

NOVANA

# Teknisk anvisning for marin overvågning

## 6.3 Biologisk effektmonitoring - fisk

Jakob Strand  
Ingela Dahllöf  
*Afdeling for Marin Økologi*

**Miljøministeriet**  
**Danmarks Miljøundersøgelser**

## Indhold

<b>6.3</b>	<b>Reproduktiv succes og enzym aktivitet hos ålekvabbe</b>	<b>6.3-3</b>
6.3.1	Formål	6.3-3
6.3.2	Baggrund	6.3-3
6.3.3	Principper	6.3-3
6.3.4	Prøvetagning	6.3-4
6.3.5	Analysemetoder	6.3-5
6.3.5.1	Håndtering og dissektion af friske ålekvabber (Bilag 6.3.1, 6.3.2)	6.3-5
6.3.5.2	Dissekering af nedfrosnen fisk	6.3-6
6.3.5.3	Parameterberegning	6.3-7
6.3.5.4	Analyse af enzymaktivitet	6.3-7
6.3.6	Kvalitetssikring	6.3-8
6.3.7	Dataindberetning	6.3-8
6.3.7.1	Stationsbeskrivelse	6.3-8
6.3.7.2	Beskrivelse på individniveau	6.3-8
6.3.7.3	Beskrivelser på stationsniveau	6.3-9
6.3.8	Rapportering	6.3-9
6.3.9	Forslag til supplerende undersøgelser	6.3-10
6.3.10	Referencer	6.3-10
Bilag 6.3.1	Dissekering af ålekvabbe	6.3-12
Bilag 6.3.2	Typeklassifikation af kuld og abnormiteter hos yngel af ålekvabbe	6.3-13
Bilag 6.3.3	Typer af deformiteter hos ålekvabbens yngel	6.3-15
Bilag 6.3.4	Eksempler på ydre sygdomme hos voksne ålekvabber	6.3-16
Bilag 6.3.5	Eksempler på EROD- og proteinalyse	6.3-17

## 6.3 Reproduktiv succes og enzymaktivitet hos ålekvabbe

### 6.3.1 Formål

Formålet med den biologiske effektovervågning på ålekvabbe er at vurdere i hvilken grad der forekommer effekter i miljøet som følge af ydre stressfaktorer, primært miljøfarlige stoffer, på ålekvabbe (*Zoarces viviparus*) i kystnære områder.

### 6.3.2 Baggrund

Ålekvabben er en velegnet bioindikator da den anses som en stationær fisk, udbredt i danske kystnære områder og fjorde og kan let indsamles. Yderligere er den levendefødende, hvor hunnen bærer hele kuld bestående af 20 – 200 unger. Hermed kan eventuelle effekter på dens reproduktion, herunder skader på ynglen, let undersøges (Neuman m.fl. 1999).

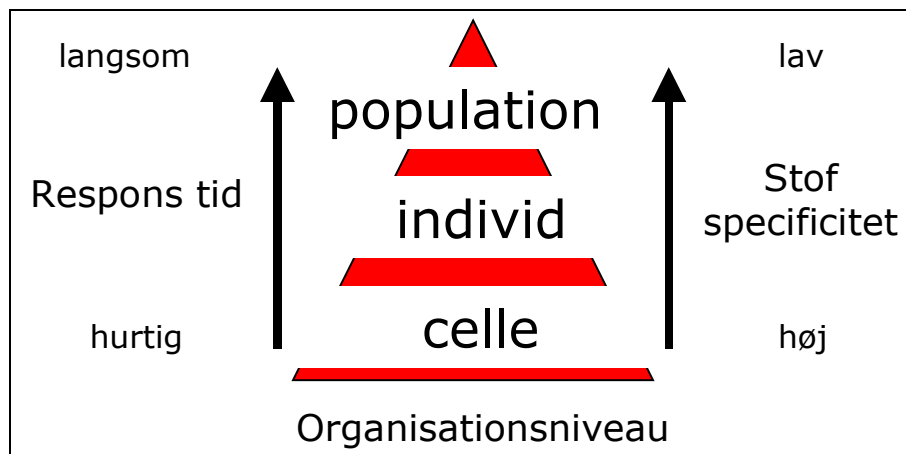
Teratogene effekter så som deformiteter af ålekvabbens yngel kan skyldes ydre stresspåvirkninger fx. pga. belastningen med miljøfarlige stoffer som PAH, klorerede organiske forbindelser, tungmetaller og stoffer med hormonlignende effekter (Bodammer 1993), men også andre stresssituationer fra fx iltsvind kan påvirke yngel gennem tidlig dødelighed (Strand m.fl., *in press*).

Tabel 6.3.1 Udvikling af ålekvabbens yngel i perioden august – februar.

	Befrugtning af æg	Embryo-udvikling	Blommesæk forsvundet	Yngel forlader moderen	
Måned	august	1.1. sep.	15. okt.	1. dec.	1. feb.
Længde	~3 mm		~25 mm	~35 mm	~50 mm

### 6.3.3 Principper

Gennem samtidigt at undersøge reproduktiv succes og aktivitet af afgiftningenszymer, er der mulighed for at beskrive lang- og korttidseffekter, såvel som effekter af den samlede pulje miljøfarlige stoffer som mer specifikke effekter af enkelte stoffer eller stofgrupper (Figur 6.3.1).



Figur 6.3.1 Sammenhæng mellem organisationsniveau og effekter.

Effekter på ålekvabben reproduktion afspejler langtidseffekter og integrerer effekter af mange forskellige stoffer og blandinger. Den reproduktive succes kan sammenlignes mellem områder og med ubelastede referenceområder mere generelt. Svenske undersøgelser har vist at kun 0 – 2% af hunner indsamlet i referenceområder har mere end 5% abnormt yngel (Vetemaa et al. 1997, Svedäng & Förlin 1997).

EROD-aktivitet i lever fra ålekvabbe er et mål for aktiviteten af afgiftningenszymer der er ansvarlig for eliminering af organiske miljøgifter f.eks. PAHer og PCBer (Stagg. & McIntosh 1998). Aktiviteten afspejler derved kortidseffekter fra denne type af stoffer. Enzymaktivitet bruges i trendanalyser indefor et område, og det anbefales at EROD-aktiviteten måles i forhold til en kendt/referenceprøve. Observere at områder, f.eks. et belastet og referenceområdet, kan kun sammenlignes hvis analyserne er udført af det samme laboratorium og sammenlignes mod den samme referenceprøve.

Oplysninger om forekomst af synlige ydre sygdomme og parasitinfektioner kan bidrage som supplerende parametre ved beskrivelse af fiskenes sundhed i et område. Karakterisering af sygdomme bør ske ifølge ICES guideline (Bucke m.fl. 1996).

### 6.3.4 Prøvetagning

Tidspunkt: 15. oktober – 1. december. Prøvetagningen bør ske indenfor en uge, men hvis det ikke lykkedes. Hvis muligt bør områderne der dækkes af allerede eksisterende muslingestationer vælges så at belastningsniveauet af miljøfarlige stoffer er kendt. Alternativt kan belastningsniveauet vurderes gennem måling af miljøfarlige stoffer i lever og galde hos ålekvabben.

Notere stationskoordinater, indsamlingsperiode, saltholdighed og temperatur, samt antal fangstforsøg.

Fra hvert område skal der optimalt indsamles 50 drægtige hunner. Eventuel transport af levende fisk skal foregå i friskt, afkølet vand fra indsamlingsstedet med god lufttilførsel fra luftpumper.

Det anbefales at fiskene holdes gående levende fra fangsttidspunktet og indtil at undersøgelsen foregår (max. 7 dage), fx i en vandret liggende ruse eller i et hyttefad placeret i indsamlingsområdet. De må ikke opbevares i en samlet klynge som ål ellers ofte bliver. Ved opbevaring skal det sørges for at vandet er rent, vel iltet og at der er plads for bevægelse.

Fisk der skal undersøges for EROD-aktivitet (10 stk. fra hvert område) skal dissekeres umiddelbart efter aflivning, hvorpå leverprøverne fryses ned ved  $-80^{\circ}\text{C}$  i en fryser eller i flydende  $\text{N}_2$  ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) indtil analyse. Nedfrosset lever skal analyseres hurtigst muligt, alternativt kan en prøveopbehandling laves på leveren direkte, hvilken har længere holdbarhed ved  $-80^{\circ}$  end hel lever. Opbevaring af prøver i tøris ( $-78^{\circ}\text{C}$ ) kan anvendes under transport.

Det anbefales også at reproduktiv succes undersøges på levende fisk. Som nødløsning: Ved undersøgelser af deformiteter samt eventuelle målinger af miljøfarlige stoffer kan fiskene fryses ned levende og først dissekeres ved en senere lejlighed. Dog risikerer man at miste information om visse typer af rygradslæsioner der kan forekomme i ynglen.

Husk da ålekvabben er fredet i dens drægtighedsperiode behøves der dispensation fra Fiskeridirektoratet. Ansøgning bør fremsendes min. 2 mdr. før indsamlingen.

## 6.3.5 Analysemetoder

### 6.3.5.1 Håndtering og dissektion af friske ålekvabber (Bilag 6.3.1, 6.3.2)

1. Fiskens total vægt vejes (0,1g)
2. De voksne fisk slås ihjel med en slag i hovedet, hvorpå også nakkehvirvlerne skæres over.
3. Notere eventuelle ydre skader/sygdomme (*Bilag 6.3.3*).
4. Bugen klippes op fra gat til strube.
5. Bestem køn.
6. Hos hanner vejes testiklerne.
7. Hos hunner: Ovariet med yngel punkteres og ynglen presses forsigtigt over i sigte. Ynglen overføres derpå i en forudvejet bakke, der efterfølgende vejes (total kuld vægt, 0,1g).

8. Derpå fyldes bakken op med mineralvand med kulsyre, hvorpå ynglen hurtigt bedøves, og ynglen kan undersøges ift. punkt 10. – 12.
9. Lever og galde dissekeres fra. Undgå punktering af galdesækken og spild på leveren.
10. Leveren vejes (0,01g).
11. Leveren overføres til kryorør og nedfryses i flydende nitrogen (eller tøris) til brug for enzymaktivitetsmålinger. Alternativt laves et S9 præparat som nedfryses til  $-80^{\circ}\text{C}$ . Til eventuelt kemisk analyse overføres venstre leverhalvdel til syrerensede og udglødede dramglas og galde til Eppendorfrør og begge nedfryses til  $-20^{\circ}\text{C}$ .
12. De resterende indvolde tages ud af fisken, hvorpå fisken vejes igen (somatisk vægt, 0.1g).
13. Totallængden af fisken måles (0,5 cm)
14. Dødt og levende yngel adskilles og tælles. Det normale yngel inddeles i størrelses fraktioner om 2,5 mm. Dette laves nemmest gennem at duppe ynglen og lægge dem på mm-papir hvor størrelsefraktionerne er tegnet ind. Tælling kan foregå direkte eller gennem billedanalyse ved senere tidspunkt.
15. Antallet af abnormt yngel klassificeres (O, A-G) i følge til *Bilag 6.3.4*.

#### **6.3.5.2 Dissekering af nedfrossen fisk**

1. Fisken tões langsomt op.
2. Fiskens total vægt vejes (0,1g).
3. Bugen klippes op fra gat til strube.
4. Ungesækken punkteres og ynglen presses forsigtigt over i sigte. Ynglen overføres derpå over i en forudvejet bakke, der efterfølgende vejes (total kuld vægt, 0,1g).
5. Lever og galde dissekeres fra. Undgå punktering af galdesækken. Leveren vejes (0,01g).
6. Leveren deles i to halvdele. Til eventuelt kemisk analyse overføres venstre leverhalvdel til syrerensede og udglødede dramglas og galde til Eppendorfrør og begge nedfryses til  $-20^{\circ}\text{C}$ .
7. De resterende indvolde tages ud af fisken, hvorpå fisken vejes igen (somatisk vægt, 0,1g).
8. Totallængden af fisken måles (0,5 cm).

9. Yngel indeles i størrelses fraktioner om 2,5 mm og tælles. Dette laves nemmest gennem at duppe ynglen og lægge dem på mm-papir hvor størrelsesfraktionerne er tegnet ind. Tælling kan foregå direkte eller gennem billedanalyse ved senere tidspunkt.
10. Antallet af abnormt yngel klassificeres (O, A-G) ifølge til *Bilag. 6.3.4.*

**Bemærk.** Punkt 5 er kun nødvendig, hvis der skal måles for miljøfarlige stoffer.

### 6.3.5.3 Parameterberegning

Følgende parametre beregnes:

- Konditionsindeks (KI) = somatisk vægt (g) / længde<sup>3</sup> (cm)
- Lever-somatisk indeks (LSI %) = levervægt / hunnens somatiske vægt \* 100
- Gonade-somatisk indeks (GSI) for hunner: = totalvægt af kuld / hunnens somatiske vægt \* 100
- Reproduktiv kapacitet (RK): antal normalt yngel/hunnens totalvægt

Desuden beregnes for hver kuld:

- Andel af hunner med >5% sent dødt yngel i kuld (type A)
- Andel af hunner med >5% tidligt dødt yngel i kuld (type 0)
- %-vis fordeling af deformiteter (type)
- længdefordeling af normalt yngel (2,5 mm klasser)

Hvis voksne hanner undersøges anbefales følgende parametre

- Konditionsindeks (KI) = somatisk vægt (g) / længde<sup>3</sup> (cm)
- Lever-somatisk indeks (LSI %) = levervægt/hunnens somatiske vægt \* 100
- Gonade-somatisk indeks (GSI) for hanner: vægt af testis/hannens somatiske vægt \* 100

### 6.3.5.4 Analyse af enzymaktivitet

EROD-aktivitet kan bestemmes på forskellige måder hvor forskellige metoder sjældent giver de samme absolutte værdier, men der forhold mellem prøver bliver ens. Dette skyldes enzymernes følsomhed overfor prøvebehandling og faktorer såsom temperatur og pH. Metoderne skiller sig ad med hensigt til buffer, reaktionstid, standardsubstans samt renhed af standarden. Det anbefales at den samme metode bliver brugt fra år til år før at kunne sammenligne resultater og

at en intern referenceprøve bruges for kalibrering mellem år. Et eksempel på præparering, opbevaring og analyse findes i *Bilag 6.3.4* og følger den af ICES anbefalet metode (Stagg. & McIntosh 1998).

Alle metoder bygger på den samme princip. Hvis der er EROD-enzymet (ethoxy-1-resorufin-O-deethylase) tilstede kan disse enzymer deetoxilere reagenset 7-ethoxyresorufin.. Dannelsen af produktet resosufin måles spektrofluorometrisk. Aktiviteten af enzymet angives ved hastigheden hvormed resorufin produceres per mg protein. Mængden protein bestemmes separat ved f.eks. spektrofotometrisk efter en Bradford-reaktion, hvor Bovin serum albumin (BSA) bruges som proteinstandard. Alle resultater skal angives som pmol (dannet resosufin)/min/mg protein.

### 6.3.6 Kvalitetssikring

For at ensarte observationerne skal de angivne metoder for reproduktiv succes i denne vejledning anvendes.

For EROD-analyser skal metoden være veldokumenteret, specielt med hensigt til kvantificering af resosufin og brug af intern reference.

Deltagelse i nationale eller internationale workshop anbefales for at harmonisere og kvalitetssikre undersøgelserne. Billeder af deformiteter, udveksling og eventuel interkalibrering af EROD-målinger og diskussion er væsentlige elementer i workshoppen. Ved rapportering af data til databaser bør der henvises til deltagelse i sådanne workshops.

### 6.3.7 Dataindberetning

Dataindberetning til databaser omfatter ud over stationsoplysninger også oplysninger for de undersøgte parametre, hhv. på individniveau og stationsniveau.

#### 6.3.7.1 Stationsbeskrivelse

Følgende observationer noteres for hver station: Dato for indsamlingsperiode, antal fangstforsøg, position, dybde, fangstmetode, totale antallet af fangne ålekvabber (hanner og hunner).

#### 6.3.7.2 Beskrivelse på individniveau

Længde, vægt, somatisk vægt og levervægt samt observationer af ydre skader/sydomme på de voksne fisk. De beregnede parametre:

- Konditionsindeks (KI)
- Lever-somatisk indeks (LSI %)
- Reproduktiv kapacitet (RK)
- Gonade-somatisk indeks (GSI %)



- Antal normalt yngel
- Længde af normalt yngel (mm), middel og standardafvigelse
- Antal deformt yngel i kuld, totalt (type B-G)
- Antal sent dødt yngel i kuld (type A)
- Antal tidligt dødt yngel i kuld (type 0)
- %-vis fordeling af alle deformiteter (type)
- EROD-aktivitet (pmol/(mg protein x min))

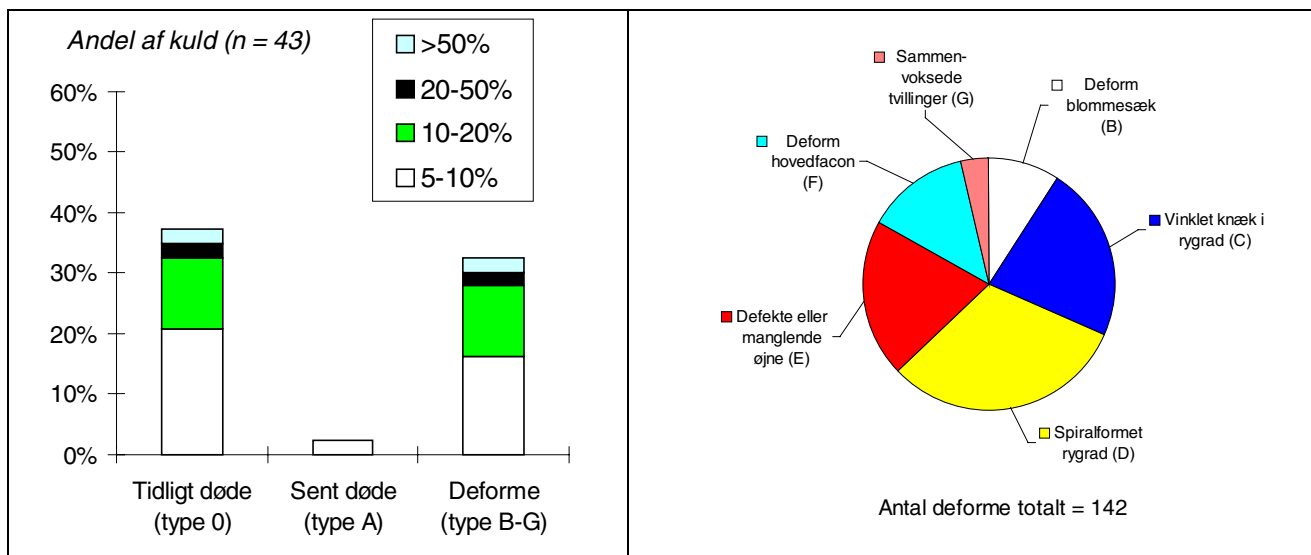
### 6.3.7.3 Beskrivelser på stationsniveau

På stationsniveau angives følgende parametre som middelværdi inkl. standardafvigelse:

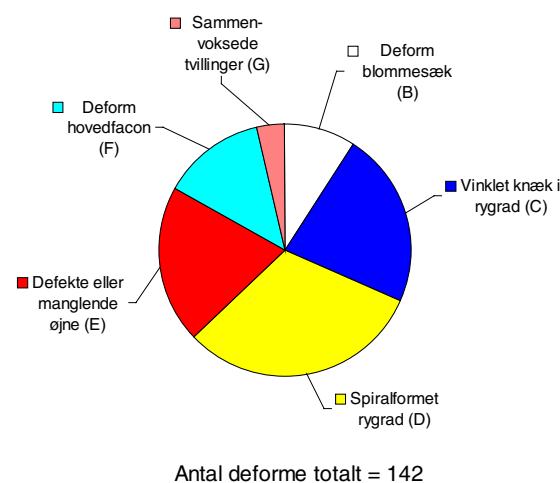
- Konditionsindeks (KI), middelværdi inkl. standardafvigelse
- Lever-somatisk indeks (LSI %), middelværdi inkl. standardafvigelse
- Reproduktiv kapacitet (%), middelværdi inkl. standardafvigelse
- Gonade-somatisk indeks (GSI %), middelværdi inkl. standardafvigelse
- Længde af normalt yngel (mm), middelværdi inkl. standardafvigelse
- Andel af hunner med >5% deformt yngel i kuld (type B-G)
- Andel af hunner med >5% sent dødt yngel i kuld (type A)
- Andel af hunner med >5% tidligt dødt yngel i kuld (type 0)
- %-vis fordeling af alle deformiteter (type)
- EROD-aktivitet, middelværdi inkl. standardafvigelse

### 6.3.8 Rapportering

Det foreslås, at præsentation af data fx i rapporter omfatter følgende oplysninger som angivet på de 2 nedenstående figurer.



Figur 6.3.2 Andel af kuld med forhøjet forekomst af hhv. tidligt døde, sent døde og deformt yngel i Nakskov fjord 2002.



Figur 6.3.3 %-vis fordeling af forskellige typer af deformiteter (B-G) i Nakskov fjord 2002.

### 6.3.9 Forslag til supplerende undersøgelser

- Kemiske analyser for indholdet af forskellige miljøfarlige stoffer i fiskene fx i lever eller muskel. Dette kan omfatte målinger af bl.a. PCB, PAH, organometaller som TBT, tungmetaller, m.fl.
- PAH metabolitter i galde. Simple fluorescensmålinger på galdeprøver som mål for eksponering til PAH, hvor koncentrationen er normaliseret til 1-hydroxypyren og/eller benzo(a)pyren. Et relevant supplement til EROD aktivitet. PAH-metabolitter kan også kvantificeres vha. HPLC. (Aas m.fl, 2000).
- Kønsfordeling i fiskeyngel. Skæve kønsfordelinger i kuldene kan være forårsaget af alvorlige hormonforstyrrelser, hvilke bl.a. er observeret i områder belastet med spildevand (Förlin et al. 2001).
- Vitellogenin i blod og histologi på gonader. Undersøgelser på hanfisk kan udtrykke om fiskene er udsat for hormonforstyrrelser (Gercken & Sordyl 2002, Rasmussen et al 2002).
- Populationsundersøgelser af ålekvabbe.

### 6.3.10 Referencer

Aas, E., Beyer, J. and Goksoyr, A., 2000. Fixed wavelenght fluorescence (FF) of bile as a monitoring tool for polyaromatic hydrocarbon exposure in fish: an evaluation of compound specificity, inner filter effect and signal interpretation. *Biomarkers* 5(1). 9-23.

Bodammer, J., 1993. The teratological and pathological effects of contaminants on embryonic and larval fishes exposed as embryos: a brief review. *American Fisheries Society Symposium*, 14: 77-84.

Bucke, D., Vethaak, D., Lang, T., and Mellergaard, S., 1996. Common diseases and parasites of fish in the North Atlantic: training guide for identification. *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences* no. 19, 27 pp.

Gercken, J. and Sordyl, H., 2002. Intersex in feral marine and freshwater fish from northeastern Germany. *Marine Environmental Research*, 54(3-5): 651-655.

Larsson, D.G.J., Hallman, H. and Forlin, L., 2000. More male fish embryos near a pulp mill. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(12): 2911-2917.

Neuman E., Sandström O. and Thoresson G., 1999. Guidelines for coastal fish monitoring. National Board of Fisheries, Institute of Coastal Research, Öregrund, Sweden, 44p

Rasmussen, T.H. et al., 2002. Effects of waterborne exposure of octylphenol and oestrogen on pregnant viviparous eelpout (*Zoarces viviparus*) and her embryos in ovario. *Journal of Experimental Biology*, 205(24): 3857-3876.

Ronisz D., Larsson D.G.J. and Förlin L., 1999. Seasonal variations in the activities of selected hepatic biotransformation and antioxidant enzymes in eelpout (*Zoarces viviparus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*: 271-279.

Stagg, R., and McIntosh, A., 1998. Biological effects of contaminants: Determination of CYP1A-dependent mono-oxygenase activity in dab by fluorimetric measurement of EROD activity. *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences* no. 23, 16 pp.

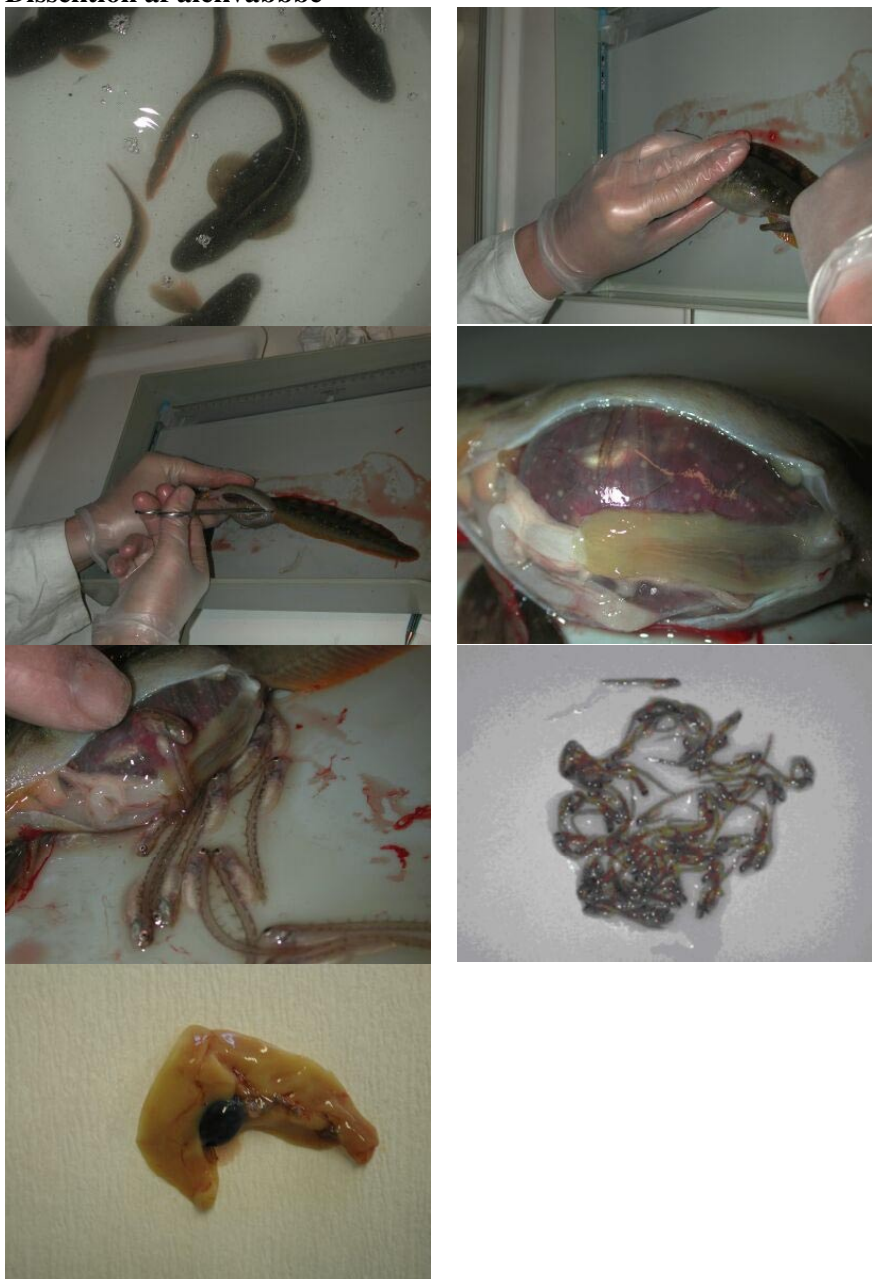
Strand J, Andersen L., Dahllöf I og Korsgaard B, 2004. Impaired larval development in broods of eelpout (*Zoarces viviparus*) in Danish coastal waters. *Fish Physiology and Biochemistry*, in press.

Svedäng H, Förlin L, 1997. Fiskekologi och fiskfysiologi, Bottniska viken 1997, Umeå Marina Forskningscentrum.

Vetemaa, M., Förlin, L. and Sandström, O., 1997. Chemical industry effluent impacts on reproduction and biochemistry in a North Sea population of viviparous blenny (*Zoarces viviparus*). *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, 6: 33-41.

## Bilag 6.3.1 Dissekering af ålekvabbe

### Dissektion af ålekvabbe



## Bilag 6.3.2

### Typeklassifikation af kuld og abnormiteter hos yngel af ålekvabbe

#### Status af voksne og kuld

- 1A. Kuld med mere end 20 stk frit yngel >10mm under tilvækst.
- 1B. Kuld med mindre end 20 stk frit yngel >10mm
2. Kun befrugtede æg med embryoner (synlige øjne), før klækning.
3. Kun ubefrugtede æg (uden øjne).
4. Yngel bedømmes sluppet fri (født).
5. Flere yngel sammenfiltret i en klynge.
6. Forekomst af kalcificeret yngel fra tidligere års kuld.
7. Juvenil eller ikke udviklet gonade, begge køn.
8. Gonade under tilvækst, begge køn

#### Status af yngel, individer

0. Befrugtede æg eller embryo der lige er klækket (<10mm)
- A. Dødt yngel uden misdannelser, >10 mm.
- B. Yngel med misdannelser i blommesæk eller indvolde.
- C. Yngel med "vinkelknæk" på rygrad eller hale.
- D. Yngel med spiralformet rygrad.
- E. Yngel med defekt på øjne eller helt manglende øjne.
- F. Yngel med misdannelser i hovedet.
- G. To sammenvoksede yngel, evt. som siamesisk tvilling.
- H. Andre abnormiteter evt. som kalcificeret yngel eller sammenfiltrede klynger.
- I. Signifikant mindre yngel, "dværgvækst"

*Ved forekomst af flere abnormaliteter på samme individ angives begge.*

## Skema til undersøgelse af ålekvabbens reproduktion

**PRØVE ID:** \_\_\_\_\_

**Station:** \_\_\_\_\_ **Indsamlingsdato:** \_\_\_\_\_ **Undersøgesdato:** \_\_\_\_\_

**Voksne:** Køn: \_\_\_\_\_ Længde: \_\_\_\_\_ cm

Total vægt: \_\_\_\_\_ g Somatisk vægt: \_\_\_\_\_ g Lever vægt: \_\_\_\_\_ g

**Ydre sygdomme på voksne:** Skin ulcers: \_\_\_\_\_ Lever knuder: \_\_\_\_\_  
Andet: \_\_\_\_\_

**Yngel:** Kuld vægt, total: \_\_\_\_\_ Reproduktiv status af voksne og kuld (1-10): \_\_\_\_\_

**Normalt yngel:** Antal normalt yngel: \_\_\_\_\_

**Længde-fordeling:**

længde (mm)	<10	10 - 12.5	12.5 - 15	15 - 17.5	17.5 - 20	20 - 22.5	22.5 - 25	25 - 27.5	27.5 - 30	30 - 32.5	32.5 - 35	35 - 37.5	37.5 - 40	40 - 42.5	42.5 - 45	45 - 47.5	47.5 - 50
antal																	

**Deformt eller dødt yngel (Type 0 – H):**








Typer, antal		0	A	B	C	D	E	F	G	H	Antal yngel med 2 typer deformitet
antal levende, abnorme	antal DØDE	tidlig død < 10 mm	tidlig død > 10 mm	deform blomme	knæk i ryg	spiral	øjens skade	hoved deform	siam twin	andet	

**Vævsprøver til analyse:**

Lever til enzymassay: \_\_\_\_\_ Lever til kemisk analyse: \_\_\_\_\_  
Galde: \_\_\_\_\_






Yngel fixeret i Bouinsvæske: \_\_\_\_\_ Andet: \_\_\_\_\_

### Bilag 6.3.3 Typer af deformiteter hos ålekvabbers yngel

	
0) Død yngel < 10 mm	A) Tidlig død unge
	
B) Deform næringsblomme	C) Vinklet knæk i ryggrad
	
D) Spiralryg	E) Øjenskade i nr. 2 fra oven. Nederste unge mangler øjne.
	
F) Hoveddeformationer, normal unge nederst til højre	
	
G) Siamesiske tvillinger	

## Bilag 6.3.4 Eksempler på ydre sygdomme hos voksne ålekvabber

Karakteriseret efter bl.a. Bucke et al. (1996) og ICES TIMES No. 19.

Skin ulcers, væskende infektioner/sår	
	
Skin tumor formation	Lever-knuder
	
Øjenskader, fx øjet dækket af hvidlig hinde	
	



## Bilag 6.3.5

### Eksempler på EROD- og proteinanalyse

Modificeret i forhold til Stagg & McIntosh (1998)

**Mens prøverne er under behandling, opbevares de altid afkølet i et isbad.**

Prøveoparbejdning:

1. 1 – 2 g friskt væv + 4\*vægten af buffer (0.1 M NaHPO<sub>3</sub>, pH= 7,4 samt 0,15 M KCl)
2. Homogenisere med teflon-pestil, 400 rpm.
3. Prøven overføres til centrifugerør og centrifugeres ved 4°C, 9000g = S9 fraktion.
4. S9-fraktion dekanteres over i et reagensglas og glycerol tilsættes, 10 – 20% af volumen.
5. Prøven blandes forsigtigt med en pasteur pipette.
6. Prøven deles op på mindst 2 cryo-rør, så at replikater haves.
7. Prøven kan herpå nedfryses til - 80°C eller analyseres direkte.

### Reagenser til EROD analyse

Buffer, pH = 7.4:

100mM NaHPO<sub>4</sub>, pH = 7.4

150 mM KCl

1 mM dithiothreitol

HCl til pH-justering

0.4mM Resorufin (opbevares mørkt ved 5°C)

4.82 mg 7-ethoxyresorufin

50 ml DMSO

100mM NADPH (Reaktionsstartere, laves frisk hver dag)

41.67 mg NADPH

0.5 ml destilleret vand

Reaktionsblanding (2ml/prøve, laves frisk hver dag)

- 1.96 ml buffer, pH = 7.4, til et 2-ml Eppendorf-rør
- 10 µl 0.4 mM 7-ethoxyresorufin
- 10 µl 100 mM NADPH

## EROD analyse

- Præ-inkubér reaktionsblandingen i Eppendorf-røret i 5 min ved 20°C i et vandbad eller termoholder
- Tilsæt 20 µl S9-prøve
- vortex
- inkubering i 5 min ved 20°C
- Stop reaktion med 200 µl KOLD acetone
- centrifugering i 5 min ved 6000x g
- Mål en blindprøve hvor S9-fraktionen erstattes med ren buffert.

Måle fluorescensen ved ex.535nm/em.585nm.

### Rhodamin standard

- Stamopløsning: 2 mM i DMSO (opbevares mørkt ved 5°C)
- Arbejdsopløsning: 20 nM, 100 x fortynding af stamopløsning, fortyndes med buffer
- Fortyndingsrække; 0, 0.5, 1, 2, 6, 8, 10 µl arbejdsopløsning i Eppendorf-rør
- Tilsæt 200 µl KOLD acetone + 100 µl reaktions blanding.
- Centrifugering i 5 min. ved 6000 x g

Måle fluorescensen ved ex.535nm/em.585nm.

**Bemærk:** Rhodamin er meget mere holdbar end resosufin standard, men det er nødvendigt at bestemme en konverteringsfaktor fra rhodamin til resosufin for den enkelte metode. Dette kan laves en gang per år hvorefter rhodamin bruges som standard. Resosufin kan bruges som standard direkte, men holdbarheden er kort og renheden meget skiftende mellem batcher.

### **Protein bestemmelse vha. Bradford reagent**

Lineært koncentrationsområde: 0.1 – 1.4 mg protein/ml. Opbevare Bradford arbejdsopløsning samt inkuberende prøver mørkt.

#### Udførsel

- Fortynd S9-fraktion 50 gange med dest. vand
- Fortynd Bradford reagent 6 gange med dest. vand
- Tilsæt 20 µl fort. S9 + 180 µl dest. vand + 560 µl fort. Bradford reagent
- Vortex prøven
- Reaktionstid: fra 5 – 45 min.
- Overfør prøven til 1 ml kuvette
- Mål absorbansen ved 595 nm.

Mål en blindprøve hvor S9-fraktionen erstattes med ren buffert.

### BSA standard, intern og ekstern kalibrering

Stamopløsning: 1mg BSA/ml

Arbejdsløsning: 0.1mg BSA/ml (dvs. 10x fortynding)

Fortyndingsrække: X = 0, 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200  $\mu$ l + (200-X)  $\mu$ l vand + 560  $\mu$ l fort. Bradford reagent.

Som kontrol tilsæts BSA fortyndingsrække til en prøve (1:1) for intern kalibrering

### 96 plade metode

BSA standarder: 0.1 – 1.4 mg/ml

- Tilsæt 5 $\mu$ l af S9 fraktionen eller BSA standarder til hver brønd. Som blank tilsæt 5  $\mu$ l buffer.
- Tilsæt 250  $\mu$ l Bradford reagens og ryst i 30 sekunder.
- Lad prøven inkubere mellem 5 og 45 min (Protein-farve kompleks er stabil i op til 1 time).
- Mål absorbansen ved 595 nm.