eða báðum kynjum var að bindast við þreifarana. Þessi aðferð til merkingar á sýnum var eins og áður sagði notuð á vinnslu sýna fyrir laxaflögu númer 3 en einnig í undirbúningi sýna fyrir lúðu- og þorskaflögur. Annar kostur “random primer” merkingarinnar er sá að hér eru tvö sýni sett á eina flögu. Þar sem sýnin eru merkt með sitt hvorum litnum, er hægt að bera saman flúorljómun beggja sýna í einni tilraun. Í biotin merkingunum fór hins vegar eitt sýni á hverja flögu og samanburður á flúorljómun gerður eftir á. Með random prime merkingu verður því minni breytileiki í gögnum.

Þegar unnið var með DNA sýni úr lúðu kom í ljós að DNA-ið var talsvert niðurbrotið og jafnvel mengað af RNA. Til að auka líkur á góðri merkingu var prófað að setja þau í gegnum auka hreinsunarskref. Þá voru sýnin brotin niður með sónikeringu, meðhöndluð með RNasa A og RNasa H og síðan hreinsuð með súluhreinsun (QIAquick PCR Purification Kit). Súluhreinsunin tryggði að ekki væru ensím eða hindrandi efni í DNA sýnunum sem gætu haft áhrif á Cy3/Cy5 merkingu sýnanna.

3.9 Úrvinnsla gagna

CGH aðferðin sem þróuð hefur verið hjá Nimblegen byggir á því að genamengi viðkomandi tegundar sé þekkt og er sú raðgreining notuð til grundvallar við smíði flögunnar. Genamengi lax, þorsks og lúðu er hins vegar ekki þekkt og það gerði bæði hönnun á flögu og greiningu gagna flóknari en ella.

Niðurstöður þáttapörunar voru skoðaðar með tölfræðiprófum eins og aðhvarfsgreiningu þar sem leitað var að svæðum sem sýndu kynbundinn mun í öllum tegundunum þremur. Hverri raðgreindri röð var skipt niður í marga þreifara á flögnum, hver þreifari var smíðaður í báðar áttir og auk þess var hver þreifari hafður í 2-6 eintökum á flögnum. Eftir þáttapörun var niðurstöðum fyrir hvern þreifara skellt saman í eitt meðalgildi og raðirnar bornar saman milli kynja. Ef munur á hlutfalli kynjanna var

+2 í log skala, þá var fjórfaldur munur milli þeirra DNA raða en ef munurinn var 1 – 2 í log skala, þá var 2-4 faldur munur á milli kynja. Þessi log munur var skoðaður fyrir hverja einustu röð fyrir allar tegundirnar, bæði með hjálp skimunarforrits og eins handvirkt.

3.10 Genaleit eftir flögugreiningu

Þær raðir sem sýndu mismunandi bindingu við annað kynið voru valdar úr og raðgreiningarnar á bak við þreifarana skoðaðar. Þær raðir sem þóttu áhugaverðar í laxi og þorski voru valdar út og vísar útbúnir sitt hvoru megin við áhugaverða svæðið. Vísarnir voru síðan notaðir til að magna upp svæðið á milli þeirra í hængum og hrygnum. Mögnunarafurðin var síðan sett á agarósagel og athugað hvort stærðarmunur var á milli mögnunarafurða uppruna úr hængum og hrygnum. Mögnunarafurðirnar voru einnig raðgreindar ýmist beint (með PCR vísunum) eða eftir klónun (M13F og M13R) og athugað hvort einhver fastur breytileiki var til staðar á milli hænga og hrygna þegar fleiri einstaklingar voru skoðaðir. Aðferðafræði fyrir klónun og raðgreiningar er að finna í liðum 3.2 og 3.3.

3.11 Bandamunur hjá lúðu milli hængs og hrygnu

Greinilegt var að mismunandi bandamunstur kom fram hjá hæng og hrygnu í frádráttarpöruninni og þess vegna var ákveðið að klóna og raðgreinda böndin beint þótt þetta hafi ekki verið í upphaflegu umsókninni. Athugað var með raðgreiningu hvort einhver fastur breytileiki var til staðar á milli hænga og hrygna. Aðferðafræði fyrir klónun og raðgreiningar er að finna í liðum 3.2 og 3.3.

3.12 Greiningaraðferð stöðluð og prófuð

Þar sem ekki fundust raðir eða gen sem gáfu greinilegan mun á milli allra skoðaðra hænga og hrygna í tegundunum þremur, þá var ekki farið í þennan hluta.

4. NIÐURSTÖÐUR

4.1 Val á fiskum úr þremur tegundum fyrir gerð genasafna og fyrir þáttapörun

Ákveðið var að nota kyngreind alsystkini af öllum tegundunum þremur (laxi, þorski og lúðu) við gerð genasafnanna. Stofnfiskur útvegaði sýni úr laxa- og þorskeldisstofni sínum og afhenti Prokaria kyngreinda einstaklinga af báðum kynjum. Kyngreind lúðu alsystkini voru fengin hjá fiskeldisstöðinni Fiskey.

4.2 Auðgun kynbundins DNA og gerð genasafna

Hágæða DNA var einangrað úr alsystkinum fyrir allar tegundirnar þrjár. DNAið þurfti að vera mjög hreint og var lögð nokkur vinna í það að fá það af bestu gæðum. Einnig þurfti að leggja mikla vinnu í það að láta frádráttaraðferðina ganga og fá góð genasöfn en það þurfti að prófa ýmsar samsetningar í hitastigi, styrk af DNA o. fl. Systkina DNA var þáttaparað saman og það DNA sem ekki þáttaparaðist var dregið út (auðgað). Með þessari aðferð voru tvö genasöfn útbúin fyrir hverja tegund, þ.e. annars vegar var auðgað fyrir því sem var bara í hæng og hins vegar fyrir því sem var einungis hrygnu. Þetta var veruleg viðbót við það sem gert var ráð fyrir í styrkumsókn. Útbúin voru genasöfn fyrir tegundirnar þrjár og innihélt hvert þeirra 7000-9000 klóna. Það þurfti að eyða meiri tíma í að útbúa góð genasöfn fyrir lúðuna en fyrir hinar tegundirnar tvær. Engin skýring er á því en erfitt var að eiga við lúðu DNAið og fá gott genasafn.

4.3 Raðgreiningar á genasöfnum og hönnun þreifara

Eftir raðgreiningu voru allar raðirnar yfirfarnar í forritinu Sequencher, lélegum röðum hent út og ferju- og tengiraðir voru klipptar af. Að þessu loknu var öllum röðum samraðað þannig að raðir sem voru skyldari en 96% fóru saman. Úr þessum samröðunum var besta röð valin og hún notuð í framhaldinu. Stærstur hluti raðanna samraðaðist ekki. Útbúnar voru Fastaskrár fyrir raðirnar þar sem fram kom í nafninu tegund (lax, þorskur eða lúða) og hvort þetta væri hængur eða hrygna auk númers bakka og holu. Raðirnar voru síðan sendar til Nimblegen á Íslandi. Alls voru 7520 klónar raðgreindir í laxinum en eftir samröðun voru tæplega 6000 raðir (hængur 2360 og

hrygna 3578) settar á Flögu 3 og 119 raðir settar á Flögu 1. Alls voru 6638 raðir raðgreindar í þorskinum (hængur 3404 og 3234 hrygna) en eftir samröðum og lagfæringar voru tæplega 5000 raðir (4809) settar á þorskafloguna. Í lúðunni voru raðgreindir 4032 klónar fyrir hrygnuna en 3552 klónar fyrir hænginn. Á sama hátt og erfitt reyndist að útbúa genasöfn fyrir lúðuna, þá gengu raðgreiningarnar illa og í sumum tilvikum þurfti endurtekningar á bökkunum til að fá góðar raðgreiningar. Alls voru 2983 raðir settar á lúðuflöguna.

4.4 Þróun á tækni til smíði á flögum með langa DNA þreifara

Með margvíslegum breytingum á MAS vélum Nimblegen Systems á Íslandi var hægt að framleiða flögur með 385.000 þreifara sem voru allt að 60-80 basa að lengd. Þetta var gert með samvinnu milli starfsmanna Nimblegen Systems á Íslandi og í Madison, Wisconsin. Með nýja búnaðnum var hægt að ná meiri stöðugleika í keyrslurnar þannig að einungis 0.5 μm hliðrun varð fyrir hverja 1°C hitasveiflu. Þetta var mikilvægt skref í þróun á tæknibúnaði Nimblegen Systems á Íslandi.

4.5 Þrjár flögur fyrir lax: TIGR-EST þreifarar, þekkt kyntengd gen úr ýmsum lífverum og auðgaðar raðir

Flaga 1 var þáttapöruð við eitt systkinapar og niðurstöðurnar voru þær að kyngreiningargen úr öðrum tegundum gaf ekki mun á milli kynja í laxinum. Ein röð af auðguðu röðunum gaf til kynna mun (1 log) á milli kynja og þessi röð var sett aftur á Flögu 3. Á Flögu 3 var þessi munur ekki staðfestur en ástæðan gæti verið sú að Cy3/Cy5 aðferðin (Flaga 3) er nákvæmari en biotinaðferðin (Flaga1).

Flaga 2 var þáttapöruð við eitt systkinapar úr laxi. Niðurstöður úr Flögu 2 (Tigr-flagan) voru að 54 raðir sýndu mun á milli hænga og hrygna upp á log 0,5-1 í þáttapöruninni.

Flaga 3 var þáttapöruð við tvö alsystkinapör, eitt óskylt par og síðan við Prokaria fjölskylduna. Munur á milli kynja sem var á bilinu 0,5-1 log í öllum pörunum var í nokkrum tugum raða og raðgreiningarnar á bak við þær voru síðan skoðaðar (sjá lið 4.9). Engin röð gaf >1 log í öllum pörunum, þ.e. bæði skyldum og óskyldum, en hins vegar var mjög mikið af röðum þar sem muninn var ekki að finna í öllum röðunum (einstaklingserfðabreytileiki greindist). Niðurstöður voru almennt skýrari og minni

bakgrunnur (noise) í greiningu gagna úr Flögu 3 í samanburði við hinar tvær fyrri og er líklegt að betri aðferð við sýnavinnslu ráði þar mestu.

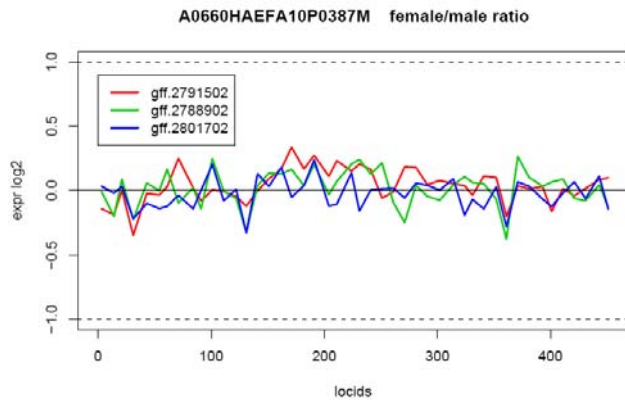
4.6 Flaga fyrir þorsk

Þorskaflagan var þáttapöruð með tveimur systkinapörum og einu óskyldu pari en annað systkinaparið var það saman og notað var við gerð genasafnsins. Flestar raðanna sem sýndu mun á milli kynja voru í 0,5-1 log sem er ekki nógu munur til að vera marktækur. Einnig var mikið af röðunum þar sem muninn var ekki að finna í öllum pörunum. Engin röð með >1 log gaf kynjamun í öllum pörunum.

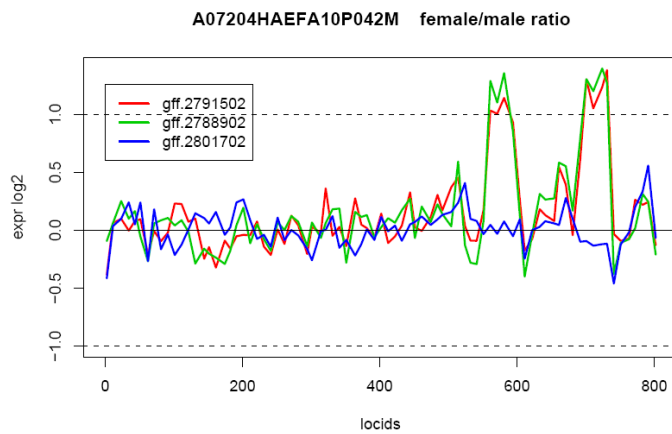
4.7 Flaga fyrir lúðu

Lúðuflagan var þáttapöruð með einu systkinapari og tveimur óskyldum pörum en systkinaparið var það saman og notað var við gerð genasafnsins. Tvær raðir með log mun yfir 1.5 og voru valdar til fyrstu greiningar og stendur sú vinna nú yfir. Á mynd 2 sjást dæmi á greiningu gagna úr röðum úr lúðu. Sýnapar úr systkinum er merkt með bláum lit en óskyldu pörin eru merkt með grænu og rauðu. Lína á grafinu í kringum 0 merkir að engin merkjanlegur munur var á bindingu á DNA hængs og hrygnu við þreifara flögunnar (mynd 2a). Á mynd 2b kemur fram að tvö óskyld sýni voru með mun milli kynja en systkinaparið sýndi ekki þennan mun. Þetta bendir til breytileika milli einstaklinga á því svæði sem þreifararnir bindast. Á mynd 2c sést hins vegar breytileiki milli hængs og hrygnu hjá bæði skyldum og óskyldum pörum. Þessi röð er mjög áhugaverð og er nú verið að skoða þetta svæði nánar með raðgreiningu. Auk þess komu fram fjöldi raða þar sem munur milli kynja var á bilinu 0.5 til 1 log.

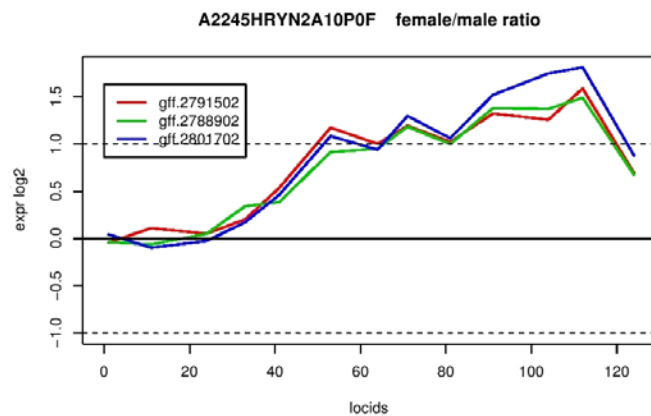
Mynd 2a. Enginn munur er á milli kynja. Allar línurnar liggja í kringum 0.



Mynd 2b. Óskyldu pörin (græn og rauð lína) sýna mun á milli kynja (einstaklingsbreytileiki) en skylda parið (blá lína) sýnir ekki mun.



Mynd 2c. Öll pörin sýna mun á milli kynja.



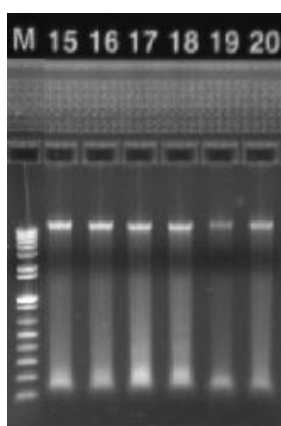
Mynd 2. Dæmi um greiningu gagna á lúðuflogum.

4.8 Þáttapörun á fiska-DNA og úrvinnsla úr flögum

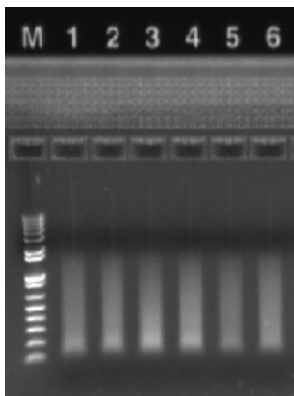
Sýni fyrir laxaflögur 1 og 2 voru merkt með biotin aðferðinni og þær niðurstöður voru ágætar. Hins vegar var talsverður bakgrunnur í niðurstöðum, sem kom fram í því að hugsanlegur erfðamunur milli kynja kom ekki nógu skýrt fram. Því var farið í það að breyta aðferðinni í random prime Cy3/Cy5 merkingu sem er einfaldari og fljótlegri en biotinaðferðin og var talin gefa skýrari greiningu. Þau DNA sýni sem þáttapöruð voru á laxaflögu 3, þorskaflögurnar og lúðuflögurnar voru merkt með Cy3/Cy5 aðferðinni. Þessi nýja merking gekk mjög vel en niðurstöðurnar voru hreinni og skýrari en með biotinaðferðinni.

Þeir þreifarar sem sýndu mun milli kynja sýndu svipaðan mun í fram (forward) og aftur (reverse) röðum. Hver þreifari var auk þess í nokkrum eintökum á flögunni og það var gott samræmi í niðurstöðum milli þreifara sömu gerðar (endurtekkinna þreifara). Við greiningu gagna var skoðað hvort munur á bindingu hænga og hrygnu DNA við þreifara væri einstaklingsmunur eða hvort um væri að ræða hugsanlegan kynjamun.

Þegar unnið var með DNA sýni úr lúðu kom í ljós að DNA-ið var talsvert niðurbrotið og jafnvel mengað af RNA. Sýnin voru þess vegna sett í gegnum auka hreinsunarskref sem gaf góða raun og sýnin merktust mjög vel að lokum (sjá myndir 3 og 4).



Mynd 3. Agarósa gel af ósonikeruðum lúðu DNA sýnum fyrir RNasa meðhöndlun og hreinsun ásamt 1 KB ladder.



Mynd 4. Agarósa gel af sonikeruðum, RNasa meðhöndluðum og hreinsuðum lúðu DNA sýnum ásamt 1 Kb ladder.

4.9 Genaleit eftir flögugreiningu

Þær raðir sem sýndu mestan mun í laxinum voru valdar af Flögu 3 þar sem Flögur 1 og 2 gáfu ekki sannfærandi mun í öllum pörunum. Alls voru útbúnir vísar eftir 11 röðum (0,5-1 log) í laxinum (þrjá þeirra þurfti að endurhanna) og á sama hátt voru 19 raðir valdar fyrir þorskinn (munur 0,5-1 log). Það kom mögnun úr 7 laxavísapörum og 18 vísapörum fyrir þorskinn. Fleiri raðir voru skoðaðar og reynt að gera vísa eftir þeim sem ekki reyndist mögulegt, m.a. vegna þess að stundum var röðin bara endurtekningar eða röðin of stutt. Athugað var í nokkrum einstaklingum hvort fastur munur væri á milli hænga og hrygna í þessum tegundum með raðgreiningum. Fyrst var munurinn skoðaður í einu systkinapari en síðan í fleiri systkinum og einnig óskyldum einstaklingum. Niðurstaðan varð sú að munurinn sem hafði verið pikkaður upp í frádráttarpöruninni var erfðabreytileiki á milli einstaklinga sem ekki var kynjatengdur. Í sumum tilvikum voru þetta punktbreytingar en í öðrum tilvikum mismunandi allel (mism. fjöldi endurtekninga).

4.10 Bandamunur hjá lúðu milli hængs og hrygnu

Okkur langaði að kanna hvort hægt væri að finna breytileika á milli kynjanna á fyrri stigum aðferðarinnar, þ.e. strax í PCR stigi aðferðarinnar eftir frádráttarpörunina. Bútararnir voru klipptir út, þeir klónaðir og raðgreindir. Alls voru útbúin 32 vísapör og PCR fékkst úr 31 þeirra eftir endurhönnun á 7 vísapörum. Þótt greinilegur munur hafi

verið á bandamunstri hænga og hrygna eftir frádráttinn þá endurspegladist sá munur ekki með raðgreiningu á svæðunum hjá kynjunum.

4.11 Greiningaraðferð stöðluð og prófuð

Ekki var farið í þennan hluta þar sem ekki fundust svæði sem voru breytileg á milli hængs og hrygnu í tegundunum þremur.

5. UMRÆÐUR

Markmið verkefnisins var að finna kynbundinn mun milli erfðæfnis hængs og hrygnu í laxi, lúðu og þorski. Þessar upplýsingar átti síðan að nota til að þróa kyngreiningarpróf fyrir þessar fisktegundir. Í verkefninu fólst mikið tæknilegt og markaðslegt nýnæmi þar sem raðað var saman hátækniaðferðum úr sameindaerfðafræði og upplýsingatækni til að leysa fyrirbyggjandi markaðslegt vandamál í kyngreiningu í fiskeldi. Áhættan í verkefninu fólst í því hvort nægilegur kynjamunur sé í erfðamengi þessara fiska til að greina hann með flögugreiningum. Þetta verkefni var mikil áskorun og þótt þessi hluti verkefnisins hafi ekki tekist þá var þetta verkefni mikilvægt fyrir þroska og aðferðaþróun innan fyrirtækjanna Stofnfisks, Mátis-Prokaria og Nimblegen Systems á Íslandi. Þær raðir sem sýndu mun milli kynja í þáttapöruninni voru flestar á bilinu 0,5 til 1 log en sá munur er greinilega ekki nógur til að greina kynjamun milli einstaklinga.

DNA flögur eru öflugt verkfæri til rannsókna á uppbyggingu og starfsemi gena og er mismunandi aðferðum beitt við smíði þeirra. Nimblegen Systems sérhæfir sig í þróun, smíði og þjónusturannsóknum með DNA flögum og hefur þróað svonefnda Maskless Array Synthesis (MAS) tækni, sem leyfir mikinn sveigjanleika í hönnun og smíði (Nuwaysir et al. 2002; Singh-Gasson et al. 1999). Með notkun örspegla (DMD) til að stjórna smíði þreifara og er hægt að smíða hundruð þúsunda þreifara á einni flögu, bæði með stuttum eða löngum (20 – 80 bp) þreifurum. MAS tæknin gerir einnig auðvelt og ódýrt að breyta þreifarasamsetningu flögunnar.

Mikill áhugi er í vísindaheiminum fyrir þróun á flögum með löngum þreifurum í miklum þéttleika, eða sem samsvarar 385000 þreifurum, yfir 50 basa að lengd á hverri flögu. Áður en verkefnið hófst þá smíðaði Nimblegen Systems slíkar flögur en talsverð afföll urðu í smíðinni vegna hliðrunar á þreifurum. Í þessu verkefni náðu starfsmenn fyrirtækisins að endurbæta MAS vél þannig að afköst og heimtur jukust við flögusmíðina. Þessi áfangi var mjög mikilvægur þáttur til að auka samkeppnisstöðu Nimblegen Systems. Áframhaldandi þróun hefur orðið á tækni við flögusmíði og nú eru komnar fram vélar sem smíða 2.1 milljón þreifara á einni flögu.

Innan ramma þessa verkefnis fór einnig fram aðferðaþróun í flúormerkingu og mögnun á DNA sýnum úr laxi, þorski og lúðu. Þessi aðferðaþróun skilaði sér í betri

gæðum sýna og skýrari niðurstöðum við greiningu gagna. Í verkefninu voru útbúin genasöfn fyrir lax, lúðu og þorsk sem búið er að raðgreina. Þessar raðgreiningarupplýsingar eru mjög verðmætar og verða nothæfar í öðrum verkefnum.

Eins og áður var sagt, þá var verkefnið mikið tæknilegt og markaðslegt nýnæmi og mikið lagt undir. Það eru auðvitað viss vonbrigði að ekki skyldi finnast erfðafræðilegur mismunur milli kynja í tegundunum þremur sem voru rannsakaðar. Út frá þeim niðurstöðum sem við höfum og það sem við höfum lært í þessu verkefni þá þykir okkur mjög áhugavert að koma á fót verkefni þar sem erfðaeftni úr kynkirtlum fiskanna yrði einangrað, cDNA yrði útbúið eftir tjáðum genum og það síðan notað í frádráttarpörum. Sú aðferð gæti skilað meiru þar sem mun minni hluti erfðaeftnisins yrði til rannsóknar en gert var í þessu verkefni.

6. HEIMILDIR

- Akopyants NS, Fradkov A, Diatchenko L, Hill JE, Siebert PD, Lukyanov SA, Sverdlov ED, Berg DE (1998) PCR-based subtractive hybridization and differences in gene content among strains of *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13108-13113
- Baroiller JF, D'Cotta H (2001) Environment and sex determination in farmed fish. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 130:399-409
- Cho TJ, Park SS (1998) A simulation of subtractive hybridization. *Nucleic Acids Res* 26:1440-1448
- Devlin RH, Nagahama Y (2002) Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208:191-364
- El-Zaeem SY, Ahmed MMM (2006) Genetic differentiation between sex reversal and normal of full-sib Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* based on DNA fingerprinting. *Res J Fish Hydrobiol* 1:1-5
- Kondo M, Froschauer A, Kitano A, Nanda I, Hornung U, Volff JN, Asakawa S, Mitani H, Naruse K, Tanaka M, Schmid M, Shimizu N, Scharl M, Shima A (2002) Molecular cloning and characterization of DMRT genes from the medaka *Oryzias latipes* and the platyfish *Xiphophorus maculatus*. *Gene* 295:213-222
- Lisitsyn NA, Leach FS, Vogelstein B, Wigler MH (1994a) Detection of genetic loss in tumors by representational difference analysis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 59:585-587
- Lisitsyn NA, Segre JA, Kusumi K, Lisitsyn NM, Nadeau JH, Frankel WN, Wigler MH, Lander ES (1994b) Direct isolation of polymorphic markers linked to a trait by genetically directed representational difference analysis. *Nat Genet* 6:57-63
- Nuwaysir EF, Huang W, Albert TJ, Singh J, Nuwaysir K, Pitas A, Richmond T, Gorski T, Berg JP, Ballin J, McCormick M, Norton J, Pollock T, Sumwalt T, Butcher L, Porter D, Molla M, Hall C, Blattner F, Sussman MR, Wallace RL, Cerrina F, Green RD (2002) Gene expression analysis using oligonucleotide arrays produced by maskless photolithography. *Genome Res* 12:1749-1755
- Sagerstrom CG, Sun BI, Sive HL (1997) Subtractive cloning: past, present, and future. *Annu Rev Biochem* 66:751-783
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning : a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Singh-Gasson S, Green RD, Yue Y, Nelson C, Blattner F, Sussman MR, Cerrina F (1999) Maskless fabrication of light-directed oligonucleotide microarrays using a digital micromirror array. *Nat Biotechnol* 17:974-978
- Woram RA, Gharbi K, Sakamoto T, Hoyheim B, Holm LE, Naish K, McGowan C, Ferguson MM, Phillips RB, Stein J, Guyomard R, Cairney M, Taggart JB, Powell R, Davidson W, Danzmann RG (2003) Comparative genome analysis of the primary sex-determining locus in salmonid fishes. *Genome Res* 13:272-280