

Mattilsynet, Hovedkontoret

[postmottak@mattilsynet.no](mailto:postmottak@mattilsynet.no)

Dato: 22.06.2021

### Raffinert metode for å hente genmateriale fra fisk

Finneklipping og vevsprøver er de mest vanlige metodene for å samle DNA fra fisk i dyreforsøk. Det er imidlertid utviklet en raffinert og mindre belastende metode som benytter hud- og slimprøver fra fisken, fremfor finneklipping. Slimprøver kan eksempelvis hentes ved bruk av en bomullspinne eller filterpapir som strykes eller legges på fiskens slimlag («skin swab»).

Teknikken kan benyttes med flere ulike fiskearter og DNA-teknikker, og er vist å være mindre invasiv og stressende enn finneklipping. I tillegg til å være raskere, billigere og tryggere, viser det seg at metoden kan redusere variasjon i forsøkene og dermed bidra til å redusere antallet dyr som brukes. Teknikken er beskrevet i Tilley et al. 2020<sup>1</sup>.

Til tross for at denne metoden har vært tilgjengelig i en årrekke virker den ikke å være velkjent eller utbredt. Finneklipping fremdeles er en vanlig metode for å hente ut DNA i søknader om å gjennomføre forsøk med fisk i Norge. Forsøksdyrkomitéen ser et behov for at slimprøve-metoden valideres for de mest brukte artene og DNA-analyseteknikkene i forsøk der DNA hentes fra fisk i Norge.

#### Bakgrunn:

DNA-uthenting gjennom slimprøver fra fisk ble først beskrevet av Chansue 2005<sup>2</sup>, som ekstraherte DNA fra slimprøver fra asiatisk arowana (*Scleropages formosus*). Metoden ble valgt fordi asiatisk arowana er en høyt ettertraktet og sjelden prydfisk, hvor invasiv prøvetakning som finne- og gjelleklipping fra sjeldne fargevarianter er nærmest umulig. Slimprøver er lettere tilgjengelig, og inneholder et høyt antall hudceller, som alle inneholder DNA. Slimprøvene ga tilstrekkelig DNA til videre analyse, og DNA-prøvene isolert fra fiskeslim var av god kvalitet og med lite RNA-kontaminering.

#### Validert for ulike fiskearter og DNA-teknikker

Videreutvikling og videre utprøving av slimprøvemethoden har vist gode resultater for ulike fiskearter og ulike DNA-teknikker. Livia et al. 2006<sup>3</sup> sammenlignet slimprøver for uthenting av DNA fra brunørret (*Salmo trutta*) og gjedde (*Esox lucius*), med finneklipping i RFLP-, og mikrosatellittanalyse. Metoden ble funnet å være svært rask, nøyaktig og kostnadsbesparende.

Hoolihan et al. 2009<sup>4</sup> fant at slimprøvemethodikken fungerte godt ved RAPD-analyse, sekvensering av DNA og sekvensering av mitokondrielt DNA fra seilfisker og marliner (Istiophoridae) og sverdfisk (Xiphiidae). Metoden er også brukt ved DNA barcoding og sekvensering av mitokondrielt DNA fra

brugde (Lieber et al. 2013)<sup>5</sup>. Mitokondrielt DNA fra fiskeslim er også benyttet av Mirimin et al. 2011<sup>6</sup> for analyser av torsk (*Gadus morhua*). Taslima et al. 2015<sup>7</sup> gjennomførte vellykkede DNA-analyser med mikrosatelitter og enkelt nukleotidpolymorfi (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) på prøver av fiskeslim fra nilmunnruget (Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*).

#### Slimprøver av fisk av liten størrelse

Breacker et al. 2017<sup>8</sup> undersøkte bruk av slimprøvemethoden på ulike størrelser av sebrafisk (*Danio rerio*) og trepigget stingsild (*Gasterosteus aculeatus*), og fant at metoden fungerte godt på små fisk helt ned til 20 mm lengde fra snute til basen av halefinnen. For mindre fisk enn 20 mm lengde anbefaler forfatterne ikke metoden grunnet håndteringsvansker og risiko for skade på fisken.

#### Mengde DNA-utbytte sammenlignet med andre metoder

Flere studier har undersøkt mengden DNA som kan hentes gjennom slimprøver og andre mer invasive teknikker som vevsprøve fra muskel, gjelleklipping og finneklipping. Konklusjonene er at fiskeslim gir et noe lavere utbytte av DNA, men at forskjellen er liten og at metoden fremdeles gir tilstrekkelig DNA-materiale for videre analyse (Chansue 2005<sup>2</sup>, Le Vin et al. 2011<sup>10</sup>, Breacker et al. 2017<sup>8</sup>).

#### Kvalitet av DNA-materialet for videre analyse

Også ved analyser som krever DNA-materiale av høy kvalitet, har fiskeslim vist seg å gi gode resultater. Double-digest restriction-site associated DNA-sekvensering (ddRADseq) krever høykvalitets DNA-prøver, og ble gjennomført på slimprøver av nilmunnruget, med gode resultater (Taslina et al. 2016<sup>9</sup>). Kontrollprøver tatt fra muskel og finne ga tilsvarende antall RAD-loci som fra slimprøvene.

#### Risiko for kontaminering fra andre individer

Én bekymring ved bruk av slimprøver for DNA-analyse, har vært kontaminering med DNA fra andre individer ved hold av fisk under høy fisketetthet. Le Vin et al. 2011<sup>10</sup> undersøkte genotyping av individuelle små ciklider (prinsessen av Zambia, *Neolamprologus pulcher*) ved bruk av slimprøver og finneklipping, under lav og høy fisketetthet. Analysene viste ikke noe tegn til kontaminering mellom slim fra ulike individer, selv ved høy fisketetthet. Studien ga mer enn nok DNA for videre analyse, og viste at slimprøver er en fullgod metode for uthenting av DNA fra fisk:

*Swabbing body mucus provides a non-destructive, relatively non-intrusive method for collection of DNA in fish, particularly when species are small and/or where behavioural experiments may be affected by altering an individual's phenotype. Therefore, this method would be effective in laboratory studies in which individuals are kept in high density tanks, DNA has to be collected from many individuals, where individuals are small and/or time for collecting DNA is limited. Sampling via swabs, would also be useful in the field, particularly for conservation projects when other methods of DNA collection may impact individual survival.*

– Le Vin et al. 2011<sup>10</sup>, s. 109

Mirimin et al. 2011<sup>6</sup> fant ikke tegn til krysskontaminering av DNA i slim mellom individer av torsk ved tettheter på én fisk per liter karvolum (snittvekt 1,23 g).

Breacker et al. 2017<sup>8</sup> holdt 20 voksne sebrafisk i små kar med høy fisketetthet. Før prøvetakning ble alle fisk i karet samlet i én håv og holdt ute av vannet i noen sekunder for å sikre direkte kontakt mellom individene. Deretter ble fiskene sluppet løs i vannet og enkeltfisk ble hentet ut og slimprøver tatt. DNA-analyse viste ingen krysskontaminering av DNA mellom individer.

#### **Forsøksdyrkomitéens uttalelse:**

Slimprøvemethoden er validert for en rekke fiskearter, men dokumentasjon virker å mangle for enkelte arter som benyttes i norske forsøk, eksempelvis Atlantisk laks. Forsøksdyrkomitéen ser et behov for et arbeid som validerer slimprøvemethoden for arter som er relevante i norsk forskning, inkludert validering av metoden med tanke på DNA-utbytte, lagringsegenskaper og potensial for bruk av metoden i forbindelse med ulike relevante DNA-teknikker.

Forsøksdyrkomitéen vil oppfordre Mattilsynet til å løfte frem slimprøveteknikken, og legge til rette for at slimprøver kan brukes for å hente DNA fra fisk når mulig, fremfor mer invasive metoder som finnekklipping. Dette kan gjøres ved å stimulere til forskning som validerer metoden for de vanligste artene og DNA-analyseteknikkene som brukes i forsøk med fettfinnekklipping for DNA-uthenting i Norge.

Dette er i tråd med forskrift 18. juni 2015 nr. 761 om bruk av dyr i forsøk (forsøksdyrforskriften) § 9, tredje ledd, første setning:

*Forsøksmetodene skal stadig forbedres for å unngå, forebygge, fjerne eller minimalisere enhver mulig smerte, frykt, varig skade eller annen belastning for dyrene.*

Alternativt oppfordres Mattilsynet til å signalisere ovenfor brukere av fettfinnekklipping for DNA-analyse at disse har et ansvar for å validere alternative metoder, slik som slimprøveteknikken.

#### **Komitéens godkjenning av uttalelsen:**

Denne uttalelsen er blitt godkjent av komitéens medlemmer: Tore S. Kristiansen (leder), Grete Bæverfjord, Espen Engh, Susanna Lybæk, Kathrine A. Ryeng, Hogne Bleie, Kristine Hansen, Jenny Mattisson.

Dissens: Ingen.



Tore S. Kristiansen

Leder for Forsøksdyrkomitéen – Nasjonal komité for beskyttelse av dyr brukt til vitenskapelige formål

Kopi:

Mattilsynet, Forsøksdyrforvaltningen, [forsøksdyr@mattilsynet.no](mailto:forsøksdyr@mattilsynet.no)

Forskingsrådet, [post@forskningsradet.no](mailto:post@forskningsradet.no)

FHF – Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering, [post@fhf.no](mailto:post@fhf.no)

### Kilder:

---

<sup>1</sup> Tilley, C. A., Gutierrez, H. C., Sebire, M., Obasaju, O., Reichmann, F., Katsiadaki, I., Barber, I. and Norton, W. H. J. 2020, «Skin swabbing is a refined technique to collect DNA from model fish species», *Scientific Reports* 10, 1-17.

<sup>2</sup> Chansue, N. 2005, «Rapid Isolation of DNA from the Mucus of Asian Arowana (*Scleropages formosus*, Osteoglossidae)», *The Thai Journal of Veterinary Medicine* 36(4), 55-59.

<sup>3</sup> Livia, L., Antonella, P., Hovirag, L., Mauro, N. and Panara, F. 2006, «A nondestructive, rapid, reliable and inexpensive method to sample, store and extract high-quality DNA from fish body mucus and buccal cells», *Molecular Ecology Notes* 6, 257-260.

<sup>4</sup> Hoolihan, J. P., Perez, N. F., Faugue, R. M. and Bernart, A. M. 2009, «Surface mucous as a source of genomic DNA from Atlantic billfishes (Istiophoridae) and swordfish (Xiphiidae)», *Fishery Bulletin* 107(3), 339-342.

<sup>5</sup> Lieber, L., Berrow, S., Johnston, E., Hall, G., Hall, J., Gubili, C., Sims, D. W., Jones, C. S. and Noble, L. R. 2013, «Mucus: aiding elasmobranch conservation through non-invasive genetic sampling», *Endangered Species Research* 21, 215-222.

<sup>6</sup> Mirimin, L., O'Keefe, D., Ruggiero, A., Bolton-Warberg, M., Varita, S. and FitzGerald, R. 2011, «A quick, least-invasive, inexpensive and reliable method for sampling *Gadus morhua* postlarvae for genetic analysis», *Journal of Fish Biology* 79, 801-805.

<sup>7</sup> Taslima, K., Davie, A., McAndrew, B. J. and Penman, D. J. 2015, «DNA sampling from mucus in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: minimally invasive sampling for aquaculture-related genetics research», *Aquaculture Research* 47(12), 1-6.

<sup>8</sup> Breacker, C., Barber, I., Norton, W. H. J., McDearmid, J. R. and Tilley, C. A. 2017, «A low-cost method of skin swabbing for the collection of DNA samples from small laboratory fish», *Zebrafish* 14(1), 35-41.

<sup>9</sup> Taslima, K., Taggart, J. B., Wehner, McAndrew, B. J. and Penman, D. J. 2017, «Suitability of DNA sampled from Nile tilapia skin mucus swabs as a template for ddRAD-based studies», *Conservation Genetics Resources* 9, 39-42.

<sup>10</sup> Le Vin, A. L., Adam, A., Tedder, A. Arnold, K. E. and Mable, B. K. 2011, «Validation of swabs as a non-destructive and relatively non-invasive DNA sampling method in fish», *Molecular Ecology Resources* 11, 107-109.