



Ullevålsveien 68

Postboks/P.O.Box 750 Sentrum - 0106 Oslo - NORWAY

Sentralbord/switch board +47 23 21 60 00 - Faks +47 23 21 60 01

Direktoratet for naturforvaltning
Postboks 5672 Sluppen
N-7485 Trondheim

Deres ref. kontrakt nr. 12080052

Oslo, 30.11.2012

Analyserapport – sebrafisk mistenkt for å være genmodifisert med gen som koder for rødt fluorescerende protein

Test report – zebrafish suspected of being genetically modified with trait encoding red fluorescent protein

Rapporten har parallell norsk og *engelsk* tekst. Den norske teksten presenteres først, i sin helhet. Deretter følger den engelske versjonen fra side 5. *This report has parallel Norwegian and English text. The complete Norwegian text is presented first. Then the English text version follows from page 5.*

Innledning

Veterinærinstituttet mottok den 19. november en forsendelse bestående av totalt 72 sebrafisk (*Danio rerio*) fra Direktoratet for naturforvaltning. Fisken var på forhånd frosset og pakket enkeltvis, og ankom i frossen tilstand. I henhold til oppdragsavtale med Direktoratet for naturforvaltning skulle Veterinærinstituttet utføre analyse av 10 enkeltfisk merket 1, 2, 3, osv. til og med 10. Etter oppdragsgivers ønske skulle de øvrige fiskene inntil videre oppbevares frosset ved Veterinærinstituttets analyselaboratorium.

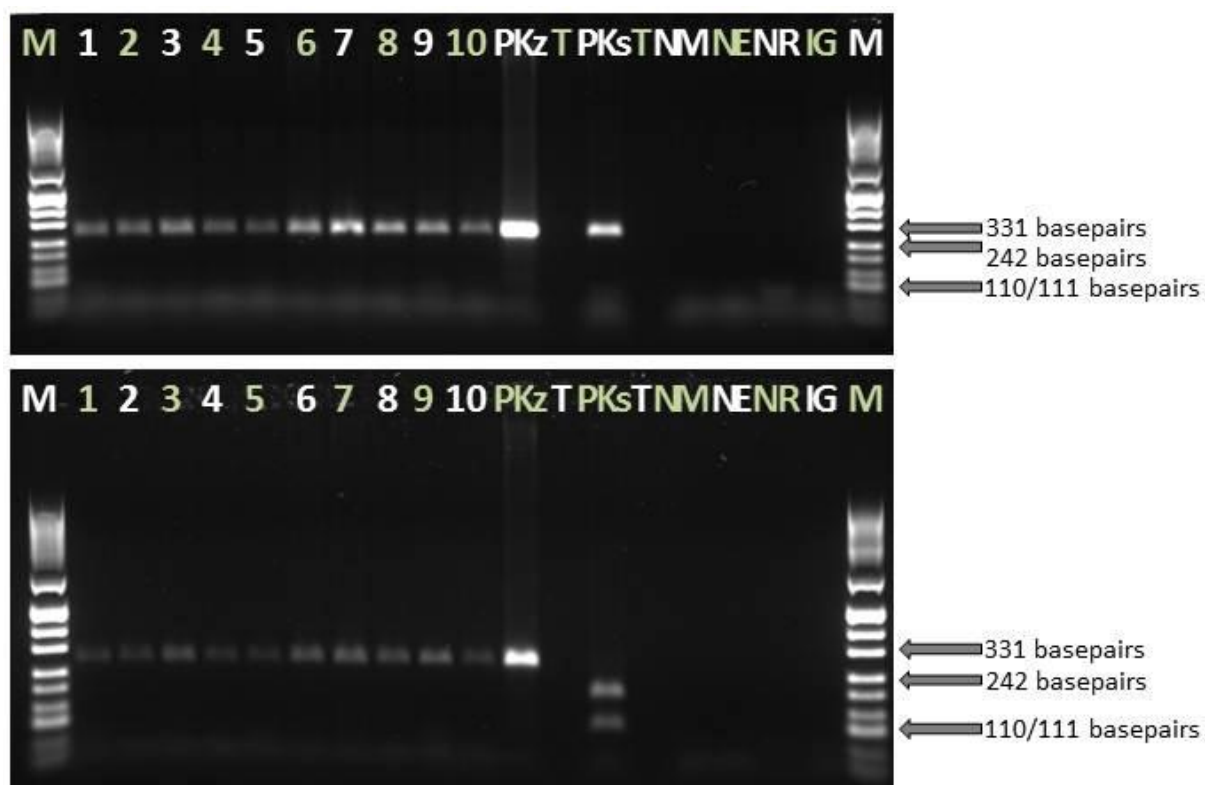
Analysene ble utført ved hjelp av molekylærbiologisk analysemetodikk. Første del av analysen gikk ut på å isolere arvestoff (DNA) fra hver enkelt fisk. Deretter ble isolert DNA analysert ved hjelp av polymerase kjedereaksjon (PCR) metodikk. Det ble benyttet to typer PCR: 1) Kvantitativ PCR for å påvise, og mengdebestemme DNA, og bekrefte at isolert DNA stammet fra sebrafisk; og 2) kvalitativ PCR for å påvise DNA som med sikkerhet stammer fra en konkret genmodifisering.

Analyseresultat

Tabell 1 oppsummerer de konkrete analyseresultatene. Figur 1 dokumenterer de kvalitative analyseresultatene for PCR rettet mot rødt fluorescerende protein (RFP) markøren som er assosiert med den mistenkte genmodifiseringen. **Analysene viser at alle de 10 undersøkte fiskene som var mistenkt for å være genmodifiserte, var genmodifisert med RFP.**

Tabell 1. Oppsummering av analyseresultater:

Fisk nr./kontroll	Kvantitativ PCR for påvisning av sebrafisk-DNA	Kvalitativ PCR for påvisning av RFP-DNA
1	Godkjent mengde og renhet. DNA fra sebrafisk.	RFP-DNA påvist
2	Godkjent mengde og renhet. DNA fra sebrafisk.	RFP-DNA påvist
3	Godkjent mengde og renhet. DNA fra sebrafisk.	RFP-DNA påvist
4	Godkjent mengde og renhet. DNA fra sebrafisk.	RFP-DNA påvist
5	Godkjent mengde og renhet. DNA fra sebrafisk.	RFP-DNA påvist
6	Godkjent mengde og renhet. DNA fra sebrafisk.	RFP-DNA påvist
7	Godkjent mengde og renhet. DNA fra sebrafisk.	RFP-DNA påvist
8	Godkjent mengde og renhet. DNA fra sebrafisk.	RFP-DNA påvist
9	Godkjent mengde og renhet. DNA fra sebrafisk.	RFP-DNA påvist
10	Godkjent mengde og renhet. DNA fra sebrafisk.	RFP-DNA påvist
RFP-fisk fra Kina	Ikke testet i 2012, DNA fra 2009 fra sebrafisk.	RFP-DNA påvist
Syntetisk positiv kontroll	Ikke testet, inneholder bare kort syntetisk DNA-motiv.	Syntetisk RFP-DNA påvist
Negativ miljø kontroll	Ikke sebrafisk DNA i prøven	RFP-DNA ikke påvist.
Negativ ekstraksjons kontroll	Ikke sebrafisk DNA i prøven	RFP-DNA ikke påvist.
Negativ reagens kontroll	Ikke sebrafisk DNA i prøven	RFP-DNA ikke påvist.
Ikke-GM sebrafisk	Godkjent mengde og renhet. DNA fra sebrafisk.	RFP-DNA ikke påvist.



Figur 1. Dokumentasjon på resultatene av PCR analyse for påvisning av RFP-DNA. Øvre rekke, PCR produkter før restriksjonskutting med *EcoRI*. Nedre rekke, PCR produkter etter restriksjonskutting med *EcoRI*. Fra venstre mot høyre: **M** (størrelsesmarkør, fragmentstørrelser nedenfra og oppover: 67, 110, 111, 147, 190, 242, 331, 404, 489, 501, 692, 881 og 1118 basepar). **1-10**: Fisk nr. 1-10. **PKz**: RFP-fisk fra Kina. **T**: Tom brønn. **PKs**: Syntetisk positiv kontroll. **T**: Tom brønn. **NM**: Negativ miljø kontroll. **NE**: Negativ ekstraksjons kontroll. **NR**: Negativ reagens kontroll. **IG**: Ikke-genmodifisert fisk. **M**: størrelsesmarkør, som over. Forventet størrelse på PCR produkt fra genmodifisert fisk (1-10 + PKz) var 267 basepar både før og etter behandling med *EcoRI*. Forventet størrelse på PCR produkt fra syntetisk positiv kontroll (PKs) var 275 basepar før behandling med *EcoRI*. Kutting med *EcoRI* var forventet å dele den syntetiske kontrollen i to fragmenter på hhv. 97 og 178 basepar. Øvrige PCRer var forventet å gi negative testresultater (ingen PCR produkt).

Figure 1. Documentation of results from PCR for detection of RFP-DNA. Upper row, PCR products before digestion with restriction endonuclease. Lower row, PCR products after restriction digest with the restriction endonuclease *EcoRI*. From left to right: **M** (size marker, fragment sizes from bottom: 67, 110, 111, 147, 190, 242, 331, 404, 489, 501, 692, 881 and 1118 basepairs). **1-10**: Fish no. 1-10. **PKz**: RFP-fish from China. **T**: empty well. **PKs**: synthetic positive control. **T**: empty well. **NM**: Negative environment control. **NE**: negative extraction control. **NR**: negative reagents control. **IG**: non-GM fish. **M**: size marker (as above). Expected size of PCR product from genetically modified fish (1-10 + PKz) was 267 basepairs both before and after *EcoRI* digestion. Expected size of PCR product from synthetic positive control (PKs) was 275 basepairs prior to *EcoRI* digestion. The *EcoRI* digestion was expected to cut this product in two fragments of 97 and 178 basepairs, respectively. The other PCRs were expected to yield negative test results (no PCR product).

Metodebeskrivelse

Fra hver fisk ble en bit (ca. 10 mg) plassert i et rør merket med fiskens nummer. Deretter ble arvestoff (DNA) isolert ved hjelp av et kommersielt kit (DNeasy Blood & Tissue kit) fra Qiagen. For å bekrefte at DNA egnet til å utføre analyser med polymerase kjedereaksjon (PCR) var isolert fra hver enkelt fisk, og dokumentere at DNA stammet fra sebrafisk, ble det utført en kontroll-PCR på hver enkelt fisk, som beskrevet i Emanuelsen m.fl. (2009). Denne testen var kvantitativ, slik at det var mulig å vurdere mengde og kvalitet på det isolerte DNAet. Når DNA isolert fra hver fisk var godkjent for videre PCR analyse, ble fisken undersøkt for å finne ut om den inneholdt et DNA-motiv som med sikkerhet bare kan være tilstede i fisk som er genmodifisert. Metoden som ble valgt påviser et DNA-motiv fra et gen som koder for rødt fluorescerende protein (RFP), et protein som gjør fisken selvlysende rød. Dette og lignende gener kommer opprinnelig fra art av tropisk korall (*Discosoma* spp.) og finnes derfor ikke naturlig i sebrafisk. For å påvise det aktuelle DNA-motivet ble det benyttet en PCR metode, utviklet i 2012 ved Veterinærinstituttet. Metoden er kvalitativ, og gir derfor et ja/nei svar på spørsmålet om hver enkelt fisk inneholder det aktuelle DNA-motivet. Det ble benyttet to typer positiv kontroll i analysene. Den ene kontrollen besto av DNA isolert fra en RFP genmodifisert sebrafisk innkjøpt i en akvariebutikk i Kina. Den andre kontrollen besto av et syntetisk DNA-motiv som lar seg påvise med PCR, og samtidig enkelt kan identifiseres som positiv kontroll ved kutting med restriksjonsenzymet *EcoRI*. Det ble også benyttet fire typer negativ kontroll i analysene: 1) Negativ miljø kontroll (veskeløsning i et rør som ikke tilsettes prøvemateriale men plasseres åpent i laboratoriet gjennom hele analyseprosessen); 2) Negativ ekstraksjonskontroll (et rør som ikke tilsettes prøvemateriale men gjennomgår alle øvrige deler av DNA-isoleringsprosessen); 3) Negativ reagens kontroll (en PCR som utføres med DNA-fritt vann i stedet for med DNA fra en prøve); 4) DNA fra sebrafisk som ikke er genmodifisert. Det ble benyttet agarose gel elektroforese til å avgjøre om hver enkelt PCR ga et positivt (DNA fragment av riktig størrelse påvist) eller negativt (fravær av DNA fragment) testresultat.

Referanse

Linda Emanuelsen, Ragnhild Bleken Rud, Knut G. Berdal & Arne Holst-Jensen **2009**. Molekylærbiologisk deteksjon av genmodifisert sebrafisk (GloFish). Veterinærinstituttets rapportserie – rapport 18 – 2009. 26 sider. ISSN 1890-3290 (elektronisk utgave).

Introduction

The Norwegian Veterinary Institute received a shipment of altogether 72 zebrafish (*Danio rerio*) from the Norwegian Directorate of Nature Management on November 19th. The fish were frozen and packed separately prior to shipping, and arrived in frozen condition. The contract with the Norwegian Directorate of Nature Management specified that the Norwegian Veterinary Institute should perform analyses of 10 single fish labelled 1, 2, 3, etc. up to 10. The remaining fishes were to be stored frozen at the Norwegian Veterinary Institute until further.

The analyses were performed using molecular analytical methods. First step was the isolation and purification of DNA, the hereditary material carrying the genes. The next step was analysis of the DNA using polymerase chain reaction (PCR) technology. Two types of PCR were performed: 1) quantitative PCR to detect and quantify DNA, and to verify that the DNA came from zebrafish; and 2) qualitative PCR to detect DNA specific to a genetic modification.

Analytical results

Table 1 (below) summarizes the analytical results. Figure 1 (see above, embedded in Norwegian text) presents the qualitative analytical results for the PCR targeting the red fluorescent protein (RFP) marker associated with the genetic modification. **The analyses demonstrate that all 10 fishes analysed and suspected of being genetically modified carried the genetically modified RFP trait.**

Table 1. Summary of analytical results.

Fish no./control	Quantitative PCR for detection of zebrafish DNA	Qualitative PCR for detection of RFP-DNA
1	Acceptable quantity and purity. DNA from zebrafish.	RFP-DNA detected
2	Acceptable quantity and purity. DNA from zebrafish.	RFP-DNA detected
3	Acceptable quantity and purity. DNA from zebrafish.	RFP-DNA detected
4	Acceptable quantity and purity. DNA from zebrafish.	RFP-DNA detected
5	Acceptable quantity and purity. DNA from zebrafish.	RFP-DNA detected
6	Acceptable quantity and purity. DNA from zebrafish.	RFP-DNA detected
7	Acceptable quantity and purity. DNA from zebrafish.	RFP-DNA detected
8	Acceptable quantity and purity. DNA from zebrafish.	RFP-DNA detected
9	Acceptable quantity and purity. DNA from zebrafish.	RFP-DNA detected
10	Acceptable quantity and purity. DNA from zebrafish.	RFP-DNA detected
RFP-fish from China	Not tested in 2012, DNA from 2009 from zebrafisk.	RFP-DNA detected
Synthetic positive control	Not tested. Contains only short synthetic DNA-motif.	Synthetic RFP-DNA detected
Negative environment controll	No zebrafisk DNA.	RFP-DNA not detected
Negative extraction control	No zebrafisk DNA.	RFP-DNA not detected
Negative reagent control	No zebrafisk DNA.	RFP-DNA not detected
Non-GM zebrafisk	Acceptable quantity and purity. DNA from zebrafish.	RFP-DNA not detected.

Description of methods

A piece of approx. 10 mg from each fish was placed in a tube labelled with the sample number. Inheritable material (DNA) was then isolated and purified using a commercial kit (DNeasy Blood & Tissue kit) from Qiagen. To verify that DNA fit for polymerase chain reaction (PCR) analyses had been purified from each fish and that it was derived from zebrafish, a control PCR was performed on each fish as described by Emanuelsen et al. (2009). This test was quantitative and therefore made it possible to assess the quality and quantity of the purified DNA. When DNA from each fish was deemed fit for further PCR analyses a test was performed targeting a DNA fragment specific for a genetically modified trait. The chosen method targets a DNA-motif from a gene encoding a red fluorescent protein (RFP), i.e. a protein yielding red fluorescence. This and similar genes are originally derived from a genus of tropical corals (*Discosoma* spp.) and are not naturally present in zebrafish. The PCR method used to detect the RFP-motif was developed at the Norwegian Veterinary Institute in 2012. The method is qualitative and yields a yes/no answer to the question "Does this fish contain the RFP-motif?" Two types of positive controls were used in the analyses. One consisted of DNA purified from genetically modified zebrafish carrying an RFP-trait, purchased in a petshop in China. The other consisted of a synthetic DNA-motif detectable with the PCR but distinguishable by further digestion with the restriction endonuclease *EcoRI*. Four types of negative control were included in the analyses: 1) Negative environment control (liquid in a tube left open in the laboratory throughout the analyses but to which no sample material is added); 2) negative extraction control (a tube subjected to the entire DNA extraction process but to which no sample material is added); 3) negative reagents control (a PCR performed with DNA-free water substituting for sample DNA); 4) DNA from a zebrafish that is not genetically modified. Agarose gel electrophoresis was used to determine whether each PCR yielded a positive (DNA fragment of expected size detected) or negative (absence of DNA fragment) test result.

Reference

Linda Emanuelsen, Ragnhild Bleken Rud, Knut G. Berdal & Arne Holst-Jensen **2009**.

Molekylærbiologisk deteksjon av genmodifisert sebrafisk (GloFish). Veterinærinstituttets rapportserie – rapport 18 – 2009. 26 pp. ISSN 1890-3290 (electronic version, in Norwegian).

Med hilsen/regards



Arne Holst-Jensen, forsker/researcher