

Identifisering av triploid fisk ved bruk av flowcytometri

Blodceller fra torsk.

Flowcytometri er en teknikk som har revolusjonert muligheten til å studere egenskapene til blant annet bakterier, virus, plankton og dyreceller. Ved Havforskningsinstituttet bruker vi flowcytometri til å identifisere steril triploid fisk ved å måle mengden DNA i enkeltceller.

H. CRAIG MORTON | craig.morton@imr.no

Flowcytometri er en hurtig og kvantitativ metode for analyse og sortering av celler i en væske. I et flowcytometer føres cellene i en væskestrøm én for én forbi en lysstråle (typisk en laserstråle). Kunnskapen om hvordan disse cellene sprer laserlyset som treffer cellene idet de passerer analysepunktet i flowcytometeret, gjør at vi kan skille de ulike celletypene fra hverandre. Flere parametre som fluorescens og graden og retning av lysspredning kan måles samtidig. Lavvinkel lysspredning (FSC) indikerer cellenes størrelse og høyvinkel lysspredning (SSC) indikerer cellenes kompleksitet. Det er også mulig å farge cellene med fluoriserende fargestoffer (fluorokromer). Når cellene går forbi laserstrålene, lager disse fluorokromene lys som fanges opp av et linse- og filtersystem, og en elektronisk detektor som oversetter pulsene til numeriske verdier.

Oppdrett av triploid fisk

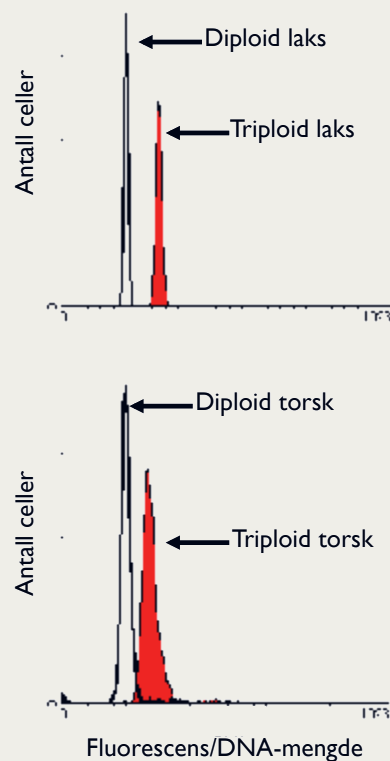
Rømming av fisk utgjør et av oppdrettsnæringens største miljøproblemer. En av de største bekymringene med rømt oppdrettsfisk er faren for at den skal gyte sammen med, og permanent endre den genetiske sammensetningen til villfiskstammene. Bruk av steril fisk i oppdrett kan redusere den genetiske påvirkningen fra rømt oppdrettsfisk.

Triploidisering er den eneste praktiske metoden for å sterilisere oppdrettsfisk. Vanlig diploid fisk har to kromosomsett (ett fra hver av foreldrene) mens triploid fisk har tre kromosomsett (to fra mor og ett fra far) og er steril. Triploidisering gjøres ved å utsette fiskeeggene for høyt trykk rett etter befruktning. Dette gjør at en del av morfiskens arvemateriale (DNA), som normalt skilles ut, forblir i egget. Det er ikke mulig å se forskjell mellom diploid og triploid fisk. Vi bruker derfor DNA-farging og flowcytometri for å undersøke suksessraten til triploidiseringsprosessen, ved å analysere fiskelarver noen få dager etter klekking. I motsetning til de fleste pattedyr har fiskenes røde blodceller fremdeles en kjerne som inneholder en fullstendig kopi av dens DNA. På grunn av dette kan ung og voksen triploid fisk lett identifiseres ved å analysere DNA-innholdet i de røde blodcellene.

Identifikasjon av triploid fisk

Celler fra triploid fisk inneholder altså mer DNA enn celler fra diploid fisk. For å identifisere triploid fisk blir fiskeceller

farget med et DNA-spesifikt fargestoff som heter propidium iodide (PI). PI bindes spesifikt og proporsjonalt til DNA inne i cellene, og fluorescenspulsen målt i flowcytometer når de passerer laserlyset, representerer mengden av DNA (figur) og kan dermed fortelle om en fisk er triploid eller ikke.



Blodceller hos laks kan farges med et fluoriserende fargestoff som binder seg til DNA. Figuren viser at celler fra triploid laks er mer fluoreserende enn celler fra diploid laks siden de inneholder mer DNA.