

Ekspresjon av utvalgte gener i hyse (*Melanogrammus aeglefinus*) fra område med ulik miljøbelastning

Nicolai Bølling



Masteroppgave i Toksikologi, Biologisk Institutt

Universitetet i Oslo

Desember 2010

Førord

Denne oppgaven ble utført ved Biologisk Institutt ved Universitetet i Oslo og ved NIVA Oslo.

Det er mange å takke for den fine tiden jeg har hatt her i 4. etasje på Marie Bonnivies hus.

Først må jeg takke mine veiledere. Ketil Hylland for å gi meg muligheten til å forske på et spennende prosjekt. I tillegg må Ketil takkes for alle andre muligheter du har gitt meg, spesielt mitt opphold i Porto er jeg veldig takknemlig for. Jeg takker også for din tilgjengelighet selv om du alltid har ti baller i luften og både gode faglige og politiske diskusjoner.

Min veileder Knut Erik tollefsen takker jeg for muligheten til å bli kjent med det profesjonelle og bra miljøet på NIVA og for gode innspill til oppgaven.

Mine veiledere Tor Fredrik Holth og Eivind Farmen må jeg takke for god opplæring og god sparring når jeg har møtt på faglige problemer.

Hadde det ikke vært for dere hadde denne oppgaven aldri blitt noe av.

Katarina på NIVA må også takkes for god opplæring i ELISA metode.

I would also like to thank DR. Lucia Guilhermnio for letting me work with her group. It was a fantastic experience!

Everyone at the Ecotox lab at CIIMAR in Porto.; you made my stay fantastic, especially thank you to Luis Vieria for everything I learned from you.

Mie, Hanne og Camilla takker jeg for bra samarbeid på lab. Når dagene ble lange og kjedelige så var deres selskap uvurderlig.

Takk til Bjørn for bra samarbeid på tokt og hjelp med statsstikk. Du er en fin fyr som har hatt det mye moro med her i 4 etasje.

Jeg vil også takke alle som jeg har hatt som forlesere i løpet av min tid. Det har vært et privilegium å være i et miljø med så mange engasjert mennesker som kan så mye.

Og til slutt til alle andre som jeg hadde lyst til å takke; takk, men ikke noe lenger takketale, jeg må jobbe med diskusjonen!

Nicolai UiO 22.12.2010

Sammendrag

Hovedmålet med denne oppgaven var å analysere ekspresjonen av utvalgte gener i hyse (*Melanogrammus aeglefinus*) fra forskjellige områder i Nordsjøen og Island. Det har vist seg å bli tilført store mengder av stoffer som kan forårsake skadelige effekter på fisk.

Overvåkningsstudier har vist seg at det er grunn til bekymring, men disse studiene er hovedsakelig utført i den sørlige delen av Nordsjøen. ICON prosjektet som denne studien er en del av ønsket å bidra til en helhetlig forståelse for hvordan forurensing påvirker den nordøstre delen av Atlanteren.

Hyse som er funnet i hele Atlanteren ble brukt i denne studien. På grunn av begrenset informasjon om genomet og en optimalisert metode for å måle genekspresjonen hos hyse, ble en del av oppgaven å forbedre en metode for genekspresjon til arten.

Tjuefem fisk ble samlet inn fra fire stasjoner; to stasjoner ved Island og to i Nordsjøen med ulik miljøbelastning. Seks forskjellige gener som kan avsløre eksponering av forskjellige stoffer ble undersøkt. For tre av de seks analyserte genene var det tydelige forskjeller som kan være forårsaket av forurensing. Ekspresjonen av de utvalgte genene viste det var forskjell mellom Island og Nordsjøen.

Resultatene fra denne studien tyder på at de to områdene fra Nordsjøen var mer forurenset enn områdene ved Island.

Innholdsfortegnelse

1. Introduksjon	6
2. Biomarkører	11
3. Materiale og metode.....	14
3.1. Prøvetakning.....	14
3.2. Leversomatisk indeks, gonadesomatisk indeks og kondisjonsfaktor	16
3.3. Opparbeidelse av levervev til ELISA.....	18
3.4. Måling av protein.....	19
3.5. Måling av CYP1A konsentrasjon	19
3.6. Metode utvikling og opparbeiding av RNA	20
3.7. Primer design og gelelektroforese av amplikonene.....	24
3.8. cDNA syntese	25
3.9. qPCR.....	27
3.10 Statistiske metoder og databehandling	28
4. Resultater.....	30
4.1. Fysiologisk data	30
4.2. CYP1A-konsentrasjoner i lever.....	33
4.3 Primer spesifitet.....	33
4.4. Genekspresjon	34
4.4.1. CYP1A	34
4.4.2. CYP3	35
4.4.3. MT.....	36
4.4.4 VTG A.....	36
4.4.5. VTG B	37
4.6.6. GR	38

4.7. CYP1A: Forhold mellom genekspressjon og konsentrasjon	39
5. Diskusjon.....	41
5.1 Metode utvikling.....	41
5.2 Fysiologiske parametere	42
5.3 CYP1A protein konsentrasjon og CYP1A mRNA i lever.....	44
5.4 CYP3	47
5.5. MT	48
5.6. VTG.....	49
5.7. GR	50
5.8. Er hyse i nordøstre del av Atlanteren eksponert for forurensning?.....	50
5.9 Konklusjoner	52
6. Referanser.....	53
7. Vedlegg	65

1. Introduksjon

Nordsjøen ligger omringet av tett befolkede områder, og elvene Elbe, Seinen og Themsen har sitt utløp i dette havområdet. Langs kysten og ved elvene som renner ut i Nordsjøen er det områder med høy industriell virksomhet. Det er også mye jordbruk i de samme områdene. Dette fører til forurensning av Nordsjøen (Ducrotoy et al. 2000). Det er også andre kilder som bidrar til forurensningen, som transport med havstrømmene, tilførsel fra atomsfæren og fra skipsfart (Hylland et al. 2006a). Offshoreindustrien er videre en kilde til forurensning i Nordsjøen (Hylland et al. 2006b), med produsert vann som den største kilden (Balaam et al. 2009). Hvert år er det en tilførsel av 300-350 km³ ferskvann (Ducrotoy et al. 2000) og tilførselen av produsert vann er beregnet til å være mer en 240 x 10⁶ m³ årlig (Balaam et al. 2009). Forurensning fra land og offshore virksomhet har tilført blant annet polysykliske aromatiske hydrokarboner (PAH'er), alkylfenoler, metaller og klororganiske stoffer (Ruus et al. 2006; Hylland et al. 2006b) som forårsaker kjente effekter hos fisk (Myers et al. 1990; Myers et al. 1994; Jobling et al. 1996; Nimrod et al. 1996; Ploch et al. 1997; Holladay et al. 1998; Ericson et al. 2000; Navas et al. 2000; Risso-de Faverney et al. 2000; Monteiro et al. 2000a; Monteiro et al. 2000b; Aas et al. 2001; Geffard et al. 2001; Villeneuve et al. 2002; Green et al. 2003; Hasselberg et al. 2004a; Rhodes et al. 2005; Fisher et al. 2006; Hansen et al. 2006; Tollefsen et al. 2006; Hansen et al. 2007; Meier et al. 2007; Woo et al. 2009; Lie et al. 2009b; Olsvik et al. 2009b). Men det er ikke en helhetlig forståelse over hvilke stoffer som blir tilført eller som forårsaker effekter i Nordsjøen (Silva et al. 2002; Boitsov et al. 2007; Thomas et al. 2009).

Tidligere studier som har undersøkt effekten av forurensningen av Nordsjøen har blant annet funnet effekter på fiskelarver (Dethlefsen et al. 1996; Dethlefsen et al. 2001) og en sammenheng mellom forurensning og sykdommer hos fisk (Wosniok et al. 2000). I tilknytningen en internasjonal *workshop* ble det funnet at sei (*Pollachius virens*) hadde histologiske forandringer i lever (Bilbao et al. 2006b). I en annen studie hadde hyse (*Melanogrammus aeglefinus*) fanget i et område med høy offshore aktivitet høyere andel DNA addukter enn hyse fra referanse området Egersundbanken (Hylland et al. 2006b). Andre studier viser at fisk i Nordsjøen kan være påvirket av østrogene forbindelser (Allen et al. 1999; Bateman et al. 2004; Stentiford et al. 2005; Scott et al. 2006a; Scott et al. 2007). Dette er spesielt bekymringsverdig fordi det har vist seg at noen fiskearter er ekstra sensitive ovenfor eksponering for østrogen (Örn et al. 2003).

Farvannene utenfor Island er en blanding av vann fra nord-Atlanteren og relativt rene vannmasser fra Arktiske farvann (OSPAR 2000). Det er utført få økotoksikologiske studier i Islandske farvann i forhold til det som er utført i Nordsjøen, men det har blitt påvist metall og PAH forurensning ved tettbefolkede områder i islandske farvann (Stephensen et al. 2000; Jörundsdóttir et al. 2005; Leung et al. 2005). Klororganiske stoffer blir tilført islandske farvann fra atomsfæren og ved hjelp av havstrømmene (Vetter et al. 1995), men det er en klar avtagende sør nord gradient av forurensning i nord-Atlanteren (Luckas et al. 1990; Schulz-Bull et al. 1998; OSPAR 2010).

Selv om flere overvåkningsstudier har blitt gjennomført i Nordsjøen er det fortsatt begrenset forståelse hvordan forurensningen påvirker det marine livet i Nordsjøen (Hylland et al. 2006c) og hovedmengden av studiene er utført i den sydlige delen av Nordsjøen (Hylland et al. 2006b). Prosjektet med tittelen ”Intergrated Assesment of Contaminant Impact on the North Sea (ICON)” ønsket å vurdere miljøtilstanden i hele nordøstlige delen av Atlanteren med fokus på Nordsjøen. Det ble tatt prøver ved flere forskjellige stasjoner fra et stort geografisk område som ble brukt til en rekke biomarkører. Til å bidra i denne vurderingen ble det også undersøkt om fisk fra Nordsjøen var påvirket av forurensning og om det var noen forskjeller mellom fisk fra åpent hav og ved kysten (Hylland et al. 2010; Skei 2010). I ICON prosjektet ble hyse, som ble brukt i denne studien, prøvetatt ved fire stasjoner; to områder fra Island, Egersundbanken og Firth of Forth.

Den ene stasjonen ved Island lå i farvannene sør for isbreen Vatnajökull uten nevneverdig menneskelig aktivitet og den andre stasjonen lå i farvannene rett vest for hovedstaden Reykjavik. Egersundbanken ligger utenfor Norskekysten og har blitt brukt som referanseområde i økotoksikologiske studier (Westerlund et al.) og det er ingen offshore virksomhet i nærheten (Hylland et al. 2006b). Firth of Forth er en fjord i Skottland med mye petrokjemisk industri og aktivitet som har ført til forurensning av hydrokarboner, metaller og klororganiske forbindelser (Elliott et al. 1987), men problemet er hovedsakelig i den indre delen av Firth of Forth (Balls et al. 1997).

Hyse (*Melanogrammus aeglefinus*) som ble brukt i denne studien, er en av de dominerende artene i Nordsjøen (Ducrotoy et al. 2000) og er utbredt over hele Atlanteren (Pethon 1998). Hyse har også blitt brukt i tidligere overvåkningsstudier (Hylland et al. 2006b). Bestandene i den nord østre Atlanteren deles inn i åtte forskjellige bestander, hvor bestanden i Nordsjøen

og ved Island er definert som to distinkte bestander (Olsen et al. 2010). Gytingen til hysen i Nord Atlanteren forgår i perioden mars til juni (Pethon 1998) og hysen i Nordsjøen når toppen av gytesesongen i slutten av mars (Heath et al. 1998). Gytingen kan hovedsakelig skje etter tre års alder (ICES). I Nordsjøen foretrekker hysen å oppholde seg i området mellom 75-125 meters dybde og mengden av hyse øker med temperatur og saltholdighet (Hedger et al. 2004). Det har vist seg at hysen foretar migrasjoner mellom sesongene, men det er stor variasjon mellom populasjonen og i tillegg manglende kunnskap om emnet (ICES ; Olsen et al. 2010). Hovedkilden av næring får hysen fra bentiske invertbrater som krepsdyr, flerbørstemark og sjøstjerner (Albert 1995), men også fisk er også god del av dietten (Bromley et al. 1997).

Biomarkører som det er mest kunnskap om er de enzymer som er involvert i detoksifisering av xenobiotiske stoffer og deres metabolitter. Hos fisk er leveren det organet som hovedsakelig er ansvarlig for detoksifisering av fremmedstoffer (van der Oost et al. 2003). Hos fisk er Cytokrom P450 1A (CYP1A)-underfamilien ansvarlig for biotransformasjonen av flere xenobiotiske stoffer (Goksøyr et al. 1992) som er en anerkjent og sensitiv biomarkør for eksponering av PAH'er ,halogonerte aromatiske hydrokarboner og plane dioksinliknende molekyler (van der Oost et al. 2003). Andre responser som har vært bredt undersøkt er økning i metall-bindende proteiner (Hylland et al. 1992; Stegeman et al. 1992; Cai et al. 2003; Chesman et al. 2006), oksidativt stress (Digiulio et al. 1989; Winston et al. 1991; Valavanidis et al. 2006) og markører for østrogen-eksponering (Sumpter et al. 1995; Arukwe et al. 2000; Scott et al. 2006a; Hylland et al. 2008). For flere av disse markørene er det kjønnsforskjeller og det skilles derfor ofte på kjønn (Olsson et al. 1989; Sleiderink et al. 1995d; Eggens et al. 1996; Scott et al. 2006b; Knapen et al. 2007).

Hvordan genuttrykket blir påvirket av et unikt stoff eller en mer kompleks blanding av stoffer kan være veldig spesifikk. Analyse av genekspresjonen kan derfor være et egnet verktøy for overvåkning i økotoksikologi (Snell et al. 2003). DNA mikromatrise kan analysere genekspresjonen av flere tusen gener, men analysen er kostbar og for at metoden skal være hensiktsmessig må genomet til arten en undersøger være godt kjent (Denslow et al. 2007). Det er begrenset kunnskap om genomet, genekspresjon og det er ingen godt etablert metode for å måle dette hos hyse (Reith et al. 2001; Corripio-Miyar et al. 2007), men hos den nært beslektede torsken (Teletchea et al. 2006) er genomet godt kjent (Johansen et al. 2009). Ved å gjøre et søk i GENE BANK hos National Center for Biotechnology Information (NCBI) blir

det oppgitt at det tilgjengelig 229326 expressed sequence tags (EST ;En kort cDNA Sekvens) for torsk, mens bare to for hyse (Oktober 2010).

En annen metode som er godt etablert for å måle gen uttrykket er qPCR (VanGuilder et al. 2008) I denne studien ble brukt qPCR for å se på genekspressjonen til CYP1A, CYP3, Gamma-glutamylcystein-syntetase (GCS); Ubiquitin (UB), ribosomal proteinet S9 (S9), Metalltionein (MT), Vitellogenin A (VTG A), Vitellogenin B (VTG B), Glutation reduktase (GR) og Heme oksygenase (HO).

Cytokrom P450-1A genet har vist seg å bli oppregulert i vill fisk som har blitt eksponert for forurensning (Lie et al. 2009a) og transkripsjonen av **CYP3** øker ved eksponering for klororganiske stoffer (Mortensen et al. 2006; Blum et al. 2008). **Glutation reduktase** har vist seg å bli oppregulert både *in vivo* og *in vitro* i regnbueørret hepatocytter ved oksidativt stress (Stephensen et al. 2002; Finne et al. 2007). Det har blitt foreslått at **GCS** blir oppregulert av oksidativt stress (Kawabata et al. 1989). Denne effekten har blitt funnet *in vitro* regnbueørret hepatocytter (Finne et al. 2007), men ikke *in vivo* (Stephensen et al. 2002). **Metalltionein** transkripsjoen har vist seg å bli oppregulert av metallforurensning både i feltstudier og i labstudier (Laurie 2004; Knapen et al. 2007). **Heme oksygenase** er veldig induserbart og er en sensitiv biomarkør for stress som cellen blir utsatt for, som Kadmium og andre tungmetaller (Maines 1988; Lie et al. 2009a; Søfteland et al. 2010) og klorerte hydrokarboner (Voelker et al. 2008). Oppregulering av gen ekspressjonen for **Vitellogenin** hos blant annet hannskrubbe (*Platichthys flesus*) har blitt knyttet til forurensning i Nordsjøen (George et al. 2004).

For qPCR analysen er det vanlig å bruke normaliseringsgener eller referansegener som ikke blir påvirket av ytre faktorer (Arukwe 2006; Pina et al. 2007). Det ble brukt to referansegener i denne studien. **Ubiquitin** som er viktig i degraderingen av proteiner (Jentsch et al. 2000) og **S9** som er et protein som tilhører S40 delen av det eukaryote ribosomet (Vladimirov et al. 1996). Begge disse er blitt brukt som normaliseringsgener ved qPCR for torsk (Holt et al. 2010).

Det er et behov for en helhetlig vurdering av eventuelle effekter menneskelig påvirkning har på havområdene i den nord østlige delen av Atlanteren. Målet med oppgaven var å utvikle metoder til kvantifisering av genekspressjon for utvalgte biomarkører i hyse og å avklare om det er forskjeller mellom hyse fra to områder i Nordsjøen og Island (referanseområde).

Delhypotesene som ble stilt var:

H₀: Det er ingen forskjell i fysiologiske faktorer hos hyse innsamlet i ulike områder i Nordsjøen og ved Island.

H₀: Det er ingen forskjell i genekspressjon hos hyse innsamlet i ulike områder i Nordsjøen og ved Island.

H₀: Det er ingen forskjell i CYP1A konsentrasjon hos hyse innsamlet i ulike områder i Nordsjøen og ved Island.

2. Biomarkører

Biomarkører er definert som en forandring i biologisk respons. Hvor den biologiske responsen kan være alt fra molekylær og cellulær til fysiologiske til adferds forandringer. Denne responsen kan være relatert til eksponering eller effekter av en kjemikalie i miljøet (Peakall et al. 1994). Biomarkører blir ofte delt inn i tre forskjellige kategorier:

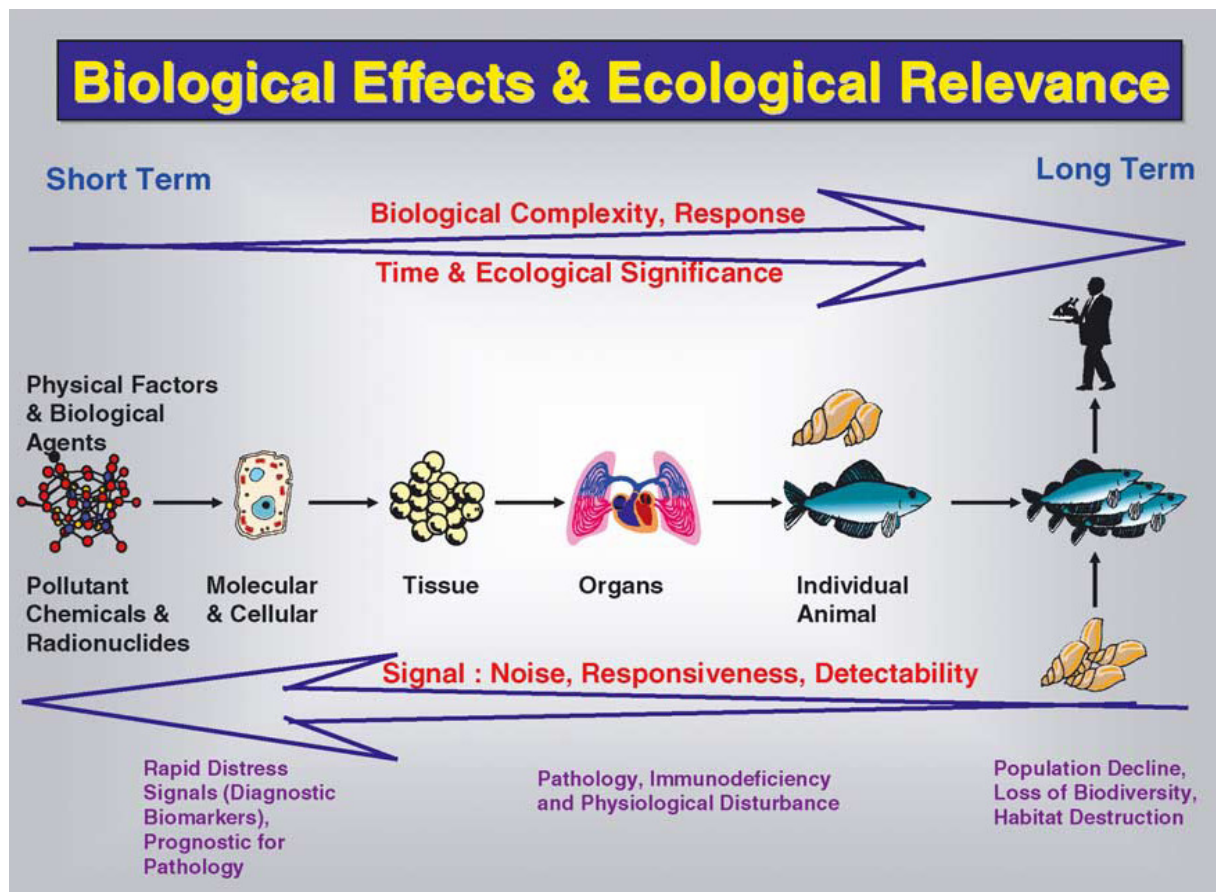
- Biomarkører som påviser eksponering: Denne typen detekterer enten et eksogent stoff eller metabolitten, Denne typen biomarkør kan også detektere interaksjonen mellom et eksogent stoff eller metabolitten og en molekylær del av organismen.
- Biomarkører som påviser effekt. Denne typen biomarkør kan måle en forandring innen biokjemi, fysiologi eller andre forandringer som påvirker helsetilstanden til organismen.
- Biomarkører som påviser påvirkelighet. Denne type biomarkører sier noe om hvor godt organismen takler eksponeringen av et xenobiotisk stoff ut fra de arvelige og tilpassede egenskapene. Dette inkluderer genetiske faktorer og forandring i reseptorer som blir påvirket av den spesifikke eksponeringen.

Denne delingen er noe unaturlig siden en biomarkør som påviser eksponering vil ha en type biologisk effekt (Goldstein et al. 1987). Effekter på et høyere biologisk nivå er et produkt av forandringer på et lavere biologisk nivå. Det vil si at effekter på lavere nivå kan være et varsel om mulige effekter på høyere nivå (Moore 2002). Men det er viktig å påpeke at en effekt på lavere biologisk nivå ikke trenger ha en effekt på høyere biologisk nivå (van der Oost et al. 2003). Dette er fordi det er mange hierarkiske nivåer med homostatisk mekanismer som kan sørge for at det ikke blir noen effekt på høyere nivåer (Lawrence et al. 2003), men hvis disse effektene er større enn hva mekanismene kan håndtere vil det bli en effekt på høyere nivå (Bayne et al. 1985). Effekten på høyere biologisk nivå har høyere relevans, men det er en større usikkerhet på grunn av kompleksitet og muligheten for forskjellige induksjonsveier. Det er vanskeligere å oppdage effekter over individ nivå fordi det tar lengre tid før effektene detekteres (figur 2.1). Det er derfor lettere å måle en effekt på lavere nivå (Lawrence et al. 2003).

Det er hensiktsmessig å måle biomarkører fordi det kan si noe om hvordan forurensning påvirker økologiske prosesser og det kan også gi kunnskap om nye stoffer som en tidligere ikke trodde hadde en effekt på miljøet (Lawrence et al. 2003; Sarkar et al. 2006). Ved bruk av

biomarkører er det også lettere å si noe effekten av komplekse blandinger (Lam et al. 2003; Sarkar et al. 2006). For å danne seg et helhetlig bilde av forurensningen over området av interesse, må en undersøke på hvilket eller hvilke nivå det skjer en effekt. Effekten kan skje helt ned på molekylært nivå til individnivå og helt opp til effekter på økosystem nivå. Det er ikke bare et behov for å måle effekter på forskjellige nivåer, men også effekter hos forskjellige arter og fra forskjellige livssykluser fordi de kan ha forskjellig sensitivitet til forskjellige stoffer (Lawrence et al. 2003; Moore et al. 2004). Det er brukt mange forskjellige arter i overvåkning i Nordsjøen (Dethlefsen et al. 1996; Wosniok et al. 2000; Ruus et al. 2006). Dette er nyttig fordi det mellom forskjellige fiskearter kan det være stor variasjon innen fysiologi som påvirker artenes respons til forskjellige biomarkører. En ulempe med og bruk av fisk er at de ikke er stasjonære, men fisk regnes likevel som en godt egnet organismer for overvåkning (van der Oost et al. 2003). For å kunne forstå hva slags stoffer som forårsaker effekt på forskjellige biologiske nivåer har disse fire kategoriene blitt implementert i nasjonale og internasjonale overvåkningsprogram (Lang 2006):

1. Toksikologiske tester under kontrollerte forhold for å undersøke et eller en gruppe stoffer som en vet en finner *in situ*.
2. *In vitro* testing av biologiske effekter av vann eller sediment hentet i miljøet.
3. Effekter på utvalgte arter som blir holdt i fangenskap i felt.
4. Biologiske effekter på organismer fanget i felt.



Figur 2.1: Biomarkører på forskjellige hirarkiske nivåer. Fra Moore (2004).

3. Materiale og metode

En oversikt over alle kjemikalene brukt finnes i vedlegg H og en oversikt over alt utstyr brukt finnes i vedlegg J

3.1. Prøvetakning

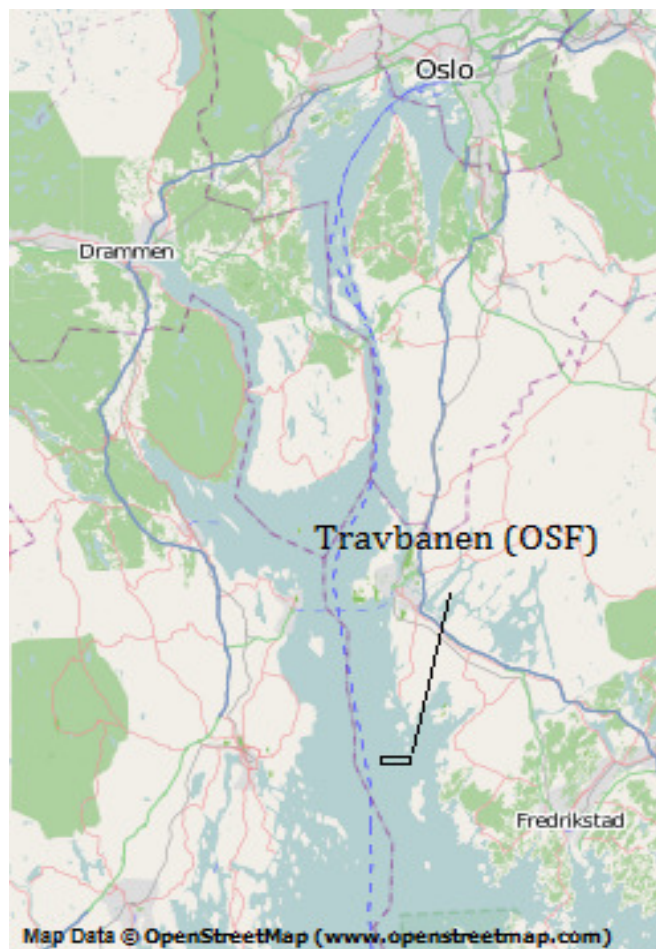
Tjuefem hyse (*Melannogrammus aeglefinus*) ble prøvetatt fra hver av fire stasjoner på to ulike tokt. Første tokt var med FFS Walther Herwig III fra den 29.08.2008 til den 19.09.2008 og andre tokt var med FRV Scotia fra den 21.10.2008 til den 28.10.2008. Toktene var begge en del av en den koordinerte prøvetakningen i ICON prosjektet (Hylland et al. 2010). Stasjonene ble valgt for å kunne vurdere antropogen forurensning fra både kyst og offshore områder (figur 3.1). Oversikt over stasjoner, feltkoder og hydrografisk data er gjengitt i tabell 3.1. Det ble videre prøvetatt 15 fisk fra Oslofjorden som ble brukt som kontroll på RNA kvalitet og under metodeutviklingen. Toktet i Oslofjorden forgikk fra den 09.02.2010 til den 10.03.2010 med F/F Trygve Braarud. Kart over hvor fisk fra Oslofjorden ble prøvetatt er vist i figur 3.2.

På FFS Walter Hervig ble fangsten ført direkte til dissekeringslabben ved hjelp av en sluse på trålingsdekket. Fisken ble sortert etter størrelse og generell helsetilstand. Individene ble så raskt som mulig overført til store tanker med sjøis og sirkulerende sjøvann. På FRV Scotia ble fisken sortert på dekk etter samme kriterier som på FFS Walter Hervig, og så fort som mulige overført til store kar med gjennomstrømming av havvann. Fisken ble først målt og veid før den ble avlivet med et hardt slag mot hodet. Det ble så tatt blodprøve fra kaudalvenen. Til slutt ble fisken kjønnsbestemt og det ble tatt vevsprøver (lever, gonade og muskel), og i tillegg ble otholittene tatt ut for aldersbestemmelse.

Aldersbestemmelsen ble utført ved von Thünen Institutt ved Cuxhaven i Tyskland som del av ICON prosjektet (Hylland et al. 2010). Fiskedata er sammenfattet i tabell 3.2 og 3.3. Etter prøvetaking ble leverprøvene som ble brukt i denne oppgaven umiddelbart lagt i flytende nitrogen (-196°C) i kryorør. Prøvene fra FFS Walter Hervig ble fraktet i en kryoshipper. Prøvene fra Scotia toktet ble fraktet på tørris ($-78,5$) fra Skottland til Norge. Alle prøvene ble lagret i frys i -80°C .



Figur 3.1: Stasjonene hvor det ble prøvetatt fisk i ICON prosjektet. a) Oversikt over nord Atlanteren. b) Stasjonene som ble brukt ved Island.og i c) Nordsjøen. Stasjonene som er en del av ICON prosjektet er merket med en firkant. P01 blir brukt i overvåkning, men er ikke en del av ICON prosjektet, men det ble prøvetatt fisk derfra under ICON tokt. Figur fra (Skei 2010).



Figur 3.2: Oversikt fra hvor fiskene fra Oslofjorden ble prøvetatt (markert med firkant). Stasjonen i Oslofjorden er ikke en del av ICON prosjektet.

3.2. Leversomatisk indeks, gonadosomatisk indeks og kondisjonsfaktor

Leversomatisk indeks (LSI) ble utregnet fra formelen $LSI = (\text{levervekt} / \text{kroppsvekt}) \times 100$, gonadosomatisk indeks (GSI) ble regnet ut ifra samme formel $GSI = (\text{gonadevekt} / \text{kroppsvekt}) \times 100$. Kondisjonsfaktor ble beregnet ut i fra formelen $\text{Kondisjonsfaktor} = (\text{vekt} / \text{lengde}^3) \times 100$.

Tabell 3.1: Oversikt over hydrografisk data fra toktene. *OSF er ikke en ICON kode

Område	Kode	Dato	Lengdegrad- område	Breddegrads- område	Dybde (m)	Bunn temp (°C)	Salinitet (PSU)	O ₂ metning (%)
Island 1	IS1	05.09.2008	63°46,43N - 63°45,64N	16°30,21V- 16°22,12V	83-54	8,56	35,24	84,79
Island 2	IS2	06-07.09.2008	64°09,24N- 64°06,23N	22°19,37V- 22°11,53V	51-30	11,25	34,63	68,56
Firth of Forth	FF	13.09.2008	56°20,10N- 56°17,29N	02°02,58V- 02°00,09V	51-47	13,05	34,8	93,8
Egersundbanken	EB	26.10.2008	57°41,05N- 57°26,99N	05°18,62V- 05°03,32V	78-53	10,61	34,46	-
Oslofjorden	OSF*	10.03.2010	59°15,83N- 57°15,31N	10°39,28V- 10°37,33V	-	-	-	-

Tabell 3.2: Oversikt over hannfiskene fra de forskjellige stasjonene. Dataene er fremstilt med median og kvartilene.

Område	Antall ♂	Alder (År)	Lengde (cm)	Vekt (g)	Levervekt (g)	Gonadevekt (g)
Island 1	16	3;3-3,75	38,5;38,3-39,8	532;311-650,5	23,9;13,4-35,9	0,6;0,4-0,8
Island 2	15	3;2-5	37;33-39	491;368-543	14,2;6,8-20,4	0,5;0,4-0,6
Firth of Forth	13	3;2-3	27;26-29,5	204;181-266	9,4;6,45-14,6	0,4;0,4-0,5
Egersundbanken	17	1;1-2,5	31;28,5-35,5	257;215,5-420,9	14,9;11-23,2	0,8;0,7-2,5
Oslofjorden	4	-	36;35-45,3	526;356,5-1026,3	-	-

Tabell 3.3: Oversikt over hunnfiskene fra de forskjellige stasjonene. Dataene er fremstil med median og kvartilene.

Område	Antall ♀	Alder (År)	Lengde (cm)	Vekt (g)	Levervekt (g)	Gonadevekt (g)
Island 1	9	3;3-3	40;38-41	662;564,5-716,5	28;22,2-36,4	2,6;2,5-2,8
Island 2	10	3;2-5	36;32,8-40,3	479;331,3-604,8	12,95;4,8-22,4	1,9;1,2-2,9
Firth of Forth	12	3;2-3	31,5;28-33	283;229,8-347	12,25;9,8-16,4	1,6;1,5-2,4
Egersundbanken	8	1;1-1	31;28,5-31	246,6;206,5-271,9	18,05;12,9-21,6	0,8;0,7-1,4
Oslofjorden	11	-	42;38-45	728;580-953	-	-

3.3. Opparbeidelse av levervev til ELISA

Til Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) for CYP1A ble det opparbeidet en homogen blanding av mikrosomer. Denne metoden ble først beskrevet av Digman (1990). Det ble først laget opp homogeniseringsbuffer (0,1 M Kaliumfosfatbuffer, tilsatt 0,15 M KCl, 1 mM DDT, 5 % glycerol med pH 7,8) og mikrosomalbuffer (homogeniseringsbuffer tilsatt 20 % glycerol med 1mM EDTA). Leverprøvene ble randomisert ved at de 25 prøvene fra hver stasjon fikk et tall fra 1 til 25 og ble randomisert på nettsiden <http://www.random.org/>. Prøvene ble opparbeidet ut i fra hvilke randomiserte nummer de fikk og samme antall fra hver stasjon ble opparbeidet samtidig Under opparbeidningen ble prøvene holdt på is og homogeniseringsbufferen holdt 4°C. Ca 0,3 gram ble målt opp og prøvene ble overført til homogeniseringsrør med 10 ml homogeniseringsbuffer. Prøvene ble homogenisert med Potter-Elverheim homogenisator ved 6000 rpm og for å homogenisere prøven godt ble røret ført opp og ned 10 ganger. Mellom hver prøve ble homogenisatoren skylt godt med destillert vann. Homogenatet ble sentrifugert (10 000 x g, 30 min, 4°C) og supernatanten ble så tatt av over i nye plastrør også sentrifugert igjen (50 000 x g, 120 min, 4°C). Supernatanten, som inneholder cytosolfraksjonen, ble overført til ett 0,5 ml eppendorfrør. Pelleten, som inneholder mikrosomalfraksjonen, ble resuspendert i 1,5 ml mikrosomalbuffer og fordelt i tre 0,5 mL eppendorfrør. Både cytosolfraksjonen og mikrosomalfraksjonen ble lagret i frys i -80°C. Mellom bruk ble homogeniseringsrørene vasket og skylt godt tre ganger med destillert vann.

3.4. Måling av protein

Proteinkonsentrasjonen ble målt som beskrevet av Lowry (1951). Det ble først laget opp 0,1 M tris-buffer (TrisHCl 13,2 og TrisBase 1,94 g med pH 8 ved 4 °C). Mikrosomalfraksjonen som hadde blitt opparbeidet tidligere ble tatt ut og tint på is. Prøvene ble fortynnet 1:3 eller 1:4 med tris-buffer. Prøvene ble forsiktig mikset på vortekser etter fortynning. 10µl x 3 av hver prøve ble fordelt i 3 replikater i en 96 brønns mikroplate som stod på is. På hver plate ble det også pipettert ut en referanseprøve slik at en kunne oppdage variasjon mellom brettene. På hvert brett var det også en blank prøve med fire replikater og en standardrekke med konsentrasjonene 0,125-0,250-0,500-1,000 mg/ml bovin serum albumin i 3 replikater. Når en plate var pipettert ferdig ble den tatt av isen og umiddelbart ble det tilført 25µl reagens A (alkaisk kobbertartrateløsning fra Biorad) og 200 µl reagens B (Fortynnet Folinreagens fra Biorad) til alle brønnene på platen. Begge reagensene holdt romtemperatur og reagens B ble holdt mørkt frem til bruk. Platene ble så forseglet med forseglingsfolie og forsiktig ristet horisontalt før de ble satt mørkt i 15 minutter til inkubasjon i romtemperatur. Før avlesning ble forseglingsfolien tørket av med etanol (75%) for å fjerne partikler som kunne påvirke avlesningen. Absorbansen ble så avlest ved 750 nm i en Thermomax microplate reader og avlesningen ble gjort med softwaret Softmax v 2.32. Hvis avlesningen av prøvene ikke lå i mellom standardene med 0,250 og 0,500 mg/ml bovin serum album ble prøvene fortynnet og avlest igjen. Protein konsentrasjonen ble beregnet ut ifra standard kurven.

3.5. Måling av CYP1A konsentrasjon

Metoden av måling av CYP1A konsentrasjonen ved bruk av ELISA er en bearbeidet metode utviket av (Goksøyr 1991). Først ble Coating buffer (I tablett karbonat-bikarbonat og buffer per 100mL destillert vann, pH 9,6), TTBS (Trisbuffer20 mM, 0,5 M NaCl med pH 8,5 (8,7 i vårt tilfelle) ved 25 °C, og tilsatt 0,05%Tween) laget. Prøvene ble platet ut i den randomiserte rekkefølgen de hadde fått ved opparbeiding av levervev. Mikrosomalfraksjonen fra prøvene ble tint på is og ble fortynnet med iskald coatingbuffer slik at de hadde konsentrasjonen 10µl/ml med protein. Hundre mikroliter med prøve i fire replikater ble så pipettert ut i en 96 brønns mikroplate som stod på is. På hver plate var det også fire brønner med blank og to referanser i fire replikater. Platene ble inkubert over natten (>16 timer) i kjøleskap (4°C) med

forseglingsfolie. Dagen etter ble platene ble vasket med 250 µl TTBS i hver brønn 3 ganger. Denne vaskingen ble gjort med platevaskeren Skanwasher. I hver brønn ble tilsatt 300 µl med blokkeringsbuffer (TTBS med 1 % BSA), unntatt i de to første blankprøvene (1A og 1B). Platene ble så inkubert i en i 60 minutter med forseglingsfolie i 4°C. Etter inkubasjonen ble platene ble vasket 3 ganger med 250 µl TTBS. Hundre mikroliter med primært antistoff av CP226 fortynnet 1:1000 i inkuberingsbuffer (TTBS MED 0,1 % BSA) ble tilsatt hver brønn unntatt de to brønnene nevnt ovenfor. Platene ble inkubert over natten (>16 timer) i kjøleskap (4°C) med forseglingsfolie. Dagen etter ble platene vasket 3 ganger med 250 µl med TTBS. Hundre mikroliter av sekundært antistoff (geit-anti-kanin konjugert med HRP fra Sigma) fortynnet 1:30000 i inkubasjonsbuffer ble tilsatt før de ble inkubert 6 timer ved 4°C og vasket fem ganger med 250 µl med TTBS. Etter vask ble platene tilsatt 100 µl med TMB Plus (Kem-en-Tec-Diagnostics) i 15 minutter i mørket i romtemperatur. Etter inkubasjonen ble det tilsatt 1 M med H₂SO₄ for å stoppe reaksjonen. Platene ble avlest ved 450 nm med samme software og plateleser brukt for måling av protein konsentrasjon. Tre av de fem platene som ble brukt måtte forkastes fordi de lå under deteksjonsgrensen til metoden.

3.6. Metode utvikling og opparbeiding av RNA

Det ble utført fire metodeutprøvinger for opparbeiding av RNA: TRIzol® metoden, saltrensing, kolonnerensing og kombinasjoner av disse tre metodene.

Ved første uttesting av opparbeiding av RNA ble det brukt det kommersielle produktet TRIzol® som er en forbedring av guanidinium tiocyanat-fenol-klorform ekstraksjon metoden utarbeidet av Chomczynski og Sacchi (1987). Det ble brukt torskeprøver ved første uttesting.

Ved andre uttesting ble det testet med 1 torskeprøve som var blitt prøvetatt mer nylig enn torskeprøvene nevnt ovenfor, og i tillegg 4 hyseprøver, Det ble brukt TRIzol® metoden. I tillegg ble prøvene renset med LiCl som er bearbeidet metode utarbeidet av Cathala (1983).

Ved tredje uttesting ble det testet 9 forskjellige metoder med en hyseprøve. I tillegg til å teste metoden som er nevnt ovenfor ble det også prøvd ut kolonnerens fra Quiagen. En annen modifisert metode av TRIzol® metoden hvor det blir brukt fellingsbuffer for å bli kvitt proteoglykaner(Chomczynski et al. 1995), som det er mye av i leveren til torskefisk(*Gadidae*) (Lie et al. 2009), ble også prøvd ut. Disse metodene ble testet ut i disse 9 forskjellige

kombinasjonene: 1. TRIzol® metoden, 2. TRIzol® metoden modifisert, 3. TRIzol® metoden modifisert med LiCl rens, 4. TRIzol® metoden og kolonnerens, 5. TRIzol® metoden hvor prøven ble felt to ganger, 6. TRIzol® metoden modifisert og kolonnerens, 7. TRIzol® metoden modifisert hvor prøven ble felt to ganger, 8. TRIzol® metoden modifisert og LiCl rens og felt ut igjen med TRIzol® metoden modifisert, 9. TRIzol® metoden modifisert med LiCl rens og kolonnerens.

Ved den fjerde uttestingen ble TRIzol® metoden modifisert med og uten Natriumacetat saltfelling utprøvd. Denne metoden er blitt brukt for å bli kvitt salt og fenol urenheter i RNA prøver hos torsk (Lie et al. 2009a).

Resultatene fra den fjerde uttestingen viste at renheten ble betraktelig bedre med saltfelling. Integriteten ble forringet litt, men var likevel godkjent. Denne metoden ble valgt for opparbeiding av RNA til hysene fanget under de 3 toktene nevnt i seksjon 3.1. Rådataene til metodeuttestingen finnes i vedlegg G

Leverprøvene ble randomisert som nevnt i seksjon 3.3. Først ble fellingsbuffer laget i stand (21,05 g av dinatriumhydrogencitrat, 7,01 g av NaCl i 100ml nukleasefritt vann). Det ble veide opp ca 100 mg av leverprøve i 1 ml TRIzol® i homogeniseringsrør med bunnen fylt opp med homogeniseringspellets. Prøvene ble ristet godt for at TRIzolen® skulle stoppe RNasene og starte lyseringen. Tolv prøver ble homogenisert ved hjelp av Precellys24homogenizer (6500 rpm i 2x20s, 15 sekunder pause). Prøvene ble overført til 1,5 ml eppendorfrør og sentrifugert (12000 x g i 10 min). Supernatanten ble overført til et nytt 1,5 ml eppendorfrør for å bli kvitt fettvev og celledeler som ikke var ønskelig å få med og prøvene ble inkubert i fem minutter. To hundre mikroliter av kloroform ble tilført hver prøve og ristet 15 sekunder for de ble inkubert i 3 minutter. Prøvene ble så sentrifugert (4000 rpm i 10 min ved 4°C.) Etter sentrifugering var prøven skilt i tre faser. Den nedre fasen bestående av fenol, protein, cellerester og klorform, et hvitt midtsjikte som inneholdt DNA og den øvre akvatiske fasen som innholdt RNA. Den øverste akvatiske fasen ble overført til et nytt 1,5 ml eppendorf rør. Dette steget ble gjort forsiktig slik at ikke noe av mellomsiktet mellom de to fasene ble med. Tohundreogfemti mikroliter av fellingsbuffer og tohundreogfemti mikroliter isopropanol ble tilført den akvatiske fasen. Fellingsbufferen ble tilført for å hindre at proteoglykaner ble felt ut med RNA. For å få en god utfelling ble prøvene først inkubert 10 min i romtemperatur og 10 min i frys (-18°C) før de ble sentrifugert (4000 rpm i 10 min ved

4°C). Supernatanten ble fjernet, mens pelleten med RNA ble vasket ved resuspsjon i 1 ml med etanol (75 %) og forsiktig vorteksing. Prøvene ble så sentrifugert igjen (4000 rpm i 5 min ved 4°C). Supernatanten ble fjernet, pelleten fikk tørke og 300 til 500 µl nukleasefritt vann tilsatt. Prøvene ble så inkubert i 5 minutter ved 70°C i en varmeblokk med lokket oppe, slik at alt RNA skulle bli resusperert og rester av alkoholen skulle dampe av. Prøvene ble fordelt i 5 0,5 ml eppendorfrør og lagret på frys (-80°C).

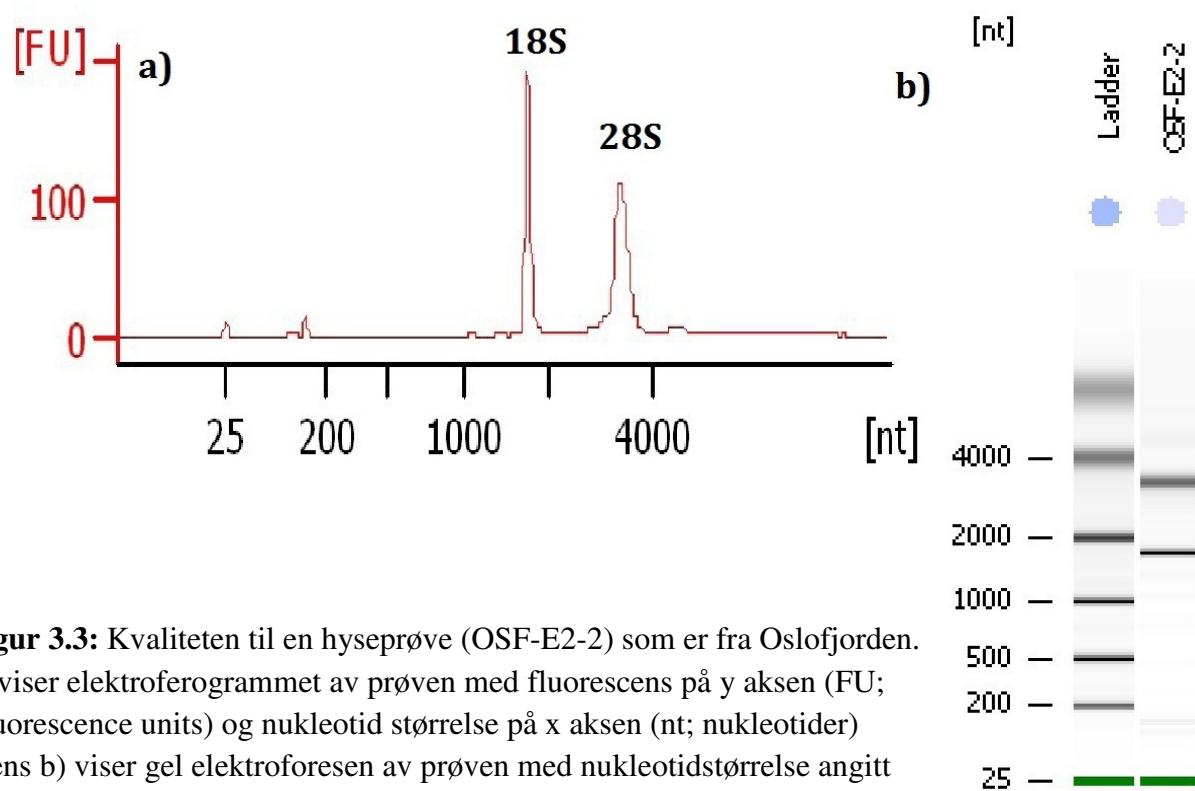
Alle prøvene ble DNasebehandlet med Turbo DNA-free KIT fra Applied biosystems. Et av *alliqotene* av isolert RNA ble tint på is. De ble fortynnet med nukleasefritt vann slik at de hadde konsentrasjonen 200ng RNA/µl nukleasefritt vann, eller lavere (hvis den opprinnelige konsentrasjonen var lavere). Femti mikroliter ble brukt til behandling, slik det var anbefalt i protokollen. 5 µl av 10X TURBO DNase Buffer og 1 µl av TURBO DNase ble tilført hver av prøvene og de ble satt på varmeblokk i 37°C i 30 minutter. Etter 30 minutter ble 5 µl av DNase Inactivation reagent tilsatt hver av prøvene og forsiktig vortekset. Prøvene ble innkubert 5 min i romtemperatur hvor eppendorfrørene ble knipset på for å blande DNase Inactivation reagent. Prøvene ble sentrifugert (10000 x g i 1 min) og RNA ble forsiktig overført til et nytt eppendorfrør for å unngå å få med noe av DNase Inactivation reagent. Umiddelbart ble prøvene tilsatt 0,1 av volumet Natriumacetat (3M) og 3 x volumet av 96 % etanol for å felle ut RNA og bli kvitt urenheter. Prøvene ble lagret 11 dager i frys (-18 °C) før de ble brukt til å lage cDNA.

RNA kvantiteten og renheten ble sjekket med Nanodrop 1000 UV-Visible Spectrophotometer. Dette ble gjort umiddelbart etter opparbeiding av RNA. Spektrofotometeret ble kalibrert mot nukleasefritt vann. Hver prøve ble vortekset godt for at prøven skulle være homogen. To mikroliter av prøven ble pippterte ut på Nanodroppen. Mellom hver prøve ble Nanodroppen tørket med linsepapir. Nanodroppen måler absorbansen og regner absorbansratioene 260/280 og 260/230 nanometer. Det er ønskelig at 260/280 er over 1,8 og 260/230 er over 2,0

Siden RNA brytes lett ned ble integriteten sjekket. Dette ble gjort ved hjelp av mikrogelelektroforese med BioAnalyzer 2100 med metoden utarbeidet av Agilent. Gel ble først preparert ved å la gelen ligge i romtemperatur 30 minutter før 550 µl ble tatt ut og pippterte over på eppendorfrør med filter. Gelen ble sentrifugert (4000 rpm i 10 min) og pipptert ut i *alliqots* på 65 µl som ble lagret i kjøleskap (4°C). Reagensene lå også mørkt under temperaturhevingen. I en *alliqot* med 65 µl med buffer ble det tilført 1 µl med farge.

Alliquet ble så sentrifugert (13000 x g i 10 min). 3 x 9 µl ble pipetterte ut på en RNA 6000 Nano mikrobrikke i brønnene som er merket for gel. I brønnene for prøver og stige ble det pipettert ut 5 µl med nanomarkør. Det ble pipettert ut 1 µl av 12 forskjellige prøver i hver av de 12 brønnene for prøver og 1 µl stige i brønnen til stigen. Hele mikrobrikken ble vortekset i et minutt ved 2400 rpm med en vortekser tilpasset mikrobrikken. Mikrobrikken ble analysert umiddelbart med bruk av Bioanalyser 2100. RNA Integrity Number (RIN) ble regnet ut av Bioanalyser 2100 Expert Software. Verdier over 8 er ønskelig, men det er viktigere å se på kvaliteten visuelt på elektroferogramme. Mellom bruk ble elektrodene til Bioanalyser renses med en elektroderenser mikrobrikke som var fylt med 350 µl Rnase away i 1 minutt og umiddelbart etterpå med en elektroderenser mikrobrikke med 350 µl med nukleasefritt vann i 10 sekunder. Vannet fikk fordampe ved å holde lokket oppe i 10 sekunder. En hyseprøve med perfekt integritet er presentert i figur 3.3.

Før DNase behandling hadde prøvene fra Oslofjorden tydelig høyere integritet enn prøvene fra ICON stasjonene. Etter DNase behandling hadde integriteten blitt noe dårligere for alle prøvene. Tre prøver hadde blitt så degradert at de måtte forkastes. Integritet og renhet for prøvene pre DNase og post DNase finnes i vedlegg E og F.



Figur 3.3: Kvaliteten til en hyseprøve (OSF-E2-2) som er fra Oslofjorden. a) viser elektroferogrammet av prøven med fluorescens på y aksen (FU; Fluorescence units) og nukleotid størrelse på x aksen (nt; nukleotider) mens b) viser gel elektroforesen av prøven med nukleotidstørrelse angitt på siden av stigen

3.7. Primer design og gelelektroforese av amplikonene

Primerne ble laget i nettprogrammet primer 3 (Primer3). Primerne ble laget med disse forutsetningene:

- Primer lengde: Minimum: 18, Optimal 20, Maksimum 27
- Produkt lengde: 100-250
- Primer Smeltetemperatur: Minimum:57°C, Optimal: 60°C, Maksimum: 63°C
- Primer GC % andel: Minimum: 20 %, Maksimum 80 %

Alle lengder som er oppgitt er i basepar. Produktene var mellom 100-236 basepar lange. Alle primerne var 20-22 basepar lange og hadde 60°C som smeltetemperatur. For VTG A og B fantes det gensekvenser for hyse. For MT og GCS ble Expressed sequence tags funnet i henholdsvis artiklene fra Lie et al. (2009) og Finne et al. (2007). For de andre genene ble det søkt etter gensekvenser i databasesamlingen på hjemmesiden til national center for biotechnology information (NCBI). Hvis genet som ble søkt etter var annotert for torsk ble gensekvensen sjekket opp mot alle gensekvenser som er registrert hos National Center for Biotechnology Information. Denne sjekken ble utført i nettprogrammet BLAST (BLAST) for å finne hvilken del av gensekvensen som var konserverert. Den konserverte delen ble brukt til å lage primer. Hvis annotert sekvenser ikke fantes ble det brukt konitg-sekvenser av genet fra mikromatrisearbeid gjort av Tollefsen (upublisert). Konitg sekvensen ble sjekket i BLAST. En EST som var en del av kontig-sekvensen ble valgt og sjekket i BLAST for å finne konserverert del. Denne konserverte delen ble det laget primer fra. For å sjekke at både primerne og EST'en var en del av kontig-sekvensen ble sekvensene sammenliknet mot hverandre i clustal w (Clustalw). I tabell 3.4 finnes en oversikt over genene.

En elektroforesegel av amplikonene ble analysert på en mikrobrikke med BioAnalyzer 2100. Dette ble utført for å sjekke spesifiteten til primerne. Metoden ble utført etter spesifikasjoner fra produsenten. Gelen og de andre reagensene lå ute i romtemperatur i 30 min. Tre ganger ni mikroliter gel ble pipetert ut i en DNA 1000 mikrobrikken i brønnene som er merket for gel. En mikroliter av de forskjellige qPCR produktene ble pipetert ut i brønnen merket for prøver og mikroliter stige ble pipetert ut i brønnen merket for stige. Hele mikrobrikken ble vortekset

i et minutt ved 2400 rpm med en vortekser tilpasset mikrobrikkene. Mikrobrikken ble analysert umiddelbart med bruk av Bioanalyser 2100 Expert Software. Etter bruk ble elektrodene til Bioanalyser 2100 rensset som beskrevet i 3.6.

Tabell 3.4: Primerne brukt

Genbank ID	Navn på primer	Fremover sekvens 5'-3'	Revers sekvens 5'-3'
GO387399.1	CytochromeP450 1A (torsk)	AGAAGATCGTCACCGACCAC	CTCCGAACAGATCGTTGACA
GO387399.1	CytochromeP450 3 (torsk)	CCAGCTCCAAATGGAAGAAA	CATCGTGGTCCCTGATG
CA050524.1	Gammaglutamyl-cystein ligase (regnbueørret)	TGAATTTGTTTGGACCACTTTG	TCGGGGCAAATGAACTTACT
EX735613	Ubiquitination (referanse gen, torsk)	CGAAAATGTCAAAGCCAAGA	ACCAGATGCAGGGTTGACTC
EX726043	S9 (referanse gen, torsk)	GGTGAGTATGGGCTCAGGAA	GTCTTTCTCGTCCAGGGTGA
EX721491.1	Metallothionein (torsk)	GACTCTTACGCCAAAATGC	GTCTTTCCTCCAGTTCAGC
AF284035.1	Vitellogenin A (hyse)	GGTTGTGCAGTTGTTTCATGG	CAGGGACTTCATGTGGGAGT
AF284034.1	Vitellogenin B (hyse)	TGTGAGAGCTGACCACAAGG	GCAGAGCTTTTTCCAACCAG
O388230.1	Heme oksygenase (torsk)	AGTCCCTTGGGCTGAAGAAT	CTCCAGTACCCCTTCCTCT
ES479959.1	Glutation reduktase (torsk)	GGAGGTACCTGCGTCAATGT	GTCCGACTTCAAACCCGTAA

3.8. cDNA syntese

Templatet for 96 brønns mikroplate som skulle bli brukt i qPCR analysen ble brukt når det ble syntetisert cDNA. Det ble syntetisert 3 replikater av hver prøve, en standard med 5 konsentrasjoner i tre replikater (1000ng-500-ng-250ng-150ng-50ng-16,7ng RNA), negativ kontroll og falsk positiv kontroll. Begge kontrollene ble pipetert ut i duplikater under cDNA syntesen. Den negative kontrollen ville avsløre om det var kryss forurensning i qPCR platene som skulle analyseres, mens den falske positive kontrollen ville avsløre om det var DNA forurensning i qPCR platene som skulle analyseres. Til Standaren ble 14 prøver tilfeldig valgt ut fra stasjonene og begge kjønnene.

Prøvene som hadde blitt behandlet med natriumacetat ble tatt ut av frys og umiddelbart sentrifugert (16000 x g i 30 min på 4°C). Supernatanten ble fjernet og hver pellet ble vasket med 1 ml 75 % etanol. Prøvene ble forsiktig vortekset og sentrifugert (4000rpm i 5 min ved 4°C). Supernatanten ble så kastet, mens pelleten fikk tørke før det ble pipetert over 30 µl med nukleasefritt vann. Umiddelbart etterpå ble de satt på varmeblokk i 5 minutter ved 70°C med lokket åpent slik at alt RNA skulle være løst og restene av alkoholen skulle få dampe av. Prøvene ble umiddelbart satt på is. Dette ble gjort med kun 12 prøver om gangen på grunn av at pelleten etter saltfellingen fort kan løsne. Når 96 prøver var felt ut ble cDNA laget. cDNA kittet "High Capacity cDNA Revers Transcriptase" fra Applied biosystems ble brukt. Til hvert rør som skulle bli brukt til cDNA ble det blandet:

- 2 µl 10x RT Buffer, 0,8 25x Dntp Mix(100nm)
- 2,0 µl 10x RT Random primers
- 1 µl Multiscribe™ Revers Transcriptase
- 1 µl med RNase inhibitor
- 3,2 µl nukleasefritt vann

I tillegg ble det laget 3 % ekstra på grunn av tap av volum ved pipetering. Til den positive kontrollen ble det brukt ekstra nukleasefritt vann i stedet for Multiscribe™ Revers Transcriptase. Prøvene ble fortynnet slik at de hadde konsentrasjonen 15 ng RNA / µl. Det ble tilsatt 10 µl med RNA løsning til hvert rør. Til den negative kontrollen ble det tilsatt nukleasefritt vann i stedet for RNA. cDNA ble syntetisert i Eppendorf sin Mastercycler epigradient S. Programmet som ble brukt var:

- 25°C i 10 min
- 2 timer på 37°C
- 5 minutter på 85°C.

Rørene ble umiddelbart satt på is og deretter lagret på frys (-18°C). Prøvene ble senere fortynnet 2:3 med nukleasefritt vann. cDNAet fra hver syntese ble fordelt i 3 *alliquots* i halvskjorts PCR plater fra Axygen forseglert med forseglings folie og lagret i frys (-18°C).

3.9. qPCR

Til qPCR'en ble det laget mastermiks fra Roche Applied Science. Anbefalinger fra produsent ble fulgt. Til hver prøve ble det brukt:

- 3 μ l vann PCR-grade
- 2 μ l 10x konsentrasjon PCR primer (1 μ l av fremover primer og 1 μ l av Revers primer)
- 10 μ l 1 Mastermiks 2 x konsentrasjon

For hver plate ble det laget opp 8 ekstra reaksjoner på grunn av tap av reagenser i pippetering. Mastermiksen ble laget opp på is og holdt mørkt til den skulle brukes. Mastermiksen ble pipptert over i PCR rekker med 8 sammenhengende rør fra Sarstedt. cDNA platene ble tatt ut fra frys rett før bruk og tint. De ble punnet 2 minutter ved 3000 rpm. Femten mikroliter mastermiks og fem mikroliter cDNA ble pipptert ut i 96 brønns plate av robot fra Beckman Coulter. Platene ble så godt forseglet med forseglingsfolie som fulgte med platene. Qpcr ble utført med LightCycler®480 Instrument I Oppsettet av Qpcr 'en ble gjort i LightCycler480® Software version 1.5. Oppsettet som ble brukt var:

- 95°C i 5 minutter for pre-inkubering. I dette steget ble Faststart TaqDNA polymerase aktivert og cDNA ble denaturert.
- 45 amplifiserings sykluser. Hver syklus bestod av et steg med denaturering av DNA heliksen ved 95 °C i 10 sekunder. 10 sekunder ved 55°C hvor primerne fikk festet seg.
- 72°C i 12 sekunder for Faststart TaqDNA polymerase til å produsere det spesifikke ampliconet. Etter hver syklus ble fluorescensen av SYBR Green målt.

Etter amplifiseringen ble det utført en smeltekurvsanalyse hvor temperaturen gradvis økte fra 65 °C til 97°C og hvor fluorescensen ble kontinuerlig målt.

3.10 Statistiske metoder og databehandling

De statistiske metodene ble utført med statistikkprogrammene JMP 8.0 (SAS) og Graphpad prism 5 . Alle data ble sjekket for homogen varians og for normalfordeling. Dette ble gjort ved visuell vurdering av residual plot. For data som oppfylte kriteriene ble toveis ANOVA utført med kjønn og stasjon som forklaringsvariabler. Tukey-kramer test ble brukt for å teste gjennomsnittet mellom mer enn to grupper (Zar 2010). Når datasett ikke hadde homogen varians ble datasettet log transformert og dataen ble igjen sjekket for homogen varians og for normalfordeling som nevnt ovenfor. Hvis datasettet oppfylte kriteriene for normalfordeling og homogen varians ble det utført toveis ANOVA med Tukey-kramer post hoc test.

Kondisjon hadde ikke homogen varians etter logtransformering og for qPCR analysen for VTG A var tre prøver under (IS2-19, FF-16 og EB9) deteksjonsgrensen. Den logtransformerte normaliserte genekspresjonen verdien til IS2-19, FF-16 og EB9 ble satt til 0. For kondisjon og VTG A ble det utført en ikke parametriske test for kjønn (Mann-Whitney) og for stasjonene (Kruskall-Walis)(Zar 2010) For stasjonene ble en Dunns post hoc test utført for å sammenligne gjennomsnittene mellom stasjonene (Zar 2010) For alle resultatene var signifikantsnivået satt til $\alpha=0,05$. Det ble utført en regresjonsanalyse mellom normalisert gen ekspresjon og CYP1A relative konsentrasjoner fra ELISA. Dette ble utført for stasjonene og kjønn (Zar 2010).

For noen analyser ble datasettet redusert. For leversomatisk indeks (LSI), gonadesomatisk indeks (GSI) og kondisjon var en fisk fra EB ikke med (EB7) fordi totalvekt av fisken var satt til 10,9 gram. For genekspresjonen var 3 prøver utelatt. To fra EB (EB-7 og EB-11) ble utelatt fordi de var degradert etter DNasebehandling. En prøve fra IS 2 (IS 2-16) ble utelatt fordi det ikke var noe RNA i prøven etter DNase behandling.

Genene ble normalisert med en metode utarbeidet av Vandesompele et al. (2002).

Normaliseringsfaktor ble utregnet ved å finne den relative ekspresjonen av hvert av de to referansegenene ubiquitin og S9. Den relative ekspresjonen ble regnet ved å sette den høyeste ekspresjonen til 1:

$$K_r = E^{C_t \Delta}$$

$$K_r = E^{(C_{tmin} - C_{tprøve})}$$

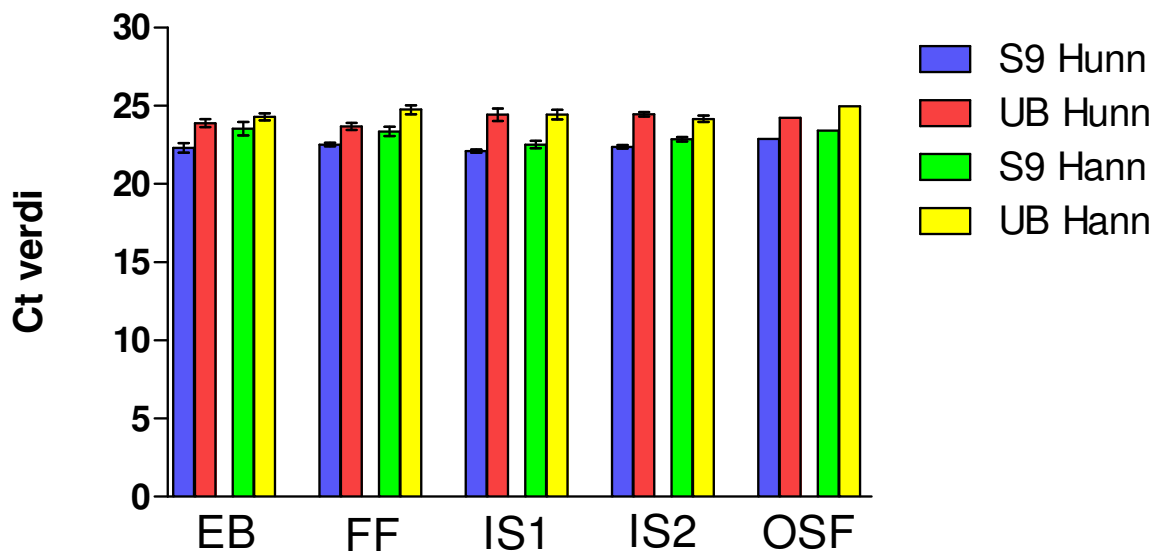
K_r = den relative kvantiteten til prøven med den høyeste ekspresjonen.

E = amplifiseringseffektiviteten til qPCR reaksjonen.

$minC_t$ = Laveste C_t verdi = C_t verdi til den prøven med høyest ekspresjon.

Det geometriske gjennomsnittet av de to referansegenene ble utregnet og brukt som normaliseringsfaktor. Den relative genekspresjonen ble utregnet for alle genene. Den relative genekspresjonen ble delt på normaliseringsfaktoren. Utregningene med effektivitet for de forskjellige genene finnes i vedlegg B. Genenorm ble brukt til å sjekken kvaliteten til kontrollgenene som var Ubiquition(UB) og S9. Genenorm regnet ut en M verdi til 0,648 for referansegenene (bare en verdi når det blir benyttet mindre enn 3 referansegener).

Ekspresjonen av disse genene var relativ stabil i de forskjellige kjønnene og i de forskjellige stasjonene (figur 3.4).



Figur 3.4: Gjennomsnittlig ekspresjon (C_t) av referansegenene for kjønnene og stasjonene. Gjennomsnittet er vist med \pm standardavvik. For OSF gruppene er $n=1$.

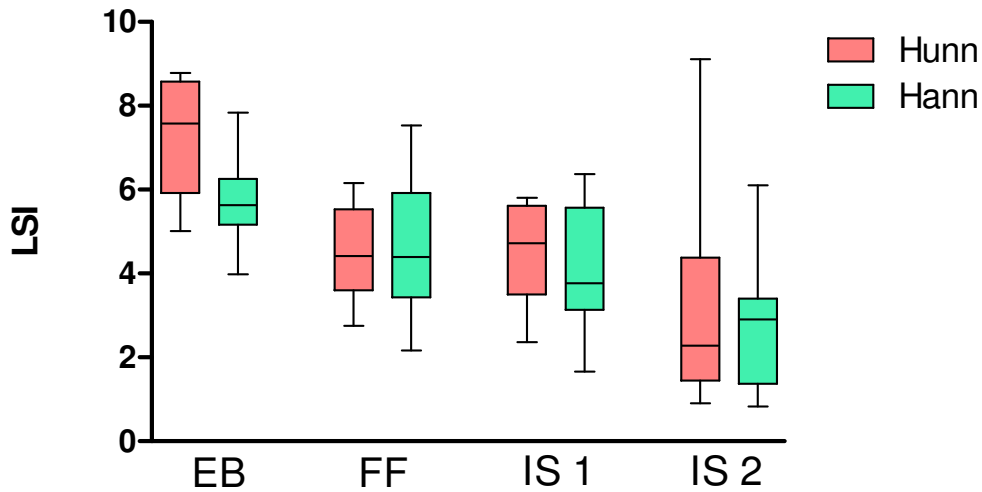
4. Resultater

4.1. Fysiologisk data

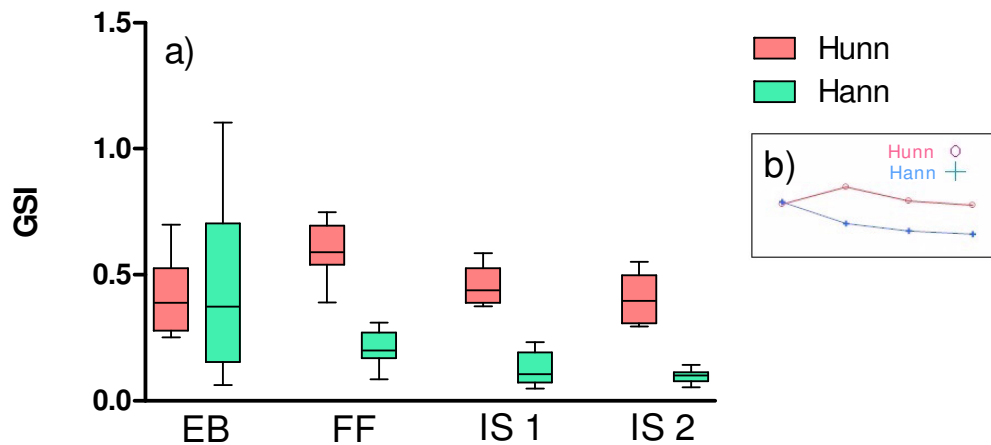
Toveis ANOVA viste at det var signifikant forskjeller mellom stasjonene for LSI ($p < 0,0001$; Figur 4.1). Tukey-kramer post hoc test viste at LSI for Egersundbanken var signifikant høyere enn ved de andre stasjonene (FF: $p = 0,0002$, IS 1: $p < 0,0001$ og IS 2: $p < 0,0001$; figur 4.1). Island 2 hadde signifikant lavere LSI enn de andre stasjonene (EB ($p < 0,0001$), FF($p = 0,003$) og IS 1 ($p = 0,01$); figur 4.1). Toveis ANOVA viste at det ikke var signifikant forskjellige LSI verdier mellom kjønnene ($p = 0,08$; figur 4.1). Interaksjonen mellom stasjon og kjønn var ikke signifikant ($p = 0,3$; figur 4.1)

Interaksjonen mellom stasjon og kjønn var signifikant for GSI ($p < 0,0001$; figur 4.2). Tukey-kramer post hoc test vist at det var tydelige signifikant forskjeller mellom kjønnene fra stasjon Firth of forth, Island 1 og Island 2 (figur 4.2). Hannfiskene fra Egersundbanken var også signifikant lavere enn hannfiskene fra Firth of Forth, Island 1 og Island 2 (figur 4.2) En full oversikt med hvilke stasjoner/kjønn som er signifikant forskjellig fra hverandre er vist i tabell 4.1 med p verdier.

For Kondisjonsfaktoren var variansen ulik mellom kjønnene/stasjonene. Men en Kruskal-Wallis test viste at det var signifikant forskjeller mellom stasjonene for kondisjonsfaktoren ($p < 0,0001$; figur 4.3). Dunns post hoc test viste at Egersundbanken hadde signifikant lavere kondisjonsfaktor enn Firth of Forth ($p < 0,001$), Island 1 ($p < 0,001$) og Island 2 ($p < 0,01$; figur 4.3). Mann Whitney test viste at det ikke var signifikant forskjeller mellom kjønnene ($p = 0,97$; figur 4.3).



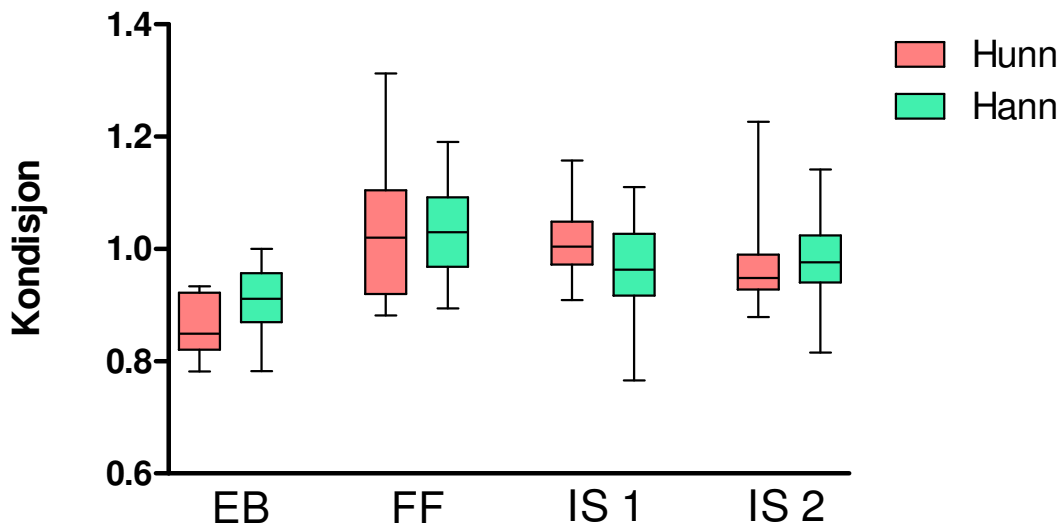
Figur 4.1: Leversomatisk indeks(LSI=100X levervekt/kroppsvekt) til hunnfisk og hannfisk fra de fire stasjonene. LSI verdiene er prestert med median, kvartiler og minimums og maksimumsverdier.



Figur 4.2: a) Gonadosomatisk indeks(GSII=100X gonade/kroppsvekt) til hunnfisk og hannfisk fra de fire stasjonene. GSI verdiene er prestert med median, kvartiler og minimums og maksimumsverdier. b) Minste kvadrats gjennomsnitt plot fra toveis ANOVA som viser interaksjonen mellom stasjon og kjønn.

Tabell 4.1: Sammenlikning av gonadosomatisk indeks (GSI) for de forskjellige stasjonene vist med p verdier. Signifikante forskjeller mellom de forskjellige stasjonene er merket med rødt og stjerne (Toveis-ANOVA $p < 0,0001$, Tukey-kramer post hoc test $p < 0,05$)

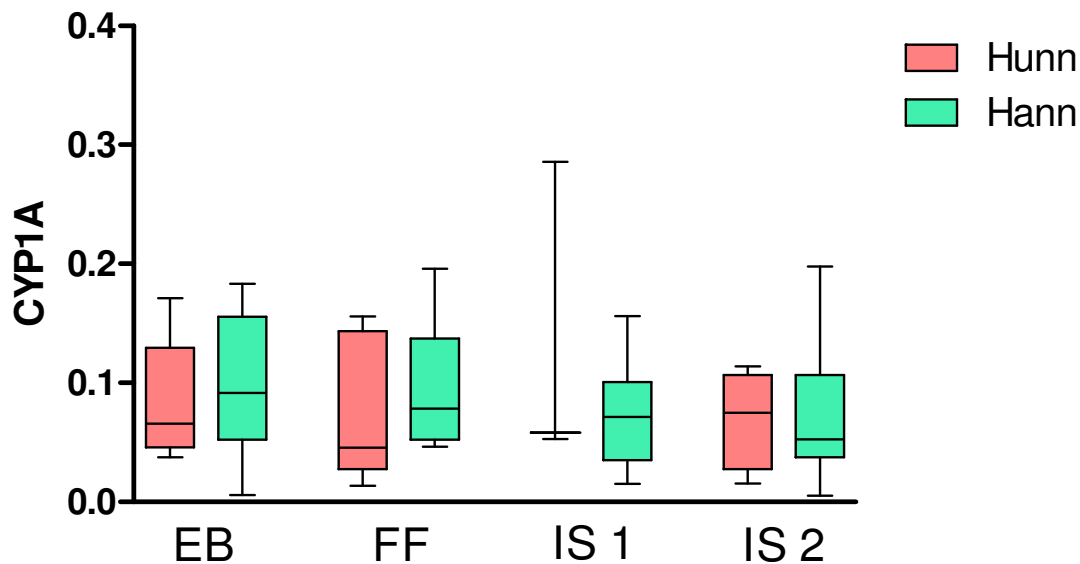
	EB ♂	FF ♀	FF ♂	IS 1 ♀	IS 1 ♂	IS 2 ♀	IS 2 ♂
EB ♀	1	0,1	0,05	1	0,0006*	1	0,0001*
EB ♂		0,1	0,001*	1	<0,0001*	1	<0,0001*
FF ♀			<0,0001*	0,4	<0,0001*	0,06	<0,0001*
FF ♂				0,005*	0,8	0,04*	0,5
IS 1 ♀					<0,0001*	1	<0,0001*
IS 1 ♂						0,0002*	1
IS 2 ♀							<0,0001*



Figur 4.3: Kondisjon ($100 \times \text{vekt} / \text{lengde}^3$) til hunnfisk og hannfisk fra de fire stasjonene. Kondisjon er prestert med median, kvartiler og minimums og maksimumsverdier.

4.2. CYP1A-konsentrasjoner i lever

Toveis ANOVA viste verken signifikant forskjeller mellom stasjonene ($p=0,8$), kjønnene ($p=0,8$; figur 4.4) for CYP1A konsentrasjonen og interaksjonen mellom stasjon og kjønn var ikke signifikant ($p=0,5$; figur 4.4). Verdiene for CYP1A konsentrasjonen var generelt lave (figur 4.4)



Figur 4.4: Relativ CYP1A konsentrasjon i lever (mOD/ μ g protein/min) hos hunn og hann fisk fra de forskjellige stasjonene presentert med median, kvartiler og minimums og maksimums verdier.

4.3 Primer spesifitet

Åtte av de ti primerne gav forventet amplikom størrelse. Gammaglutamylcystein-syntetase (GCS) eller heme oksygenase (HO) gav ikke forventet amplikom størrelse. For GCS ble det ikke dannet noe produkt. For Heme Oksygenase (HO) ble primerparet analysert i to replikater. I den ene brønningen ble det ikke dannet et bånd på elektroforesen, men i det andre replikatet var det et svakt bånd som lå utenfor forventet amplikonstørrelsen (1150 bp). qPCR resultatene viste ikke tegn til noe amplifisering av noe produkt i det hele tatt for GCS og for HO var det noen for prøver oppamplifisering av et produkt mellom cyclus 38 til 43.

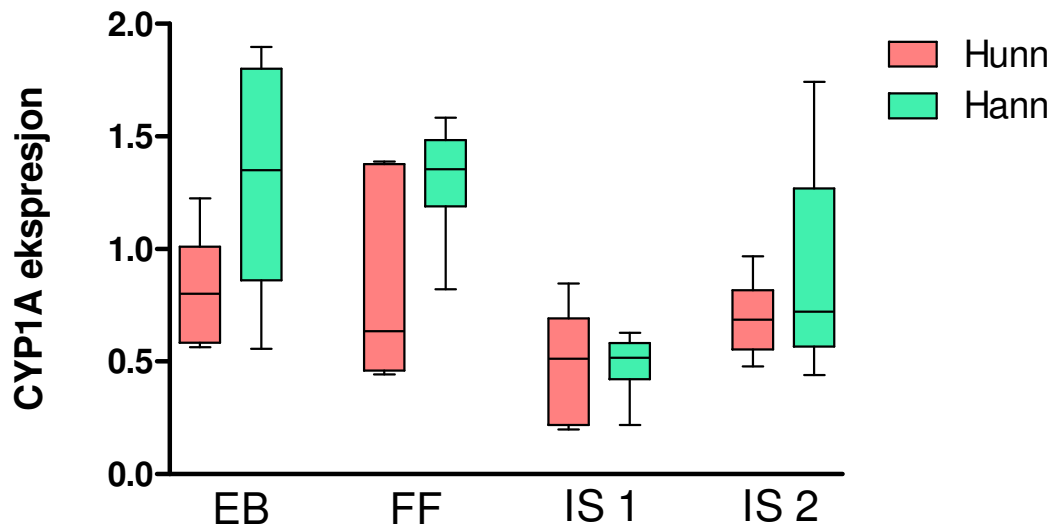
Tabell 4.2: Forventet amplikonstørrelse og amplikonstørrelse funnet ved gelelektroforese.* HO ble analysert i to brønner med qPCR produkt fra to forskjellige brønner fra qPCR platen. HO resultatene ga to forskjellige produkter; et på 0 bp og et på 1150 bp.

Navn på primer	Forventet amplikon størrelse (basepar)	Amplikon størrelse (basepar)
CYP1A	161	144
CYP3	134	122
UB	140	123
S9	104	97
GCS	125	0
MT	100	88
VTG A	174	158
VTG B	236	209
GR	108	100
HO	142	1150, 0*

4.4. Genekspresjon

4.4.1. CYP1A

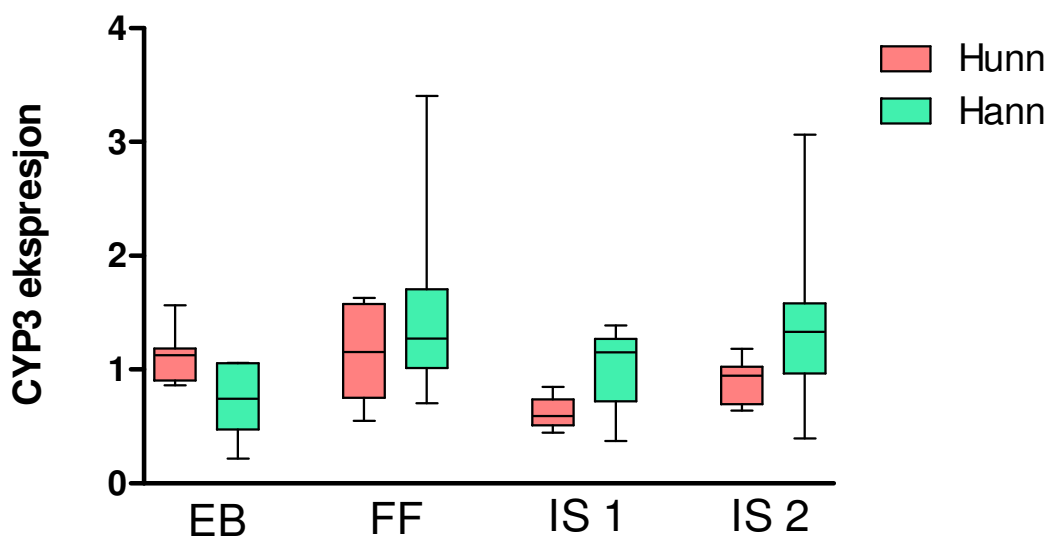
Toveis ANOVA viste signifikant forskjellig genekspresjon av CYP1A mellom stasjonene ($p < 0,0001$; figur 4.5). Tukey-kramer post hoc test viste at Island 1 hadde en signifikant lavere genekspresjon av CYP1A enn de andre stasjonene (EB: $p < 0,0001$, FF: $p < 0,0001$ og IS 2: $p = 0,03$; figur 4.5). Toveis ANOVA viste at hannfiskene hadde signifikant høyere genekspresjon av CYP1A enn hunnfiskene ($p = 0,002$; figur 4.5). Interaksjon mellom stasjon og kjønn var ikke signifikant for CYP1A genekspresjon ($p = 0,2$; figur 4.5).



Figur 4.5: Normalisert genekspressjon for cytokrom P450 1A (CYP1A) til hunnfisk og hannfisk fra de fire stasjonene presentert med median, kvartiler og minimums og maksimumsverdier.

4.4.2. CYP3

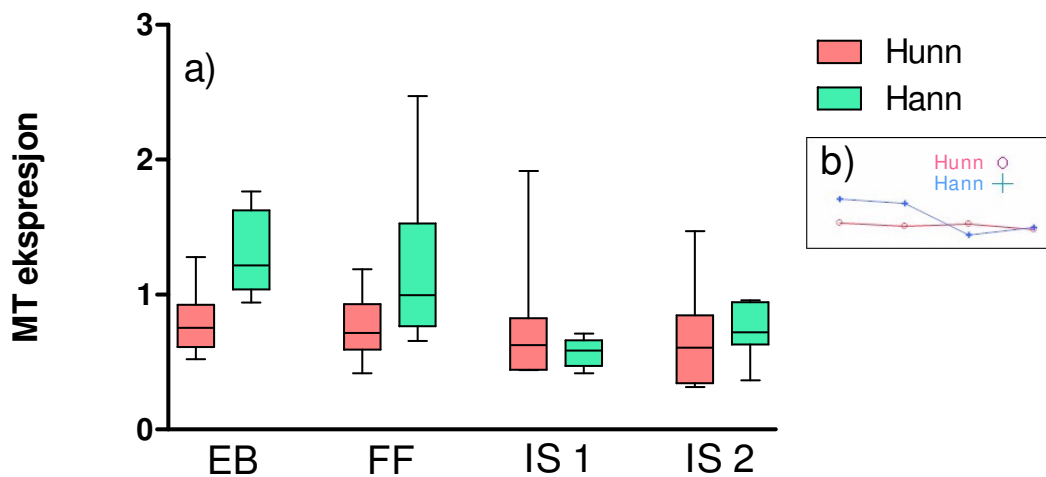
Toveis ANOVA viste signifikant forskjellig genekspressjon av CYP3 mellom stasjonene ($p=0,02$; figur 4.6). Tukey-kramer post hoc test viste at Island 1 hadde signifikant lavere CYP3 genekspressjon enn Firth of forth ($p=0,02$; figur 4.6). Det var ikke signifikant forskjellig CYP3 genekspressjon mellom kjønnene ($p=0,1$). Interaksjon mellom kjønn og stasjon var ikke signifikant for CYP3 genekspressjonen ($p=0,07$; figur 4.6).



Figur 4.6: Normalisert gen ekspressjon for cytokrom P450 3 (CYP 3) til hunnfisk og hannfisk fra de fire stasjonene presentert med median, kvartiler og minimums og maksimumsverdier.

4.4.3. MT

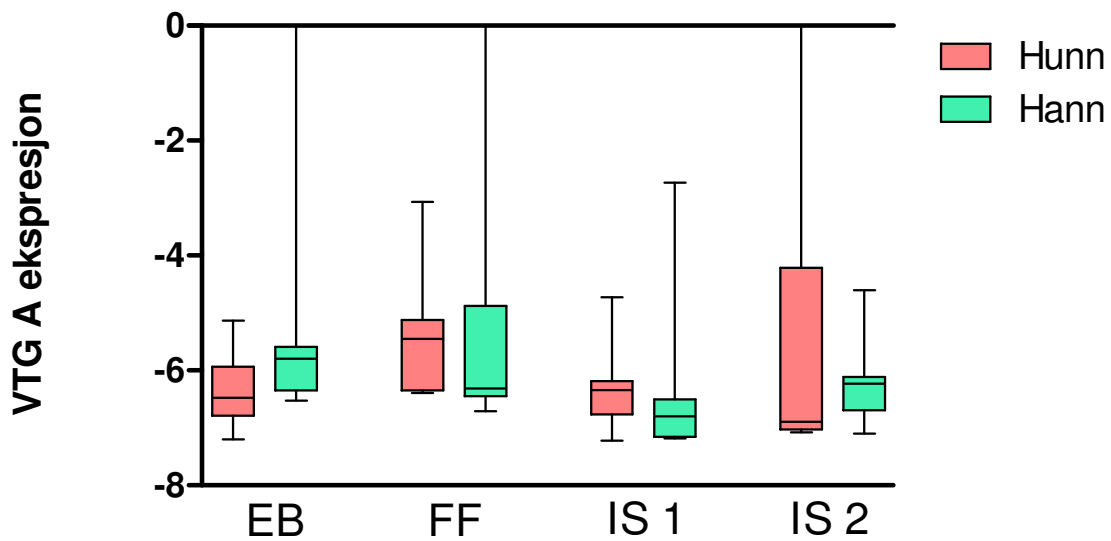
Interaksjonen mellom kjønn og stasjon var signifikant for MT genekspressjonen ($p=0,02$; figur 4,7). Tukey-kramer post hoc test viste at hannfiskene fra Egersundbanken hadde signifikant høyere genekspressjonen av MT enn hannfiskene fra Island 1 ($p=0,004$), og hunnene fra Island 2 ($p=0,04$; figur 4.7). Hannene fra Island 1 hadde også signifikant lavere genekspressjon av MT enn hannene fra Firth of forth ($p=0,01$; figur 4.7).



Figur 4.7: a) Normalisert genekspressjon for Metallothionein (MT) til hunnfisk og hannfisk fra de fire stasjonene presentert med median, kvartiler og minimums og maksimumsverdier. b) Minste kvadrats gjennomsnitt plot fra toveis ANOVA som viser interaksjonen mellom stasjon og kjønn.

4.4.4 VTG A

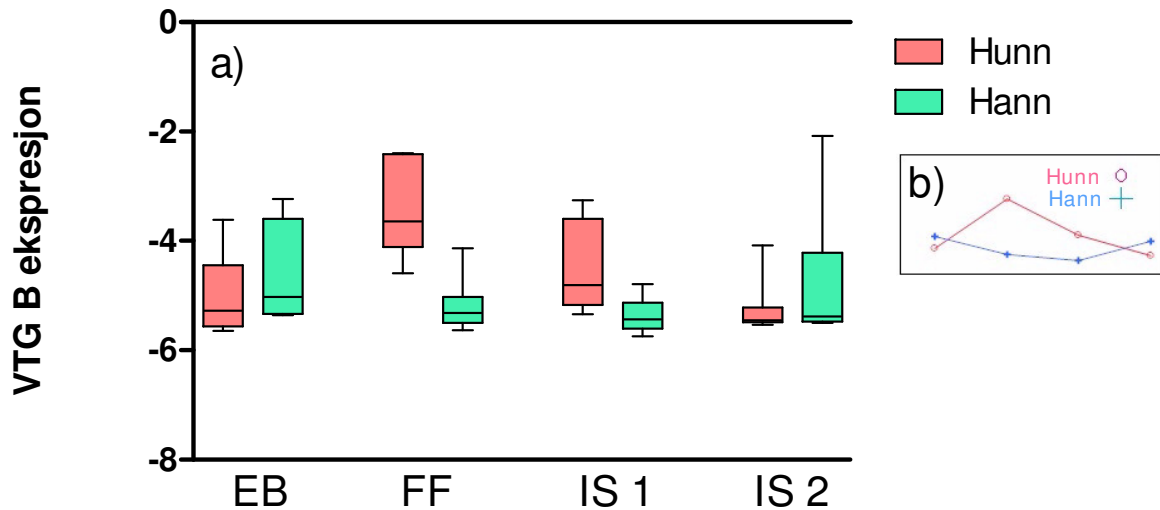
Mann-Whitney test viste at det ikke var signifikant forskjell mellom kjønnene ($p=0,97$; figur 4.8) for VTG A. Kruskal-Wallis test viste at det var signifikant forskjell mellom stasjonene ($p=0,03$; figur 4.8) for VTG A genekspressjon. Dunns post hoc test viste at Firth of Forth hadde signifikant høyere genekspressjon av VTG A enn Island 1 ($p<0,05$; figur 4.8).



Figur 4.8: Logtransformert normalisert genekspressjon for Vitellogenin A (VTG A) til hunnfisk og hannfisk fra de fire stasjonene presentert med median, kvartiler og minimums og maksimumsverdier. Tre av prøvene (IS2-19=♀, FF-16=♂ og EB9=♂) var under deteksjonsgrensen til qPCR for VTG A og ble gitt verdien 0.

4.4.5. VTG B

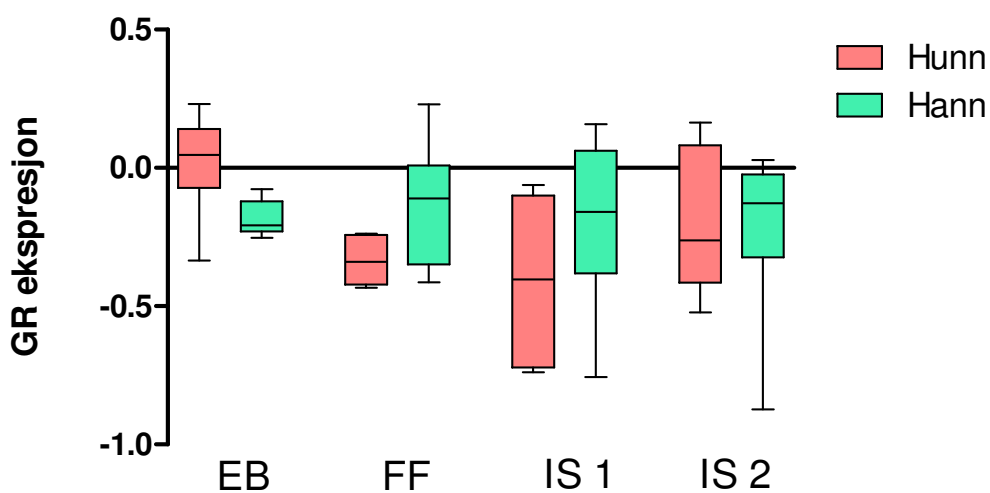
Interaksjonen mellom kjønn og stasjon var signifikant for VTG B genekspressjon ($p=0,0003$; figur 4.9). Tukey-kramer post hoc test viste at hunnfiskene fra Firth of Forth hadde signifikant høyere genekspressjon av VTG B enn hannene fra Island 1 ($P<0,0001$), Island 2 ($p=0,02$) og FF ($p=0,0007$; figur 4.9). Hunnfiskene fra Firth of Forth hadde også signifikant høyere genekspressjon enn hunnene fra Island 2 ($p=0,0008$) og Egersundbanken ($p=0,005$; figur 4.9). Det var stor variasjon for VTG B genekspressjonen (figur 4.9).



Figur 4.9: a) Logtransformert normalisert genekspressjon for Vitellogenin B (VTG B) til hunnfisk og hannfisk fra de fire stasjonene presentert med median, kvartiler og minimums og maksimumsverdier. b) Minste kvadrats gjennomsnitt plot fra toveis ANOVA som viser interaksjonen mellom stasjon og kjønn.

4.6.6. GR

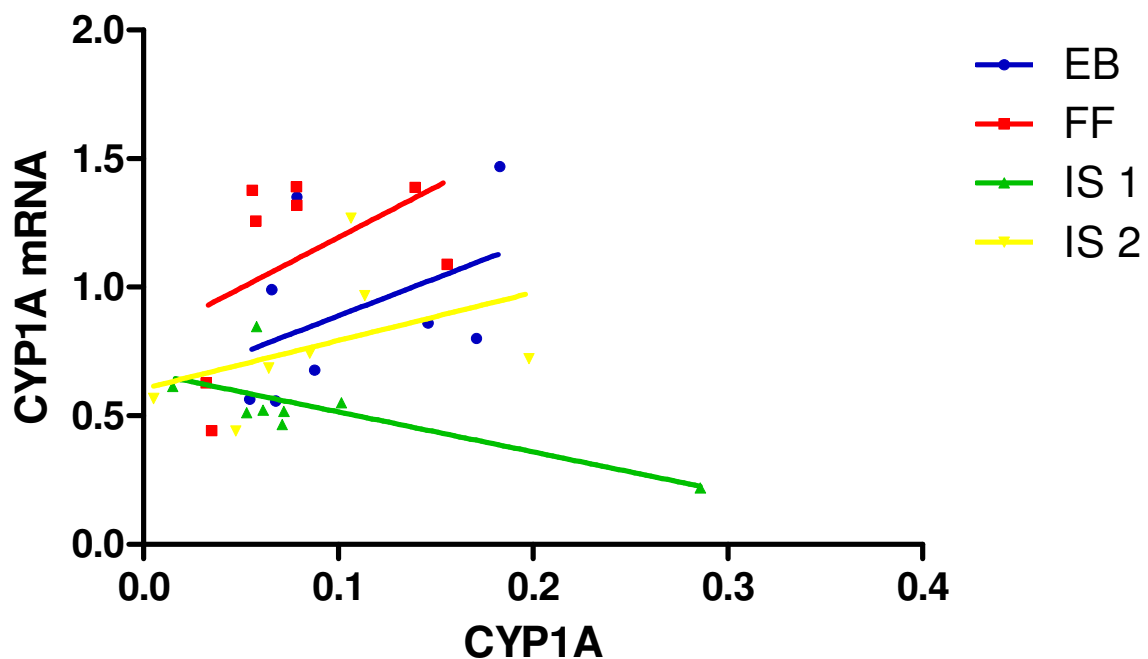
Toveis ANOVA viste at det var verken signifikant forskjeller mellom stasjonene ($p=0,2$), kjønnene ($p=0,6$; figur 4.10) for genekspressjonen av GR. Interaksjonen mellom stasjon og kjønn var ikke signifikant for GR genekspressjonen ($p= 0,8$; figurer 4.10).



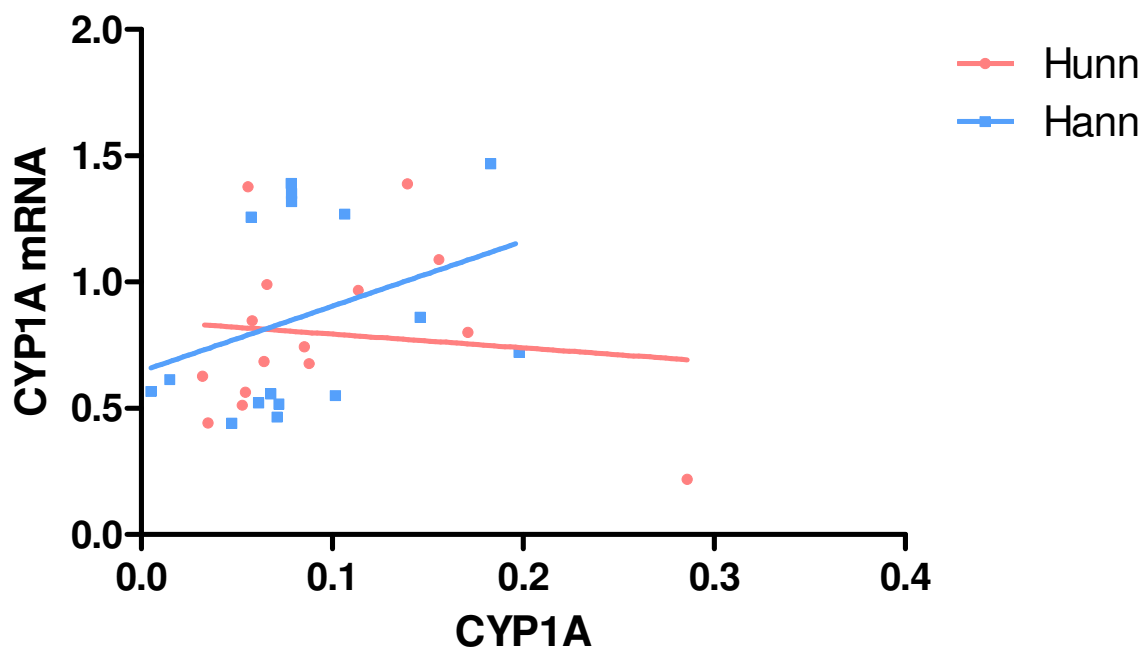
Figur 4.10: Log transformert normalisert gen ekspressjon for glutation reduktase (GR) til hunnfisk og hannfisk fra de fire stasjonene presentert med median, kvartiler og minimums og maksimumsverdier

4.7. CYP1A: Forhold mellom genekspresjon og konsentrasjon

Det ble utført to regresjonsanalyser. Regresjonsanalyser mellom CYP1A konsentrasjonen i lever og genekspresjon for CYP1A i lever for de forskjellige stasjonene og kjønn ble utført. Tre av stasjonene (EB, FF og IS 2) hadde positiv regresjon (fig 4.11), men regresjonen for disse tre stasjonene var ikke signifikant (EB: $p=0,3$, EB: R kvadrert = 0,19, FF: $p=0,2$ FF: R kvadrert=0,2333 og IS 2: $p=0,4$, IS 2: R kvadrert= 0,2; figur 4.11). Stasjonen Island 1 hadde negativ regresjon (fig 4.11). Regresjonen var signifikant ($p=0,03$; figur 4.11) og kunne forklare 56 % (R kvadrert) av variasjonen. Hannfiskene hadde en positiv regresjonslinje (fig 4.12), men regresjonen var ikke signifikant ($p=0,2$; figur 4.12) og kunne bare forklare 10 % (R kvadrert) av variasjonen. Hunnfiskene hadde en negativ regresjonslinje (fig 4.12), men regresjonen var ikke signifikant ($p=0,7$; figur 4.12) og kunne bare forklare 1 % (R kvadrert) av variasjonen.



Figur 4.11: Regresjonsanalyse mellom normalisert genekspresjon for CYP1A og CYP1A mengder (mODod/ μg protein/min) for de fire forskjellige stasjonene. Hvert punkt viser normalisert genekspresjon av CYP1A for hver CYP1A konsentrasjon.



Figur 4.13: Regresjonsanalyse mellom normalisert genekspressjon for CYP1A og CYP1A mengder (mOD/ μg protein/min) for kjønnene. Hvert punkt viser normalisert gen ekspressjon av CYP1A for hver CYP1A konsentrasjon.

5. Diskusjon

5.1 Metode utvikling.

Metode for RNA ekstraksjon egnet for torsk (Chomczynski et al. 1995; Lie et al. 2009a) egnet seg og for hyse. RNA fra lever til hyse har blitt opparbeidet før i en annen studie med utgangspunkt i guanidinium tiocyanat-fenol-klorform ekstraksjonsmetoden (Corripio-Miyar et al. 2007), men metode uten guanidinium tiocyanat har også vist seg å fungere (Reith et al. 2001). Det har blitt opparbeidet RNA fra hyse fra andre vev med utgangspunkt i guanidinium tiocyanat-fenol-klorform ekstraksjonsmetoden (Perez-Casanova et al. 2004; Perez-Casanova et al. 2006; Corripio-Miyar et al. 2007) og i flere av disse studiene er qPCR blitt brukt for å analysere genekspresjon (Reith et al. 2001; Perez-Casanova et al. 2004; Perez-Casanova et al. 2006; Corripio-Miyar et al. 2007). Kun i en av de nevnte studiene ble gentranskript som er relevant innen økotoksikologi undersøkt (Reith et al. 2001).

RNA integriteten for prøvene fra Oslofjorden var av svært høy kvalitet mot prøvene fra ICON stasjonene hvor det var vanskelig å nå ønskelig RNA integritet. Dette kan tyde på at prøvene har vært tint og frosset en gang mellom lagring og opparbeiding, men forskjellene kan også være på grunn av forskjellig lagringstid. Dette viser viktigheten av å være påpasselig med riktig lagring av prøvene (Bustin et al. 2004; Bustin et al. 2009). RNA integriteten ble litt forringet etter DNasebehandling, men ved bruk av referansegener blir effekten av degraderingen mindre betydelig (Fleige et al. 2006). I tillegg hadde alle prøvene RIN verdier over 5 som har vist seg å være tilstrekkelig for qPCR (Fleige et al. 2006; O-Charoen 2008).

Resultatet fra gelelektroforese gav forventede amplikonstørrelse for genene. Dette gjaldt for alle produktene unntatt for HO og GCS. I det ene replikatet for HO var det et svakt signal fra et produkt 1150 basepar. Dette produktet gav et mye lavere signal enn de andre produktene og var langt større enn forventet amplikon. Dette resultatet kan ha to årsaker. Det kan være genomisk DNA kontaminering eller primerparet kan oppamplifisere et uønsket primerprodukt på 1150 basepar. Kvaliteten på referansegenene var godkjent (Vandesompele et al. 2002), men med mer tid og ressurser hadde det vært optimalt å teste flere referansegener (Olsvik et al. 2008). Resultatene fra qPCR tyder det på at torsk er såpass nært beslektet (Teletchea et al. 2006) med hyse at gener fra torsk kan brukes til qPCR for hyse, men resultatene fra GCS og HO viser at det ikke er uproblematisk å bruke gensekvenser fra andre arter.

5.2 Fysiologiske parametere

LSI var signifikant høyere for hyse innsamlet ved Egersundbanken enn for hyse ved de andre stasjonene, mens hysene fra Island 2 hadde signifikant lavere LSI enn hyse ved de andre stasjonene. LSI verdier kan være påvirket av dietten. En høyere andel fett i dietten kan gi høyere LSI verdier (Fåhraeus-Van Ree et al. 2003). LSI har også blitt vist i studier å variere gjennom året på grunn av faktorer som mattilgang og kjønnsmodning (Slooff et al. 1983; Aas et al. 2001). Fiskene fra Egersundbanken som hadde signifikant høyere LSI enn ved de andre stasjonene, var også de minste fiskene. Større fisk kan ha ofret energireserver for å vokse mens andre fisk kan ha lagret større energireserve mot å vokse (Leamon et al. 2000). De høyere LSI verdiene hos hyse ved Egersundbanken sammenlignet med de andre stasjonene kan være et tegn på bedre næringstilgang ved Egersundbanken, eller at hyse ved Egersundbanken har større energireserve enn hyse ved de andre stasjonene undersøkt.

Forurensning kan påvirke LSI og gi en høyere LSI. En økning i LSI kan være forårsaket være forårsaket av en induksjon av enzymer som er viktig for xenobiotisk biotransformasjon som kan føre til hepatologiske endringer (de la Torre et al. 2007; Maronpot et al. 2010). Økning av LSI har blitt vist ved eksponering for PCB'er og PAH'er (Everaarts et al. 1993; Beyer et al. 1996). En reduksjon i LSI kan være forårsaket av en mer generell forurensning som påvirker energibudsjettet hos fisken (Schwaiger et al. 1997; Smolders et al. 2003) Det har blitt vist at eksponering for PAH'er (Aas et al. 2001) PCB'er (Ørn et al. 1998) og kan gi en reduksjon i LSI. I en oversiktsartikkel av Van der Oost (2003) viste det seg at den mest generelle påvirkningen på LSI var enten ingen effekt eller en økning av LSI. Siden LSI både kan minke og øke ved forurensning er det vanskelig å tolke LSI alene.

GSI var signifikant høyere hos hunnfisk enn hos hannfisk i denne studien. Hannfiskene fra Egersundbanken hadde signifikant høyere GSI enn hannene fra de andre stasjonene. Forskjellene mellom hunn og hannfiskene er forventet ut i fra forskjellig størrelse på gonadene mellom hunnfisk og hannfisk . Lavere GSI kan være et tegn på påvirkning av stoffer som øker aktiviteten av CYP1A. GSI har vist seg å være negativt korrelert med CYP1A aktiviteten i lever hos fisk (Kirby et al. 1999; Hansson et al. 2006; Kopecka et al. 2008). Lavere GSI verdier kan også være et tegn på endokrin forstyrrelse, både hos hunnfisk (Van den Belt et al. 2002; Versonnen et al. 2003; Meier et al. 2007; Lie et al. 2009b) og hannfisk

(Jobling et al. 1996; Van den Belt et al. 2002; Meier et al. 2007). GSI har vist å bli påvirket ved eksponering for alkylfenol (Jobling et al. 1996; Meier et al. 2007), østrogen (Van den Belt et al. 2002; Versonnen et al. 2003; Meier et al. 2007) og klorerte hydrokarboner (Versonnen et al. 2003). GSI verdiene var alle lave og det kan forklares med at hysene ble prøvetatt i perioden etter gyting og før fisken har begynt å allokere resurser til gyting igjen (Filina et al. 2009). Siden hysen ble prøvetatt i denne perioden hvor fisken har naturlig lavest GSI verdier og de små forskjellene kan mistolkes, bør resultatene av GSI tolkes med forsiktighet.

Hyse fra Egersundbanken, hadde signifikant lavere kondisjonsfaktor enn hyse fra de andre stasjonene, men det var ingen kjønnsforskjeller i denne studien. Kondisjonsfaktoren kan påvirkes av faktorer som vandring, kjønnsmodning og tid på året (Janssen et al. 1995; Sleiderink et al. 1995b; Saborowski et al. 1996) At det ikke var kjønnsforskjeller tyder på at den seksuelle modningen hos hysene ikke påvirket resultatet (Saborowski et al. 1996). Generelt sier kondisjonsfaktoren noe om ernæringstilstanden til fisken (Saborowski et al. 1995; Saborowski et al. 1996; Khan 2010) Ved eksponering for en miljøgift er en vanlig respons økt metabolisme eller redusert næringsinntak. Dette vil redusere kondisjonsfaktoren (Smolders et al. 2003). Energi som ville bli brukt til vekst vil i stedet bli brukt til å bli brukt til biotransformasjon av de toksiske stoffene. CYP1A aktivitet og konsentrasjon har blitt vist å ha en invers sammenheng med kondisjonsfaktoren (Sleiderink et al. 1995a; Kirby et al. 1999). Lavere kondisjonsfaktor har tidligere blitt funnet i studier hvor fisk har blitt eksponert for syntetisk produsert vann (Holth et al. 2008) og PAH'er (Heintz et al. 2000; Stephens et al. 2000; Aas et al. 2001; Holth et al. 2008).

Lavere kondisjonsfaktor hos hysene fra Egersundbanken kan tyde på at disse fiskene er mer påvirket av forurensning enn hysene ved de andre stasjonene, men som for LSI kan forskjellene også være forårsaket av næringstilgangen. Hvis de fysiologiske faktorene kan forklares ut ifra næringstilgang så gir LSI og kondisjon motstridende resultater. Ut ifra LSI er næringsforholdene best ved Egersundbanken, mens resultatene for kondisjonsfaktoren tyder på at næringsforholdene er dårligst ved Egersundbanken. De kan tyde på at det kan være en annen forklaring på forskjellene. De fysiologiske parameterne viser det er forskjeller mellom hysene fra Nordsjøen og islandske farvann. Kondisjonsfaktor og LSI kan tyde på at hyse fra Egersundbanken er mer påvirket av forurensning som kan forårsake en økning av LSI enn hyse fra de andre stasjonene. GSI derimot tyder på det motsatte, men disse forskjellene sees

bare hos hannene og siden gonadene er i den perioden hvor de er minst relativt til kroppsstørrelsen bør resultatene for GSI tolkes med forsiktighet.

5.3 CYP1A protein konsentrasjon og CYP1A mRNA i lever

Det ble ikke funnet signifikant forskjell i CYP1A mengde i lever mellom stasjonene eller kjønn. Hyse ved Island 1 hadde signifikant lavere CYP1A genekspressjon hyse ved enn de tre andre stasjonene og hannfiskene hadde signifikant høyere genekspressjon enn hunnene. Regresjonsanalysene gav tvetydig svar. Verken for kjønnene eller tre av stasjonene var det noen sammenheng mellom CYP1A og CYP1A mRNA, men for Island 1 var det en signifikant korrelasjon.

Forskjellene mellom genekspressjon ved Firth of Forth og Island 1 kan trolig forklares med forurensningsbelastning ved Firth of Forth. Ved elvutløpet av Firth er det høy industriell aktivitet, som også har petrokjemisk virksomhet. Denne virksomheten slipper ut metaller, PAH'er og klororganiske stoffer (Elliott et al. 1987). Det har vist seg at miljøer med PAH forurensning ofte oppregulerer CYP1A mRNA i lever hos fisk (McClain et al. 2003; Williams et al. 2003; George et al. 2004; Roling et al. 2004; Malins et al. 2006; Lie et al. 2009a). Det samme er blitt vist med PCB (Fisher et al. 2006; Malins et al. 2006; Quiros et al. 2007b; Lie et al. 2009a; Olsvik et al. 2009a) og andre klororganiske stoffer (Quiros et al. 2007a).

Høyere genekspressjon av CYP1A i hyse ved Egersundbanken sammenlignet med hyse ved Island 1 og forskjellene av CYP1A genekspressjon for hyse mellom de to stasjonene på Island er mer overraskende funn. Egersundbanken ligger i Nordsjøen hvor det er stor offshore aktivitet (Hylland et al. 2006b), men det er ingen offshore aktivitet i nærheten av Egersundbanken (Hylland et al. 2006b) og området er brukt som referanseområde i økotoksikologiske studier (Westerlund et al.). Men persistente organiske miljøgifter er brytes langsomt ned og kan føres med havestrømmer og i tillegg tilføres fra atomsfæren (Chapman et al. 2003; OSPAR 2010). Atomsfærisk transport av PAH'er er også en viktig kilde som forårsaker forurensning for nord Atlanteren (OSPAR 2010). I et stort internasjonalt overvåkningsprogram ble det oppdaget at overflatevann fra referansestasjonen 100 km unna oljeproduksjon induverte arylhydrokarbon reseptor aktivitet (Thomas et al. 2006). Island 1 stasjonen ligger på sydøst kysten av Island, mens Island 2 stasjonen ligger utenfor hovedstaden Reykjavik. I havnen i Reykjavik er det påvist PAH forurensning (Stephensen et al. 2000), dette kan være en forklarende variabel, men det er lite sannsynlig siden studien

gjort av Stephensen et al. (2000) ble gjort i havnen i Reykjavik, mens fiskene fra Island 2 ble trålet i åpent hav utenfor Reykjavik.

Det var ingen signifikant forskjellig genekspressjon av CYP1A hos hyse ved Firth of Forth sammenlignet med hyse fra Island 2. En årsak kan være tilpassning til kronisk forurensning som hemmer induksjonen CYP1A og gentranskripsjonen av CYP1A. CYP1A ble ikke lenger induisert i regenbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytter som var eksponert for PCB over 15 uker (Celander et al. 1995). Både en fisk i torskfamilien (*microgadus tomcod*) og karpefisken (*Fundulus heteroclitus*) har vist seg å utvikle resistans mot miljøgifter som inducerer CYP1A (Wirgin et al. 2004). De to samme artene viste seg å ha en nedsatt gentranskripsjon av CYP1A ved både PCB og PAH eksponering (Courtenay et al. 1999; Meyer et al. 2003). Forurensning ved Firth of Forth kan bestå av en kompleks blanding som muligens kan påvirke både genekspressjonen av CYP1A og CYP1A proteinmengde. Østrogen kan inhibere CYP1A genekspressjonen (Navas et al. 2001; Sole et al. 2002; Mortensen et al. 2007) og protein induksjonen (Elskus 2004). Torsk som har blitt eksponert for alkylfenoler som kan inducere østrogen har vist seg å nedregulere CYP1A genekspressjonen (Olsvik et al. 2009b). Metaller kan også være medvirkende til både en hemming av CYP1A protein induksjon (Sorrentino et al. 2005; Lewis et al. 2006; Anwar-Mohamed et al. 2009) og CYP1A genekspressjonen (Risso-de Faverney et al. 2000; Sorrentino et al. 2005; Lewis et al. 2006; Woo et al. 2009) Mekanismen bak dette kan være oksidativt stress (Risso-de Faverney et al. 2000). eller interaksjoner med responselementer i promotoren til CYP1A (Lewis et al. 2006). En inhibering av CYP1A genekspressjonen kan være en forklaring for mangel på forskjell av CYP1A genekspressjon mellom hyse fra Island 2 og Firth of Forth, men dette er usikkert. Det er vanskelig å forutsi hva slags interaksjoner forurensning ved Firth of Forth kan forårsake. Genekspressjonen av CYP1A har også vist seg å øke ved metallforurensning (Kessabi et al. 2010).

Forskjellig CYP1A mRNA genekspressjon mellom kjønnene som ble observert i denne studien er blitt beskrevet tidligere (Courtenay et al. 1994; Williams et al. 1998; Meyer et al. 2005) og forskjellig CYP1A aktivitet mellom kjønnene er godt dokumentert. Kjønnsmodning har vist å være viktig for denne forskjellen (Whyte et al. 2000). CYP1A genekspressjonen har blitt nedregulert av østradiol i regenbueørret hepatocytter, men det var fortsatt en oppregulering av CYP1A genekspressjonen ved eksponering av det xenobiotiske stoffet beta-Naphthoflavon (Navas et al. 2001). Liknende resultater er funnet hos laks (*Salmo salar*) eksponert for etynyl

østradiol og DMSO (Mortensen et al. 2007). Men trepigget stingsild (*Gasterosteus aculeatus*) viste seg å ha en signifikant høyere CYP1A genekspressjon når fiskene var eksponert for både PAH'en dibenzantrasen og østradiol sammenlignet med bare dibenzantrasen (Geoghegan et al. 2008). Hannfisk vil derfor ikke være alene om å ha muligheten til respondere på forurensning som aktiverer CYP1A genekspressjonen.

Det har blitt vist sammenheng mellom transkripsjons og proteinnivåer for CYP1A (Haasch et al. 1993; Stagg et al. 2000; Arinc et al. 2001), men det finnes unntak (Tom et al. 2003; George et al. 2004; Holth et al. 2010). Mangel på sammenheng mellom CYP1A aktivitet og CYP1A genekspressjon har også blitt vist (Willett et al. 1997; George et al. 2004; Kammann et al. 2008), som også ble funnet for begge kjønn og tre av stasjonene i denne studien. Mangel på signifikant korrelasjon mellom protein og RNA transkript er også blitt funnet for MT (Quiros et al. 2007b). Det er flere mulige faktorer som kan påvirke forholdet mellom protein og mRNA. Hos fisk har det blitt vist at genekspressjonen av CYP1A blir raskt oppregulert ved eksponering for TCDD eller beta-naptoflavon, men gentranskripsjonen blir raskt nedregulert igjen (Klopper-Sams et al. 1994; Sadar et al. 2001). I en studie ble det vist at CYP1A proteinet hos *Fundulus heteroclitus* var uvanelig stabilt (Klopper-Sams et al. 1994). Fisk er ofte ikke stasjonære slik at eksponering for fremmedstoffer kan variere. Ved å opphold seg i et forurenset område over kun kort tid kan det tenke seg at fisk kan oppregulerer CYP1A gentranskripsjon men unngå en induksjon av CYP1A proteinet. Mangel på CYP1A protein induksjon hos vill fisk i Nordsjøen ved forurensningskilder har blitt vist i tidligere studier (Forlin et al. 2006; McIntosh et al. 2006). Dette kan forklare de manglende forskjellene i CYP1A konsentrasjon mellom stasjonene som ble funnet i denne studien. Forskjellig forurensning vil også kunne påvirke CYP1A konsentrasjonen. Det har vist seg at lavmolekylære PAH'er inhiberer produksjonen av CYP1A protein og aktiviteten (McKee et al. 1983; Willett et al. 2001) som er en stor del av forurensningen av PAH'er fra offshore virksomheten (Harman et al. 2009). Det komplekse forholdet mellom mRNA og protein og har blitt vist i studier med ville fisk hvor det var høy biologisk varians og ingen sammenheng mellom CYP1A transkriptet og proteinet. (Tom et al. 2003; George et al. 2004). Mulighet for vandring mellom forskjellig forurensnings eksponering og høy naturlig biologisk varians kan være en forklaring på den signifikante og negative regresjonen for IS 1.

Det er mulig at de signifikante forskjellene mellom Island 1 og Firth of Forth kan være forårsaket av forurensning. Forskjellene mellom Island 1 og de to andre stasjonene; Island 2

og Egersundbanken kan også være forårsaket av forurensning. Dette ble vist at det var forskjeller i CYP1A genekspresjon mellom hyse fra Nordsjøen og islandske farvann, men ingen forskjell i CYP1A konsentrasjon mellom noen av stasjonene.

5.4 CYP3

CYP3 genekspresjon var signifikant høyere for hysen ved Firth of Forth sammenlignet med Island 1. Det var ikke signifikant forskjeller mellom kjønnene. Kjønnforskjeller har blitt rapportert for CYP3 under gyting (Andersson 1992), men hysene ble fanget uten for gytesesongen (Pethon 1998). Den signifikant høyere genekspresjonene av CYP3 i det forurensende Firth of Forth stemmer overens med litteraturen. Ved firth of Forth har det vist seg at det er forurensing av klororganiske stoffer (Elliott et al. 1987). Laksabbor (*Micropterus salmoides*) eksponert for et klororganisk stoff viste signifikant ekspresjon av CYP3 (Blum et al. 2008). Samme effekt er vist for det klorerte hydrokarbonet 1,1-Dikloro-2,2-bis(p-klorofenyl)etylene (DDE) for laks (Mortensen et al. 2006) og atrazine hos sebrafisk (*Danio rerio*). Sebrafisk larver hadde oppregulerte CYP3 genekspresjonen etter eksponering for dioksinet 2,3,7,8-tetrakloro-dibenzo-p-dioksin (TCDD) og den syntetiske antibiotikaen rifampicin (Tseng et al. 2005). Om CYP3 gen transkripsjonen har blitt opp eller nedregulert av annen forurensing er vanskelig å si på grunn av sprikende resultater i tidligere studier. Østrogeninduserende alkylfenoler nedregulerte CYP3 mRNA hos torsk (Olsvik et al. 2009b) og nedregulerte CYP3 proteinmengden hos både torsk og laks (Arukwe et al. 1997; Sturve et al. 2006), mens Hasselberg et al. (2004b) fant at CYP3 ble oppregulert hos hannfisk som var eksponert for alkylfenol, men ingen effekt hos hunnfisk. Arukwe et al. (1997) og Hasselberg et al. (2004b) eksponerte også fisk for østradiol. Det ble da funnet at østradiol oppregulerte CYP3 protein mengden hos hannfisk, mens det var ingen effekt hos hunnfisk. Arukwe et al. (1997) fant en nedregulering hos fisk som ble eksponert for østradiol. Men det ikke blitt målt noen mengder av hormonvirkende stoffer ved Firth of Forth (Elliott et al. 1987; Balls et al. 1997) Den mest selvsagte forklaringen på mangel av forskjeller mellom hysene fra de andre stasjonene enn Island 1 og Firth of Forth kan være fordi det ikke er noe forskjellig belastning av stoffer som aktiverer CYP3 genekspresjon. Det ble vist en forskjellig i CYP3 genekspresjon mellom hyse fra Nordsjøen og Island i denne studien. Forskjellene mellom hysene fra Firth of Forth og Island 1 kan være en effekt av forskjellig eksponering av stoffer som fører til økt CYP3 genekspresjon.

5.5. MT

Interaksjonen mellom stasjonene og kjønnene for genekspresjonen av MT var signifikant. Hannfiskene fra Egersundbanken hadde signifikant høyere ekspresjon av MT enn hannfiskene fra Island 1 og hunnene fra Island 2. Hannene fra Island 1 hadde også signifikant lavere ekspresjon av MT enn hannene fra Firth of Forth.

Forskjellen mellom hannfisk fra Island 1 og Firth of Forth kan forklares med at MT har vist seg å bli induert i fisk i miljøer med metallforurensning (George et al. 2004; Laurie 2004; Hansen et al. 2006; Hansen et al. 2007; Hansen et al. 2007). Dette har også blitt vist i laboratoriestudier (George et al. 2004; Sheader et al. 2006; Minghetti et al. 2008; Illuminati et al. 2010; Kessabi et al. 2010; Søfteland et al. 2010) Den signifikant forskjellen mellom hannfisken fra Island 1 og Egersundbanken er vanskeligere å forklare, Det mest åpenbare vil være forskjellig metallbelastning. Det har blitt foreslått at proteinmengden av intracellulær metallotionein kan være en biomarkør for oksidativt stress (Wright et al. 2000; Chesman et al. 2007). Egersundbanken hadde enn høyere induksjon av CYP1A enn ved Island 1 og plane PAH'er har vist seg å induere CYP1A (Sarasquete et al. 2000) PAH'er kan også induere oksidativt stress som kan være en forklaring på høyere MT induksjon ved Egersundbanken sammenlignet med Island 1 (Dizdaroglu et al. 2002; Timme-Laragy et al. 2009). Men PAH'er har også vist seg å inhibere MT protein induksjonen (van den Hurk et al. 2000), mens andre studier har vist at det blir en synergistisk effekt av metall og PAH eksponering (Romeo et al. 1997).

Denne studien viste forskjeller mellom kjønnene av MT gen ekspresjon som er blitt rapportert tidligere (Knapen et al. 2007). En forklaring for dette er at MT regulerer tilgjengeligheten av sink under induksjonen av vitellogenein (Olsson et al. 1989) og økningen av MT og sink hos hunnfisk er forårsaket av seksuell modning (Hylland et al. 1992). Hysene i denne studien var utenfor Vitellogenese (Sumpter et al. 1995; Pethon 1998), så forklaring på den signifikant lavere genekspresjonen av MT for hunnene ved Island 2 sammenlignet med hannene fra Egersundbanken kan være på grunn av forskjellig eksponering av forurensning. Det er en lik trend for begge kjønnene innad på begge stasjonene. For de signifikant forskjellene av MT genekspresjon mellom hannene fra Island 1 og Firth of Forth kan forurensning være en forklaring. Hysene fra begge stasjonene i Nordsjøen hadde en signifikant høyere genekspresjon av MT enn stasjonene ved Island.

5.6. VTG

For VTG A ble det ikke funnet signifikant forskjeller mellom kjønnene, men en signifikant forskjellig gentranskripsjon mellom Island 1 og Firth of Forth. For VTG B ble det vist at hunnfiskene fra Firth of Forth hadde signifikant høyere transkripsjon av VTG B enn hannene fra Island 1, Island 2 og Firth of Forth. Hunnfiskene fra Firth of Forth hadde også signifikant høyere induksjon av VTG B gentranskripsjon enn hunnene fra Island 2 og Egersundbanken.

At østrogen er viktig for VTG syntesen er velkjent (Sumpter et al. 1995). Det har også vist en sammenheng mellom kjønnsmodning hos hunner og VTG mRNA (Funkenstein et al. 2004) og er derfor naturlig at hunnfisken har høyere induksjon av VTG. Det burde kunne forventes forskjeller mellom hunnene og hannene for VTG nivåer. Den mest naturlige forklaring på denne manglende forskjellen er at fiskene ble fanget utenfor gytesesongen (Heath et al. 1998; Pethon 1998) og hunnfisken derfor ikke påvirket av vitellogenese. I tillegg kan en del av fiskene som ble prøvetatt ikke vært kjønnsmodne (ICES). En annen forklaring for manglende forskjeller mellom kjønnene kan være eksponering som hemmer kjønnsmodningen hos både hunner og hanner. Alkylfenoler har vist seg å hemme modingen hos hunnfisk (Meier et al. 2007; Lie et al. 2009b) og indusere VTG hos hannfisk (Jobling et al. 1996; Hylland et al. 1997; Meier et al. 2007).

Oppregulert VTG hos hannfisk er et tegn på forurensning av østrogen virkende stoffer (Denslow et al. 2001; McClain et al. 2003; George et al. 2004; Zapata-Perez et al. 2007; Blum et al. 2008; Geoghegan et al. 2008; Vega-Lopez et al. 2008; Ferreira et al. 2009; Olsvik et al. 2009a). Den signifikant forskjellige ekspresjonen av VTG A mellom Island 1 og Firth of Forth kan være på grunn av forskjellige eksponering av østrogen virkende stoffer, men da burde det blitt observert forskjell mellom kjønnene og. Det ble ikke funnet noe signifikant forskjellig ekspresjon mellom hannene fra noen av stasjonene for VTG B. Mangel på forskjeller kan være en tilpassning gjennom forskjellige mekanismer (Greytak et al. 2010). Tilpassning til kronisk eksponering som fører til en mindre sensitiv indusering er kjent og vist for blant annet CYP1A induserende stoffer (Wirgin et al. 2004) Det har også vist seg at det kan være stor naturlig variasjon av induksjon av VTG mRNA hos hannfisk (George et al. 2004) som kan gjøre det vanskelig oppdage forskjeller. Stor variasjon blant hannene ble også funnet i denne studien. PAH'er har vist seg å ha en antiøstrogen effekt som kan maskere forskjellene mellom stasjonene (Navas et al. 2000), men det har også vist seg at PAH og PAH- metabolitter kan indusere østrogen (Villeneuve et al. 2002; Gozgit et al. 2004). Så

forskjellig PAH belastning kan være en forklaring på mangel på forskjeller, men det er også en mulighet at det ikke er noen forskjellige eksponering av østrogen virkende stoffer. VTG genekspresjonen gav ikke noe entydig svar om mulig forurensning av østrogen virkende stoffer ved stasjonene som ble undersøkt.

5.7. GR

Det ble ikke funnet noen signifikante forskjeller i genekspresjon av GR mellom stasjonene eller kjønn. Oksidativt stress kan være et tegn på eksponering for forurensning (Hansen et al. 2007). GR er viktig i forsvaret mot oksidativt stress ved å omdanne oksidert glutatation til redusert glutatation (Matés 2000) Metallforurensning har vist seg å inducere GR (Hansen et al. 2007; Hansen et al. 2007). Resultatene for induksjon av GR stemmer ikke overens med resultatene som ble funnet for induksjonen av MT. En mulighet kan være at hysen har utviklet adaptasjon mot oksidativt stress (Hansen et al. 2007; Arzuaga et al. 2010). Det kan også være at det ikke er noe forskjell i oksidativt stress mellom stasjonene

5.8. Er hyse i nordøstre del av Atlanteren eksponert for forurensning?

I havområde undersøkt finnes det komplekse blandinger av stoffer som har forskjellige effekter på biomarkører undersøkt i denne oppgaven, slik at effekter vanskeligere kan bli oppdaget (Thomas et al. 2004a; Sturve et al. 2006; Lie et al. 2009b). Det var like vel forskjeller mellom hysene fra de forskjellige stasjonene for parameterne undersøkt.

Det var forskjell i de fysiologiske faktorene hos innsamlet i ulike områder i Nordsjøen og ved Island. Forskjellene i LSI og kondisjonsfaktoren var mulig påvirket av forurensning som øker LSI og minker kondisjonsfaktoren (Heintz et al. 2000; Aas et al. 2001; van der Oost et al. 2003; Holth et al. 2008). GSI resultatene kunne tyde på hysen ved Egersundbanken var mindre eksponert av forurensning men på grunn av når på året fiskene ble fanget så spiller GSI en mindre rolle.

Det var forskjell genekspresjon hos hyse innsamlet i ulike områder i Nordsjøen og ved Island. For cytokrom P450 familien undersøkt i denne studien så skilte Island 1 og Firth of Forth seg ut. Island 1 hadde signifikant lavere ekspresjon av både CYP1A og CYP3 enn Firth of Forth. Dette kan tyde på en lavere eksponering av plane hydrokarboner og klorerte organiske forbindelser ved Island 1, mens en høyere forurensning av de samme stoffene ved Firth of Forth (Sarasquete et al. 2000; Tseng et al. 2005; Blum et al. 2008). For CYP1A mengden hos hyse var det ingen var det ingen forskjeller mellom Nordsjøen eller stasjonene rundt Island.

De to genene som kan indikerer metalleksponering og tegn på oksidativt stress gav tvetydige signaler. Hannene fra Firth of Forth og Egersundbanken hadde signifikant høyere induksjon av MT enn hannene fra Island 1. Det kan tyde på en høyere metall forurensning og et høyere oksidativt stress for hyse ved Egersundbanken og Firth of Forth (Chesman et al. 2007; Søfteland et al. 2010). Høyere MT induksjon sammenlignet med referansestasjon er blitt funnet tidligere i Nordsjøen i nærheten av oljeplattform (Chesman et al. 2006; Chesman et al. 2007) Men resultatene for GR ekspresjon viste ikke noe forskjell mellom noen av stasjonene. Denne mangelen på ekspresjon av GR kan være på grunn av ekspresjonen av MT. Metalloioner kan binde metaller som forårsaker oksidativt stress (Chesman et al. 2006) slik at glutation nivåene ikke blir påvirket og glutation reductase ikke blir induisert.

For VTG var resultatene vanskeligere å tolke. Det var kjønnsforskjeller som forventet, men ikke mellom alle gruppene. At det ikke var signifikant forskjeller mellom hunnene og hannene for VTG A og bare signifikant forskjeller mellom hunnene fra FF og hannene fra Firth of Forth, Island 1 og Island 2 er sannsynligvis på grunn av at hunnfiskene ikke har startet vitellogenese. Men det kan muligens også være et tegn på at hysene ved alle stasjonene var eksponert for stoffer som påvirker kjønnsmodningen hos begge kjønn. (Jobling et al. 1996; Hylland et al. 1997; Meier et al. 2007; Lie et al. 2009b)

Funnene i denne studien tyder på at fisk fra Firth of Forth og Egersundbanken er mer forurenset enn de to stasjonene fra Island. At Egersundbanken muligens er forurenset er overraskende siden dette området er blitt brukt som referanseområde i økotoksikologiske studier (Westerlund et al. 1998). Men farvannene rundt Island er det havområdet der det er målt de laveste nivåene PAH'er og PCB og for nivåene av stoffer som er bekymringverdige så har farvannene rundt Island mer akseptable nivåer enn Nordsjøen (OSPAR 2010).

En annen forklaring på resultatene funnet i denne studien kan være type eksponering hysene er utsatt for. Det har vist seg at noen arter responderer forskjellig på kronisk forurensning mot pulsforurensning (Tong et al. 2004; Holth et al. 2009). Det har blitt påstått at hyse vandrer over store områder (Pethon 1998), som gjør at forurensningseksponeringen kan variere. Vandring hos vill fisk har blitt foreslått som en forklaring for manglende induksjon av CYP1A hos sild (*Clupea harengus*) og sei (*Pollachius virens*) (McIntosh et al. 2006).

5.9 Konklusjoner

Gen ekspresjon med bruk av qPCR kan gi et mer helhetlig bilde over eksponering av vill fisk. Hysene kan brukes som art ved bruk av denne metoden, selv om genomet til hysene er lite undersøkt. På grunn av det nære slektskapet kan gener fra torsk brukes til å lage primer. RNA kan bli brutt ned hvis en ikke er nøye med lagring, slik at resultatene kan bli mindre pålitelige. For hvert forsøk bør en undersøke flere potensielle referansegener slik at normaliseringen ikke påvirker resultatet.

I denne studien var det signifikant forskjeller i fysiologiske faktorer for hysene fra de forskjellige stasjonene. Hysene fra Egersundbanken skilte seg fra de andre stasjonene. En forklaring på dette kan være at Egersundbanken er mer forurenset enn de andre stasjonene. Det var også signifikant forskjeller i genekspresjon mellom hysene fra de forskjellige stasjonene. Ut i fra genekspresjonen til de forskjellige genene tydet det på at hysene fra Egersundbanken og Firth of Forth var eksponert for mer forurensning enn de to andre stasjonene ved Island, mens det kunne tyde på at fiskene ved Island 1 var mindre eksponert for forurensning enn fiskene ved de andre stasjonene. Det var ingen forskjell mellom stasjonene i CYP1A protein mengden. En forklaring på dette kan være vandring mellom områder med forskjell forurensningsbelastning.

Resultatene i denne studien viser en at Nordsjøen, selv ved områder uten offshore virksomhet kan være mer forurenset enn farvannene rundt Island.

6. Referanser

- Aas, E., et al. (2001). "Evidence of uptake, biotransformation and DNA binding of polyaromatic hydrocarbons in Atlantic cod and corkwing wrasse caught in the vicinity of an aluminium works." Marine Environmental Research **52**(3): 213-229.
- Albert, O. T. (1995). "Diel changes in food and feeding of small gadoids on a costal bank." ICES Journal of Marine Science **52**(5): 873-885.
- Allen, Y., et al. (1999). "Survey of estrogenic activity in United Kingdom estuarine and coastal waters and its effects on gonadal development of the flounder *Platichthys flesus*." Environmental Toxicology and Chemistry **18**(8): 1791-1800.
- Andersson, T. (1992). "Purification, characterization and regulation of a male-specific cytochrome P450 in the rainbow trout kidney." Marine Environmental Research **34**(1-4): 109-112.
- Anwar-Mohamed, A., et al. (2009). "Regulation of CYP1A1 by heavy metals and consequences for drug metabolism." Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology **5**(5): 501-521.
- Arinc, E., et al. (2001). "Induced CYP1A mRNA, protein and catalytic activity in the liver of feral fish, leaping mullet, *Liza saliens*." Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology **128**(2): 281-290.
- Arukwe, A. (2006). "Toxicological housekeeping genes: Do they really keep the house?" Environmental Science & Technology **40**(24): 7944-7949.
- Arukwe, A., et al. (2000). "Effects of xenoestrogen treatment on zona radiata protein and vitellogenin expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*)." Aquatic Toxicology **49**(3): 159-170.
- Arukwe, A., et al. (1997). "Xenobiotic and steroid biotransformation enzymes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) liver treated with an estrogenic compound, 4-nonylphenol." Environmental Toxicology and Chemistry **16**(12): 2576-2583.
- Arzuaga, X., et al. (2010). "mPolluted-site Killifish (*Fundulus heteroclitus*) embryos are resistant to organic pollutant-mediated induction of CYP1A activity, reactive oxygen species, and heart deformities." Environmental Toxicology and Chemistry **29**(3): 676-682.
- Balaam, J. L., et al. (2009). "Identification of nonregulated pollutants in North-sea-produced water discharges." Environmental Toxicology and Chemistry **28**(6): 1159-1167.
- Balls, P. W., et al. (1997). "Trace metal in Scottish estuarine and coastal sediments." Marine Pollution Bulletin **34**(1): 42-50.
- Bateman, K. S., et al. (2004). "A ranking system for the evaluation of intersex condition in european flounder (*Platichthys flesus*)." Environmental Toxicology and Chemistry **23**(12): 2831-2836.
- Bayne, B. L., et al. (1985). The effects of stress and pollution on animals. New York, Praeger publisher.
- Beyer, J., et al. (1996). "Contaminant accumulation and biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus* L) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L) exposed by caging to polluted sediments in Sorfjorden, Norway." Aquatic Toxicology **36**(1-2): 75-98.
- Bilbao, E., et al. (2006b). Cell- and tissue-level biomarkers of pollution in wild pelagic fish, herring (*Clupea harengus*), and saithe (*Pollachius virens*) from the North Sea, SETAC PRESS.
- BLAST. "<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>."
- Blum, J. L., et al. (2008). "Effects of the pesticide methoxychlor on gene expression in the liver and testes of the male largemouth bass (*Micropterus salmoides*)." Aquatic Toxicology **86**(4): 459-469.
- Boitsov, S., et al. (2007). "Identification of estrogen-like alkylphenols in produced water from offshore oil installations (vol 64, pg 651, 2007)." Marine Environmental Research **66**(2): 310-310.

- Bromley, P. J., et al. (1997). "Diel feeding patterns and the development of food webs in pelagic 0-group cod (*Gadus morhua* L.), haddock (*Melanogrammus aeglefinus* L.), whiting (*Merlangius merlangus* L.), saithe (*Pollachius virens* L.), and Norway pout (*Trisopterus esmarkii* Nilsson) in the northern North Sea." ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil **54**(5): 846-853.
- Bustin, S. A., et al. (2009). "The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments." Clinical Chemistry **55**(4): 611-622.
- Bustin, S. A., et al. (2004). "Pitfalls of Quantitative Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction." Journal of Biomolecular Techniques **15**: 155-166.
- Cai, L., et al. (2003). "Zinc-metallothionein protects from DNA damage induced by radiation better than glutathione and copper- or cadmium-metallothioneins." Toxicology Letters **136**(3): 193-198.
- Cathala, G., et al. (1983). "Laboratory Methods. A Method for Isolation of Intact Translationally Active Ribonucleic Acid. ." DNA **2**(4): 329-335.
- Celander, M., et al. (1995). "Decreased responsiveness of the hepatic Cytochrome-P450 1A1 system in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after prolonged exposure to PCB." Aquatic Toxicology **33**(2): 141-153.
- Chapman, P. M., et al. (2003). "Missing and needed: polar marine ecotoxicology." Marine Pollution Bulletin **46**(8): 927-928.
- Chesman, B. S., et al. (2006). Hepatic Metallothionein in Pelagic Herring. Belgium, SETAC PRESS.
- Chesman, B. S., et al. (2007). "Hepatic metallothionein and total oxyradical scavenging capacity in Atlantic cod *Gadus morhua* caged in open sea contamination gradients." Aquatic Toxicology **84**(3): 310-320.
- Chomczynski, P., et al. (1995). "Modification of the TRI Reagent. procedure for isolation of RNA from polysaccharide- and proteoglycan-rich sources." BioTechniques **19**: 924-945.
- Chomczynski, P., et al. (1987). "Single-step method of RNA isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction." Analytical Biochemistry **162**: 156-159.
- Clustalw. "<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>."
- Corripio-Miyar, Y., et al. (2007). "RAG-1 and IgM genes, markers for early development of the immune system in the gadoid haddock, *Melanogrammus aeglefinus*, L." Fish & Shellfish Immunology **23**(1): 71-85.
- Corripio-Miyar, Y., et al. (2007). "Cloning and expression analysis of two pro-inflammatory cytokines, IL-1[β] and IL-8, in haddock (*Melanogrammus aeglefinus*)." Molecular Immunology **44**(6): 1361-1373.
- Courtenay, S., et al. (1994). "Assesment of within-group variation in CYP1A messenger-RNA inducibility in environmentally exposed and chemically treated Tomcod." Environmental Health Perspectives **102**: 85-90.
- Courtenay, S. C., et al. (1999). "A comparison of the dose and time response of CYP1A1 mRNA induction in chemically treated Atlantic tomcod from two populations." Aquatic Toxicology **47**(1): 43-69.
- de la Torre, F. R., et al. (2007). "Assessment of the pollution impact on biomarkers of effect of a freshwater fish." Chemosphere **68**(8): 1582-1590.
- Denslow, N. D., et al. (2007). "Fish 'n' chips: the use of microarrays for aquatic toxicology." Mol. Biosyst. **3**(3): 6.
- Denslow, N. D., et al. (2001). "Multiple responses in gene expression in fish treated with estrogen." Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology **129**(2-3): 277-282.
- Dethlefsen, V., et al. (2001). "Influence of solar ultraviolet-B on pelagic fish embryos: osmolality, mortality and viable hatch." Helgoland Marine Research **55**(1): 45-55.

- Dethlefsen, V., et al. (1996). "Malformations in the North Sea pelagic fish embryos during the period 1984-1995." ICES Journal of Marine Science **53**: 1024-1035.
- Digiulio, R. T., et al. (1989). "Biochemical Responses in aquatic animals- a review of determinants of oxidative stress." Environmental Toxicology and Chemistry **8**(12): 1103-1123.
- Dignam, J. D. (1990). [15] Preparation of extracts from higher eukaryotes. Methods in Enzymology. P. D. Murray, Academic Press. **Volume 182**: 194-203.
- Dizdaroglu, M., et al. (2002). "Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement." Free Radical Biology and Medicine **32**(11): 1102-1115.
- Ducrotoy, J. P., et al. (2000). "The North Sea." Marine Pollution Bulletin **41**(1-6): 5-23.
- Eggens, M. L., et al. (1996). "Temporal variation of CYP1A indices, PCB and 1-OH pyrene concentration in flounder, *Platichthys flesus*, from the Dutch Wadden Sea." Chemosphere **33**(8): 1579-1596.
- Elliott, M., et al. (1987). "Contamination and effects of hydrocarbons on the North Sea ecosystem, Scotland." Proceedings of the Royal Society of Edinburgh Section B-Biological Sciences **93**: 327-342.
- Elskus, A. A. (2004). "Estradiol and estrone suppress CYP1A expression in rainbow trout primary hepatocytes." Marine Environmental Research **58**(2-5): 463-467.
- Ericson, G., et al. (2000). "DNA adduct formation in northern pike (*Esox lucius*) exposed to a mixture of benzo[a]pyrene, benzo[k]fluoranthene and 7H-dibenzo[c,g]carbazole: time-course and dose-response studies." Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **454**(1-2): 11-20.
- Everaarts, J. M., et al. (1993). "BIOLOGICAL MARKERS IN FISH - DNA INTEGRITY, HEMATOLOGICAL PARAMETERS AND LIVER SOMATIC INDEX." Marine Environmental Research **35**(1-2): 101-107.
- Ferreira, F., et al. (2009). "Vitellogenin gene expression in the intertidal blenny *Lipophrys pholis*: A new sentinel species for estrogenic chemical pollution monitoring in the European Atlantic coast?" Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology **149**(1): 58-64.
- Filina, E. A., et al. (2009). "The Reproductive Biology of Haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) at the Rockall Bank." Journal of Northwest Atlantic Fishery Science **40**: 59-73.
- Finne, E. F., et al. (2007). "Toxicogenomic responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes exposed to model chemicals and a synthetic mixture." Aquatic Toxicology **81**(3): 293-303.
- Fisher, M. A., et al. (2006). "Induction of CYP1A mRNA in carp (*Cyprinus carpio*) from the Kalamazoo River polychlorinated biphenyl-contaminated superfund site and in a laboratory study." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **50**(1): 14-22.
- Fleige, S., et al. (2006). "Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR." Biotechnology Letters **28**(19): 1601-1613.
- Forlin, L., et al. (2006). "Hepatic cytochrome P4501A concentration and activity in Atlantic cod caged in two North Sea pollution gradients." Biological effects of contaminants in marine pelagic ecosystems: 253-261.
- Funkenstein, B., et al. (2004). "Application of real-time PCR for quantitative determination of hepatic vitellogenin transcript levels in the striped sea bream, *Lithognathus mormyrus*." Marine Environmental Research **58**(2-5): 659-663.
- Fåhræus-Van Ree, G. E., et al. (2003). "Structure of and energy reserves in the liver of wild and cultured yellowtail flounder, *Limanda ferruginea*." Marine Biology **143**(2): 257-265.
- Geffard, O., et al. (2001). "Assessment of sediment contamination by spermatoxicity and embryotoxicity bioassays with sea urchins (*Paracentrotus lividus*) and oysters (*Crassostrea gigas*)." Environmental Toxicology and Chemistry **20**(7): 1605-1611.

- Geoghegan, F., et al. (2008). "A cDNA microarray for the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L., and analysis of the interactive effects of oestradiol and dibenzanthracene exposures." Journal of Fish Biology **72**(9): 2133-2153.
- George, S., et al. (2004). "A comparison of pollutant biomarker responses with transcriptional responses in European flounders (*Platichthys flesus*) subjected to estuarine pollution." Marine Environmental Research **58**(2-5): 571-575.
- Goksøyr, A. (1991). "A semi-quantitative cytochrome P450IA1 ELISA: A simple method for studying the monooxygenase induction response in environmental monitoring and ecotoxicological testing of fish." Science of The Total Environment **101**(3): 255-262.
- Goksøyr, A., et al. (1992). "The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring." Aquatic Toxicology **22**(4): 287-311.
- Goldstein, B., et al. (1987). "Committee on biological Markers of the national research council." Biological Markers in environmental health research. Environmental Health perspective **74**(3-9).
- Gozgit, J. M., et al. (2004). "Differential action of polycyclic aromatic hydrocarbons on endogenous estrogen-responsive genes and on a transfected estrogen-responsive reporter in MCF-7 cells." Toxicology and Applied Pharmacology **196**(1): 58-67.
- Green, N., et al. (2003). Hazardous substances in the marin environment : trends in metal and persistent organic pollutants. . EEA topic report 2: 6-8.
- Greytak, S. R., et al. (2010). "Estrogen responses in killifish (*Fundulus heteroclitus*) from polluted and unpolluted environments are site- and gene-specific." Aquatic Toxicology (Amsterdam) **99**(2).
- Haasch, M. L., et al. (1993). "Caged and wild fish: Induction of hepatic cytochrome P-450 (CYP1A1) as an environmental biomonitor." Environmental Toxicology and Chemistry **12**(5): 885-895.
- Hansen, B. H., et al. (2007). "Gill metal binding and stress gene transcription in brown trout (*Salmo trutta*) exposed to metal environments: The effect of pre-exposure in natural populations." Environmental Toxicology and Chemistry **26**(5): 944-953.
- Hansen, B. H., et al. (2006). "Antioxidative stress proteins and their gene expression in brown trout (*Salmo trutta*) from three rivers with different heavy metal levels." Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology **143**(3): 263-274.
- Hansen, B. H., et al. (2007). "Induction and activity of oxidative stress-related proteins during waterborne Cd/Zn-exposure in brown trout (*Salmo trutta*)." Chemosphere **67**(11): 2241-2249.
- Hansson, T., et al. (2006). "Long-term monitoring of the health status of female perch (*Perca fluviatilis*) in the Baltic Sea shows decreased gonad weight and increased hepatic EROD activity." Aquatic Toxicology **79**(4): 341-355.
- Harman, C., et al. (2009). "Monitoring the freely dissolved concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) and alkylphenols(AP) around a Norwegian oil platform bu holistic passive sampling " Marine Pollution Bulletin **58**: 1671-1679.
- Hasselberg, L., et al. (2004a). "Effects of alkylphenols on redox status in first spawning Atlantic cod (*Gadus morhua*)." Aquatic Toxicology **69**(1): 95-105.
- Hasselberg, L., et al. (2004b). "Effects of alkylphenols on CYP1A and CYP3A expression in first spawning Atlantic cod (*Gadus morhua*)." Aquatic Toxicology **67**(4): 303-313.
- Heath, et al. (1998). "Bio-physical modelling of the early life stages of haddock, *Melanogrammus aeglefinus*, in the North Sea." Fisheries Oceanography **7**(2): 110-125.
- Hedger, R., et al. (2004). "Analysis of the spatial distributions of mature cod (*Gadus morhua*) and haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) abundance in the North Sea (1980-1999) using generalised additive models." Fisheries Research **70**(1): 17-25.
- Heintz, R. A., et al. (2000). "Delayed effects on growth and marine survival of pink salmon *Oncorhynchus gorbuscha* after exposure to crude oil during embryonic development." Marine Ecology-Progress Series **208**: 205-216.

- Holladay, S. D., et al. (1998). "Benzo[a]pyrene-induced hypocellularity of the pronephros in tilapia (*Oreochromis niloticus*) is accompanied by alterations in stromal and parenchymal cells and by enhanced immune cell apoptosis." *Veterinary Immunology and Immunopathology* **64**(1): 69-82.
- Holt, T. F., et al. (2010). "Longterm exposure of Atlantic Cod(*Gadus morhua*) to components of produced water:condition, gonad maturation and gene expression. ." *Candian Journal of fisheries and aquatic sciences* **67**: 1685-1698.
- Holth, T. F., et al. (2009). "Genotoxicity of Environmentally Relevant Concentrations of Water-Soluble Oil Components in Cod (*Gadus morhua*)." *Environmental Science & Technology* **43**(9): 3329-3334.
- Holth, T. F., et al. (2008). "Differential gene expression and biomarkers in zebrafish (*Danio rerio*) following exposure to produced water components." *Aquatic Toxicology* **90**(4): 277-291.
- Hylland, K., et al. (2006a). Biological effects of contaminants in pelagic ecosystems: the BECPELAG workshop; 3-8, SETAC PRESS.
- Hylland, K., et al. (2006b). "May organic pollutants affect fish populations in the North Sea?" *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A* **69**(1-2): 125-138.
- Hylland, K., et al. (1997). "Effects of environmental oestrogens on marine fish species." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **16**(10): 606-612.
- Hylland, K., et al. (1992). "Hepatic metallothionein and heavy metals in Dab *Limanda limanda* from the German bight." *Marine Ecology-Progress Series* **91**(1-3): 89-96.
- Hylland, K., et al. (2010). "Integrated marine contaminant in the North Sea (ICON): a framework for integrated chemical and biological monitoring." 2010 ICES Annual Science Conference.
- Hylland, K., et al. (2008). "Water column monitoring near oil installations in the North Sea 2001-2004." *Marine Pollution Bulletin* **56**(3): 414-429.
- ICES "ICES-Fishmap.Haddock."
- Illuminati, S., et al. (2010). "Cadmium bioaccumulation and metallothionein induction in the liver of the Antarctic teleost *Trematomus bernacchii* during an on-site short-term exposure to the metal via seawater." *Toxicological and Environmental Chemistry* **92**(3): 617-640.
- Information, N. C. f. B. f. "<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>."
- Janssen, P. A. H., et al. (1995). "The annual ovarian cycle and the influence of pollution on vitellogenesis in the Flounder, *Pleuronectes flesus* " *Journal of Fish Biology* **47**(3): 509-523.
- Jentsch, S., et al. (2000). "Ubiquitin and its kin: how close are the family ties?" *Trends in Cell Biology* **10**(8): 335-342.
- Jobling, S., et al. (1996). "Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals." *Environmental Toxicology and Chemistry* **15**(2): 194-202.
- Johansen, S. D., et al. (2009). "Large-scale sequence analyses of Atlantic cod." *New Biotechnology* **25**(5): 263-271.
- Jörundsdóttir, K., et al. (2005). "Imposex levels in the dogwhelk *Nucella lapillus* (L.)--continuing improvement at high latitudes." *Marine Pollution Bulletin* **51**(8-12): 744-749.
- Kammann, U., et al. (2008). "Biological effect monitoring in dab (*Limanda limanda*) using gene transcript of CYP1A1 or EROD-a comparison." *Environmental Science and Pollution Research* **15**(7): 600-605.
- Kawabata, T., et al. (1989). "Protective effects of glutathione against lipid peroxidation in chronically iron-loaded mice." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **1004**(1): 89-94.
- Kessabi, K., et al. (2010). "Evaluation of environmental impact on natural populations of the Mediterranean killifish *Aphanius fasciatus* by quantitative RNA biomarkers." *Marine Environmental Research* **70**(3-4): 327-333.

- Khan, R. A. (2010). "Two Species of Commercial Flatfish, Winter Flounder, *Pleuronectes americanus*, and American Plaice, *Hippoglossoides platessoides*, as Sentinels of Environmental Pollution." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **85**(2): 205-208.
- Kirby, M. F., et al. (1999). "Hepatic EROD activity in flounder (*Platichthys flesus*) as an indicator of contaminant exposure in English estuaries." Marine Pollution Bulletin **38**(8): 676-686.
- Kloepper-Sams, P., et al. (1994). "Turnover of hepatic microsomal cytochrome P4501A protein and heme in beta-naphthoflavone-induced *Fundulus heteroclitus*." Molecular Marine Biology and Biotechnology **3**(3): 171-183.
- Knapen, D., et al. (2007). "Metallothionein gene and protein expression as a biomarker for metal pollution in natural gudgeon populations." Aquatic Toxicology **82**(3): 163-172.
- Kopecka, J., et al. (2008). "Temporal and spatial variations of selected biomarker activities in flounder (*Platichthys flesus*) collected in the Baltic proper." Ecotoxicology and Environmental Safety **70**(3): 379-391.
- Lam, P. K. S., et al. (2003). "The use of biomarkers in environmental monitoring programmes." Marine Pollution Bulletin **46**(2): 182-186.
- Lang, T. (2006). "Studies in Field-Collected Organisms During the BECPELAG workshop: Introduction and Summary " Biological Effects of Contaminants in Marine Pelagic Ecosystems 85-93.
- Laurie, A. D. (2004). "Quantitation of metallothionein mRNA from the New Zealand common bully (*Gobiomorphus cotidianus*) and its implications for biomonitoring." New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research **38**(5): 869-877.
- Lawrence, A., et al. (2003). Effects of pollution on fish. Molecular Effects and population Responses. Hong Kong, Blackwell Science.
- Leamon, J. H., et al. (2000). "Variation Among Four Health Indices in Natural Populations of the Estuarine Fish, *Fundulus heteroclitus* (Pisces, Cyprinodontidae), from Five Geographically Proximate Estuaries." Environmental Biology of Fishes **57**(4): 451-458.
- Leung, K. M. Y., et al. (2005). "Metallothioneins and trace metals in the dogwhelk *Nucella lapillus* (L.) collected from Icelandic coasts." Marine Pollution Bulletin **51**(8-12): 729-737.
- Lewis, N. A., et al. (2006). "Functional analysis of a metal response element in the regulatory region of flounder cytochrome P450 1A and implications for environmental monitoring of pollutants." Toxicological Sciences **92**(2): 387-393.
- Lie, K. K., et al. (2009). "Gene expression profiling in atlantic cod (*Gadus Morhua* L.) from two contaminated sites using a custom-made cDNA microarray." Environmental Toxicology and Chemistry **28**(8): 1711-1721.
- Lie, K. K., et al. (2009a). "Gene expression profiling in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) from two contaminated sites using a custom-made cDNA microarray." Environmental Toxicology and Chemistry **28**(8): 1711-1721.
- Lie, K. K., et al. (2009b). "Effects of environmental relevant doses of pollutants from offshore oil production on Atlantic cod (*Gadus morhua*)." Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology **150**(2): 141-149.
- Lowry, O. H., et al. (1951). "Protein measurement with the Folin Phenol reagent." Journal of Biological Chemistry **193**: 265-275.
- Luckas, B., et al. (1990). "Characteristic chlorinated hydrocarbon patterns in the blubber of seals from different marine regions." Chemosphere **21**(1-2): 13-19.
- Maines, M. D. (1988). "Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanism , and clinical applications." The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology **2**: 2557-2568.
- Malins, D. C., et al. (2006). "Biomarkers signal contaminant effects on the organs of English sole (*Parophrys vetulus*) from Puget Sound." Environmental Health Perspectives **114**(6): 823-829.

- Maronpot, R. R., et al. (2010). "Hepatic Enzyme Induction: Histopathology." Toxicologic Pathology **38**: 776-795.
- Matés, J. M. (2000). "Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology." Toxicology **153**(1-3): 83-104.
- McClain, J. S., et al. (2003). "Laboratory and field validation of multiple molecular biomarkers of contaminant exposure in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." Environmental Toxicology and Chemistry **22**(2): 361-370.
- McIntosh, A. D., et al. (2006). Assessment of hepatic 7-Ethoxyresorufin O-deethylase activity and CYP1A concentration in herring (*Clupea harengus*) and Saithe (*Pollachius virens*) from two areas of the North Sea. Biological effects of contaminants in marine pelagic ecosystems. K. Hylland, T. Lang and D. Vethaak, SETAC PRESS: 93-101.
- McKee, M. J., et al. (1983). "Effects of naphthalene on Benzo(a)pyrene hydroxylase and cytochrome P-450 in *Fundulus heteroclitus*." Aquatic Toxicology **3**(2): 103-114.
- Meier, S., et al. (2007). "Effects of alkylphenols on the reproductive system of Atlantic cod (*Gadus morhua*)." Aquatic Toxicology **81**(2): 207-218.
- Meier, S., et al. (2007). "Effects of alkylphenols on the reproductive system of Atlantic cod (*Gadus morhua*)." Aquatic Toxicology **81**(2): 207-218.
- Meyer, J. N., et al. (2005). "Differential display of hepatic mRNA from killifish (*Fundulus heteroclitus*) inhabiting a Superfund estuary." Aquatic Toxicology **73**(4): 327-341.
- Meyer, J. N., et al. (2003). "Expression and inducibility of arylhydrocarbon receptor pathway genes in wild-caught Killifish (*Fundulus heteroclitus*) with different contaminant-exposure histories." Environmental Toxicology and Chemistry **22**(10): 2337-2343.
- Minghetti, M., et al. (2008). "Copper transporter 1, metallothionein and glutathione reductase genes are differentially expressed in tissues of sea bream (*Sparus aurata*) after exposure to dietary or waterborne copper." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology **147**(4): 450-459.
- Monteiro, P. R. R., et al. (2000a). "Plasma steroid levels in female flounder (*Platichthys flesus*) after chronic dietary exposure to single polycyclic aromatic hydrocarbons." Marine Environmental Research **49**(5): 453-467.
- Monteiro, R., et al. (2000b). "Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit in vitro ovarian steroidogenesis in the flounder (*Platichthys flesus* L.)." Aquatic Toxicology **48**(4): 549-559.
- Moore, M. N. (2002). "Biocomplexity: the post-genome challenge in ecotoxicology." Aquatic Toxicology **59**(1-2): 1-15.
- Moore, M. N., et al. (2004). "An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management." Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **552**(1-2): 247-268.
- Mortensen, A. S., et al. (2006). "The persistent DDT metabolite, 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene, alters thyroid hormone-dependent genes, hepatic cytochrome P4503A, and pregnane x receptor gene expressions in atlantic salmon (*Salmo salar*) parr." Environmental Toxicology and Chemistry **25**(6): 1607-1615.
- Mortensen, A. S., et al. (2007). "Effects of 17 alpha-ethynylestradiol on hormonal responses and xenobiotic biotransformation system of Atlantic salmon (*Salmo salar*)." Aquatic Toxicology **85**(2): 113-123.
- Myers, M. S., et al. (1990). "Overview of studies on liver carcinogenesis in English sole from Puget Sound; evidence for a xenobiotic chemical etiology I: Pathology and epizootiology." Science of The Total Environment **94**(1-2): 33-50.
- Myers, M. S., et al. (1994). "Relationship between Toxicopathic Lesions and exposure to chemical contaminants in English Sole (*Pleuronectes vetulus*), Starry flounder (*Platichthys stellatus*), and White Croaker (*Genyonemus lineatus*) from Selected Marine sites on the Pacific Coast, USA. ." Environmental Health perspective. **102**: 200-215.

- Navas, J. M., et al. (2000). "Antiestrogenicity of beta-naphthoflavone and PAHs in cultured rainbow trout hepatocytes: evidence for a role of the arylhydrocarbon receptor." Aquatic Toxicology **51**(1): 79-92.
- Navas, J. M., et al. (2001). "Estrogen-mediated suppression of cytochrome P4501A (CYP1A) expression in rainbow trout hepatocytes: role of estrogen receptor." Chemico-Biological Interactions **138**(3): 285-298.
- NCBI. "<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>."
- Nimrod, A. C., et al. (1996). "Estrogenic responses to xenobiotics in channel catfish (*Ictalurus punctatus*)." Marine Environmental Research **42**(1-4): 155-160.
- O-Charoen, S. (2008). Microarray Gene Expression Data Quality Assessment - an overview. Ann Arbor MI, USA, Torrey Path: 24.
- Olsen, E., et al. (2010). "Cod, haddock, saithe, herring and capelin in the Barents Sea and adjacent waters: a review of the biological value of the area." ICES Journal of Marine Science **67**(1): 87-101.
- Olsson, P. E., et al. (1989). "A role of metallothionein in zinc regulation after oestradiol induction of vitellogenin synthesis in rainbow trout, *Salmo gairdneri*." Biochem. J. **257**(2): 555-559.
- Olsvik, P. A., et al. (2009a). "Are Atlantic Cod in Store Lungegrdsvann, a Seawater Recipient in Bergen, Affected by Environmental Contaminants? A qRT-PCR Survey." Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues **72**(3-4): 140-154.
- Olsvik, P. A., et al. (2009b). "Transcriptional effects of nonylphenol, bisphenol A and PBDE-47 in liver of juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*)." Chemosphere **75**(3): 360-367.
- Olsvik, P. A., et al. (2008). "Selection of reference genes for qRT-PCR examination of wild populations of Atlantic cod *Gadus morhua*." BMC research notes **1**: 47.
- OSPAR (2000). Chapter 2: Geography, hydrography and climate. London, OSPAR commision.
- OSPAR (2010). 7 Hazardous substances. London, OSPAR commision.
- Peakall, D. B., et al. (1994). "The role of biomarkers in environmental assessment (3). Vertebrates." Ecotoxicology **3**(3): 173-179.
- Perez-Casanova, J. C., et al. (2004). "Bile salt-activated lipase expression during larval development in the haddock (*Melanogrammus aeglefinus*)." Aquaculture **235**(1-4): 601-617.
- Perez-Casanova, J. C., et al. (2006). "Development of the digestive capacity in larvae of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*)." Aquaculture **251**(2-4): 377-401.
- Pethon, P., Ed. (1998). Aschehougs store fiskebok. Norges fisker i farger. Stockholm, H. Aschehoug & CO (W. Nygaard) A/S
- Pina, B., et al. (2007). "Analysis of gene expression as a new tool in ecotoxicology and environmental monitoring." Trac-Trends in Analytical Chemistry **26**(11): 1145-1154.
- Ploch, S. A., et al. (1997). "Comparative time-course of benzo[a]pyrene-DNA adduct formation, and its relationship to CYP1A activity in two species of catfish." Marine Environmental Research **46**(1-5): 345-349.
- Primer3. "<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>."
- Quiros, L., et al. (2007a). "Physiological response to persistent organic pollutants in fish from mountain lakes: Analysis of Cyp1A gene expression in natural populations of *Salmo trutta*." Environmental Science & Technology **41**(14): 5154-5160.
- Quiros, L., et al. (2007b). "Environmental monitoring by gene expression biomarkers in *Barbus graellsii*: Laboratory and field studies." Chemosphere **67**(6): 1144-1154.
- Reith, M., et al. (2001). "Lipovitellins derived from two forms of vitellogenin are differentially processed during oocyte maturation in haddock (*Melanogrammus aeglefinus*)." Journal of Experimental Zoology **291**(1): 58-67.

- Rhodes, S., et al. (2005). "The effects of dimethylated and alkylated polycyclic aromatic hydrocarbons on the embryonic development of the Japanese medaka." Ecotoxicology and Environmental Safety **60**(3): 247-258.
- Risso-de Faverney, C., et al. (2000). "Effects of heavy metals and 3-methylcholanthrene on expression and induction of CYP1A1 and metallothionein levels in trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocyte cultures." Environmental Toxicology and Chemistry **19**(9): 2239-2248.
- Risso-de Faverney, C., et al. (2000). "The nitroxide stable radical tempo prevents metal-induced inhibition of CYP1A1 expression and induction." Toxicology Letters **111**(3): 219-227.
- Roling, J. A., et al. (2004). "Differential gene expression in mummichogs (*Fundulus heteroclitus*) following treatment with pyrene: comparison to a creosote contaminated site." Marine Environmental Research **57**(5): 377-395.
- Romeo, M., et al. (1997). "Metallothionein determination in the liver of the sea bass *Dicentrarchus labrax* treated with copper and B(a)P." Marine Environmental Research **44**(3): 275-284.
- Ruus, A., et al. (2006). Accumulation of contaminants in pelagic organisms, caged blue mussels, caged cod, and semipermeable membrane devices, SETAC PRESS.
- Saborowski, R., et al. (1996). "Annual changes in the nutritive state of North Sea dab." Journal of Fish Biology **49**(2): 173-194.
- Saborowski, R., et al. (1995). "Natural variability of hepatic cytochrome P450 1A activity in North Sea dab (*Limanda limanda*)." Zeitschrift fuer Angewandte Zoologie **81**(1): 73-83.
- Sadar, M. D., et al. (2001). "Regulation of cytochrome P450 in a primary culture of rainbow trout hepatocytes." In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal **37**(3): 180-184.
- Sarasquete, C., et al. (2000). "Cytochrome P4501A (CYP1A) in teleostean fishes. A review of immunohistochemical studies." The Science of The Total Environment **247**(2-3): 313-332.
- Sarkar, A., et al. (2006). "Molecular Biomarkers: Their significance and application in marine pollution monitoring." Ecotoxicology **15**(4): 333-340.
- Schulz-Bull, D. E., et al. (1998). "Chlorobiphenyls (PCB) and PAHs in water masses of the northern North Atlantic." Marine Chemistry **61**(1-2): 101-114.
- Schwaiger, J., et al. (1997). "The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish." Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery (Formerly Journal of Aquatic Ecosystem Health) **6**(1): 75-86.
- Scott, A. P., et al. (2006a). "Vitellogenin in the blood plasma of male cod (*Gadus morhua*): A sign of oestrogenic endocrine disruption in the open sea?" Marine Environmental Research **61**(2): 149-170.
- Scott, A. P., et al., Eds. (2006b). Assessment of oestrogen exposure in cod (*Gadus morhua*) and saithe (*Pollachius virens*) in relation to their proximity to an oilfield. Biological effects of contaminants in marine pelagic ecosystems., SETAC PRESS.
- Scott, A. P., et al. (2007). "Evidence for estrogenic endocrine disruption in an offshore flatfish, the dab (*Limanda limanda* L.)." Marine Environmental Research **64**(2): 128-148.
- Sheader, D. L., et al. (2006). "Oxidative stress response of European flounder (*Platichthys flesus*) to cadmium determined by a custom cDNA microarray." Marine Environmental Research **62**(1): 33-44.
- Silva, E., et al. (2002). "Something from "nothing" - Eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects." Environmental Science & Technology **36**(8): 1751-1756.
- Skei, B. B. (2010). "DNA damage in red blood cells of dab (*Limanda limanda*) and Haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) as a marker for chemical exposure in the North-East Atlantic." Msc.
- Sleiderink, H. M., et al. (1995a). "Influence of temperature on cytochrome-P450 1A in Dab (*Limanda limanda*) from the southern North-Sea- Results from field surveys and a laboratory study." Marine Environmental Research **39**(1-4): 67-71.

- Sleiderink, H. M., et al. (1995b). "Influence of temperature and polyaromatic contaminants on CYP1A levels in North-sea Dab (*Limansa limanda*)."
Aquatic Toxicology **32**(2-3): 189-209.
- Sleiderink, H. M., et al. (1995d). "Sensitivity of Cytochrome-P450 1A induction in Dab (*Limanda limanda*) of different age and sex as a biomarker for environmental contaminants in the southern North-sea."
Archives of Environmental Contamination and Toxicology **28**(4): 423-430.
- Slooff, W., et al. (1983). "Relative liver weights and xenobiotic-metabolizing enzymes of fish from polluted surface waters in the Netherlands."
Aquatic Toxicology **4**(1): 1-14.
- Smolders, R., et al. (2003). "Changes in cellular energy budget as a measure of whole effluent toxicity in zebrafish (*Danio rerio*)."
Environmental Toxicology and Chemistry **22**(4): 890-899.
- Snell, T. W., et al. (2003). "Gene Expression Profiling in Ecotoxicology."
Ecotoxicology **12**(6): 475-483.
- Sole, M., et al. (2002). "Seasonal variation of plasmatic and hepatic vitellogenin and EROD activity in carp, *Cyprinus carpio*, in relation to sewage treatment plants."
Aquatic Toxicology **60**(3-4): 233-248.
- Sorrentino, C., et al. (2005). "Co-exposure to metals modulates CYP1A mRNA inducibility in Atlantic tomcod *Microgadus tomcod* from two populations."
Aquatic Toxicology **75**(3): 238-252.
- Stagg, R. M., et al. (2000). "Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on expression of CYP1A in salmon (*Salmo salar*) following experimental exposure and after the Braer oil spill."
Environmental Toxicology and Chemistry **19**(11): 2797-2805.
- Stegeman, J. J., et al. (1992). "Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect."
Biomarkers: biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. Proceedings of the Eighth Pellston Workshop, Keystone, Colorado, July 23-28, 1989.: 235-335.
- Stentiford, G. D., et al. (2005). "First reported cases of intersex (ovotestis) in the flatfish species dab *Limanda limanda*: Dogger Bank, North Sea."
Marine Ecology-Progress Series **301**: 307-310.
- Stephens, S. M., et al. (2000). "Sub-Lethal Effects of Exposure of Juvenile Turbot to Oil Produced Water."
Marine Pollution Bulletin **40**(11): 928-937.
- Stephensen, E., et al. (2002). "Effects of redox cycling compounds on glutathione content and activity of glutathione-related enzymes in rainbow trout liver."
Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology **133**(3): 435-442.
- Stephensen, E., et al. (2000). "Biochemical indicators of pollution exposure in shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*), caught in four harbours on the southwest coast of Iceland."
Aquatic Toxicology **48**(4): 431-442.
- Sturve, J., et al. (2006). "Effects of North Sea oil and alkylphenols on biomarker responses in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*)."
Aquatic Toxicology **78**: S73-S78.
- Sumpter, J. P., et al. (1995). "Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment."
Environmental Health Perspectives **103**: 173-178.
- Søfteland, L., et al. (2010). "Toxicological application of primary hepatocyte cell cultures of Atlantic cod (*Gadus morhua*) -- Effects of BNF, PCDD and Cd."
Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology **151**(4): 401-411.
- Teletchea, F., et al. (2006). "Phylogeny of the Gadidae (sensu Svetovidov, 1948) based on their morphology and two mitochondrial genes."
Molecular Phylogenetics and Evolution **38**(1): 189-199.
- Thomas, K. V., et al. (2004a). "Identification of in vitro estrogen and androgen receptor agonists in North Sea offshore produced water discharges."
Environmental Toxicology and Chemistry **23**(5): 1156-1163.
- Thomas, K. V., et al. (2006). In Vitro Bioassay Testing of Produced and Surface Water extracts, SETAC PRESS.

- Thomas, K. V., et al. (2009). "Effect-Directed Identification of Naphthenic Acids As Important in Vitro Xeno-Estrogens and Anti-Androgens in North Sea Offshore Produced Water Discharges." Environmental Science & Technology **43**(21): 8066-8071.
- Timme-Laragy, A. R., et al. (2009). "Antioxidant Responses and NRF2 in Synergistic Developmental Toxicity of PAHs in Zebrafish." Toxicological Sciences **109**(2): 217-227.
- Tollefsen, K. E., et al. (2006). "Effluents from oil production activities contain chemicals that interfere with normal function of intra- and extra-cellular estrogen binding proteins." Marine Environmental Research **62**: S191-S194.
- Tom, M., et al. (2003). "Quantitative evaluation of hepatic cytochrome P4501A transcript, protein, and catalytic activity in the striped sea bream (*Lithognathus mormyrus*)." Environmental Toxicology and Chemistry **22**(9): 2088-2092.
- Tong, Y., et al. (2004). "Molecular cloning of zebrafish and medaka vitellogenin genes and comparison of their expression in response to 17 beta-estradiol." Gene **328**: 25-36.
- Tseng, H. P., et al. (2005). "Constitutive and xenobiotics-induced expression of a novel CYP3A gene from zebrafish larva." Toxicology and Applied Pharmacology **205**(3): 247-258.
- Valavanidis, A., et al. (2006). "Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants." Ecotoxicology and Environmental Safety **64**(2): 178-189.
- Van den Belt, K., et al. (2002). "Effects of ethynylestradiol on the reproductive physiology in zebrafish (*Danio rerio*): Time dependency and reversibility." Environmental Toxicology and Chemistry **21**(4): 767-775.
- van den Hurk, P., et al. (2000). "Interactive effects of cadmium and benzo a pyrene on metallothionein induction in mummichog (*Fundulus heteroclitus*)." Marine Environmental Research **50**(1-5): 83-87.
- van der Oost, R., et al. (2003). "Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review." Environmental Toxicology and Pharmacology **13**(2): 57-149.
- Vandesompele, J., et al. (2002). "Accurate normalization of real-time quantitative RT-QPCR data by geometric averaging of multiple internal control genes." Genome Biology **3**(7): RESEARCH0034.
- VanGuilder, H. D., et al. (2008). "Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis." BioTechniques **44**: 619-626
- Vega-Lopez, A., et al. (2008). "Estrogenic effects of polychlorinated biphenyls and relation to cytochrome P4501A activity in the endangered goodeid fish *Ameioblennius* splendens." Environmental Toxicology and Chemistry **27**(4): 963-969.
- Versonnen, B. J., et al. (2003). "In vitro and in vivo estrogenicity and toxicity of o-, m-, and p-dichlorobenzene." Environmental Toxicology and Chemistry **22**(2): 329-335.
- Vetter, W., et al. (1995). "Organochlorine residues in two seal species from Western Iceland." Science of The Total Environment **170**(3): 159-164.
- Villeneuve, D. L., et al. (2002). "Relative potencies of individual polycyclic aromatic hydrocarbons to induce dioxinlike and estrogenic responses in three cell lines." Environmental Toxicology **17**(2): 128-137.
- Vladimirov, S. N., et al. (1996). "Characterization of the Human Small-Ribosomal-Subunit Proteins by N-Terminal and Internal Sequencing, and Mass Spectrometry." European Journal of Biochemistry **239**(1): 144-149.
- Voelker, D., et al. (2008). "The role of cyp1a and heme oxygenase 1 gene expression for the toxicity of 3,4-dichloroaniline in zebrafish (*Danio rerio*) embryos." Aquatic Toxicology **86**(1): 112-120.
- Westerlund, S., et al. (1998). "The use of bile in fish in a screening method for trace metal exposure." Marine Environmental Research **46**(1-5): 601-604.

- Whyte, J. J., et al. (2000). "Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) Activity in Fish as a Biomarker of Chemical Exposure." Critical Reviews in Toxicology **30**(4): 347-570.
- Willett, K. L., et al. (1997). "Biomarker sensitivity for polynuclear aromatic hydrocarbon contamination in two marine fish species collected in Galveston Bay, Texas." Environmental Toxicology and Chemistry **16**(7): 1472-1479.
- Willett, K. L., et al. (2001). "In vivo and in vitro inhibition of CYP1A-dependent activity in *Fundulus heteroclitus* by the polynuclear aromatic hydrocarbon fluoranthene." Toxicology and Applied Pharmacology **177**(3): 264-271.
- Williams, P. J., et al. (1998). "Annual sex steroid profiles and effects of gender and season on cytochrome P450 mRNA induction in Atlantic tomcod (*Microgadus tomcod*)." Environmental Toxicology and Chemistry **17**(8): 1582-1588.
- Williams, T. D., et al. (2003). "A DNA expression array to detect toxic stress response in European flounder (*Platichthys flesus*)." Aquatic Toxicology **65**(2): 141-157.
- Winston, G. W., et al. (1991). "Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms." Aquatic Toxicology **19**(2): 137-161.
- Wirgin, I., et al. (2004). "Resistance to contaminants in North American fish populations." Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **552**(1-2): 73-100.
- Woo, S., et al. (2009). "Effects of heavy metals on antioxidants and stress-responsive gene expression in Javanese medaka (*Oryzias javanicus*)." Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology **149**(3): 289-299.
- Wosniok, W., et al. (2000). "Analysis of ICES long-term data on diseases of North Sea dab (*Limanda limanda*) in relation to contaminants and other environmental factors." ICES CM 2000/S12.
- Wright, J., et al. (2000). "Levels of cellular glutathione and metallothionein affect the toxicity of oxidative stressors in an established carp cell line." Marine Environmental Research **50**(1-5): 503-508.
- Zapata-Perez, O., et al. (2007). "Ecotoxicological effects of POPs on ariidae *Ariopsis felis* (Linnaeus, 1766) from three coastal ecosystems in the Southern Gulf of Mexico and Yucatan Peninsula." Journal of Environmental Science and Health Part a-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering **42**(10): 1513-1520.
- Zar, J. H. (2010). Biostatistical analysis. London, Pearson.
- Ørn, S., et al. (1998). "The impact on reproduction of an orally administered mixture of selected PCBs in zebrafish (*Danio rerio*)." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **35**(1): 52-57.
- Örn, S., et al. (2003). "Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone." Aquatic Toxicology **65**(4): 397-411.

7. Vedlegg

8. Vedlegg A: Rådata hyse:

Stasjon #	Kjønn	ALDER	Lengde	vekt	levervekt	gonade vekt	LSI	GSI	Kondisjon
IS1-1	F	3	38	551	28,0	2,6	5,08	0,47	1,00
IS1-2	F	3	38	578	21,5	2,8	3,72	0,48	1,05
IS1-3	F	3	36	424	10,0	2,4	2,36	0,57	0,91
IS1-4	M	3	33	368	12,7	0,4	3,45	0,11	1,02
IS1-5	M	3	38	506	18,2	0,8	3,60	0,16	0,92
IS1-6	M	3	34	301	5,0	0,7	1,66	0,23	0,77
IS1-7	M	3	35	393	12,5	0,8	3,18	0,20	0,92
IS1-8	M	3	34	394	12,1	0,3	3,07	0,08	1,00
IS1-9	M	3	39	610	33,9	0,4	5,56	0,07	1,03
IS1-10	F	3	40	668	37,1	2,5	5,55	0,37	1,04
IS1-11	M	3	38	570	36,3	0,4	6,37	0,07	1,04
IS1-12	M	3	40	664	37,0	0,6	5,57	0,09	1,04
IS1-13	M	3	39	545	29,6	1,2	5,43	0,22	0,92
IS1-14	F	3	42	735	34,7	4,3	4,72	0,59	0,99
IS1-15	F	3	40	630	35,7	2,6	5,67	0,41	0,98
IS1-16	M	3	37	462	15,3	0,5	3,31	0,11	0,91
IS1-17	M	3	39	519	16,2	0,4	3,12	0,08	0,87
IS1-18	M	6	45	866	39,4	1,3	4,55	0,15	0,95
IS1-19	M	6	39	586	18,0	0,6	3,07	0,10	0,99
IS1-20	M	5	36	518	30,2	1,2	5,83	0,23	1,11
IS1-21	F	3	41	662	27,4	2,5	4,14	0,38	0,96
IS1-22	F	4	41	698	22,9	2,8	3,28	0,40	1,01
IS1-23	M	4	44	822	46,3	0,4	5,63	0,05	0,96
IS1-24	F	3	41	798	46,3	3,5	5,80	0,44	1,16
IS1-25	M	3	45	876	34,5	0,6	3,94	0,07	0,96
IS2-1	M	5	44	789	23,0	1,1	2,92	0,14	0,93
IS2-2	M	5	40	620	15,6	0,6	2,52	0,10	0,97
IS2-3	M	4	38	497	6,8	0,5	1,37	0,10	0,91
IS2-4	F	4	42	725	51,6	4,0	7,12	0,55	0,98
IS2-5	M	3	37	520	16,8	0,5	3,23	0,10	1,03
IS2-6	M	5	42	703	20,4	1,0	2,90	0,14	0,95
IS2-7	M	2	36	508	31,0	0,4	6,10	0,08	1,09
IS2-8	M	5	39	484	4,0	0,5	0,83	0,10	0,82
IS2-9	F	5	40	588	13,5	3,1	2,30	0,53	0,92
IS2-10	M	4	38	543	18,5	0,5	3,41	0,09	0,99
IS2-11	F	5	37	496	11,2	2,3	2,26	0,46	0,98
IS2-12	F	2	32	288	2,6	0,9	0,90	0,31	0,88
IS2-13	F	2	35	438	39,9	1,6	9,11	0,37	1,02

IS2-14	M	2	32	374	14,2	0,2	3,80	0,05	1,14
IS2-15	M	3	36	470	7,5	0,6	1,60	0,13	1,01
IS2-16	F	2	33	340	5,2	1,0	1,53	0,29	0,95
IS2-17	F	2	32	305	3,6	0,9	1,18	0,30	0,93
IS2-18	M	2	33	338	8,2	0,2	2,43	0,06	0,94
IS2-19	F	3	37	476	16,5	2,0	3,47	0,42	0,94
IS2-20	F	3	34	482	12,4	1,8	2,57	0,37	1,23
IS2-21	M	2	30	266	3,2	0,3	1,20	0,11	0,99
IS2-22	M	2	37	491	20,7	0,5	4,22	0,10	0,97
IS2-23	M	2	32	320	3,7	0,2	1,16	0,06	0,98
IS2-24	M	2	33	368	11,2	0,4	3,04	0,11	1,02
IS2-25	F	6	41	655	13,6	3,2	2,08	0,49	0,95
FF1	M	3	27	176	3,8	0,3	2,16	0,17	0,89
FF2	M	3	26	193	8,0	0,6	4,15	0,31	1,10
FF3	F	3	33	330	11,7	1,9	3,55	0,58	0,92
FF4	F	3	33	399	20,8	2,8	5,21	0,70	1,11
FF5	F	1	30	278	17,1	1,5	6,15	0,54	1,03
FF6	M	1	27	204	11,9	0,4	5,83	0,20	1,04
FF7	F	2	25	205	9,4	0,8	4,59	0,39	1,31
FF8	M	2	25	186	8,2	0,5	4,41	0,27	1,19
FF9	M	1	27	201	12,0	0,4	5,97	0,20	1,02
FF10	M	3	28	226	9,1	0,4	4,03	0,18	1,03
FF11	F	3	28	253	12,2	1,5	4,82	0,59	1,15
FF12	M	3	31	309	19,9	0,4	6,44	0,13	1,04
FF13	F	3	27	214	8,7	1,6	4,07	0,75	1,09
FF14	F	2	28	222	12,5	1,3	5,63	0,59	1,01
FF15	M	2	25	142	3,4	0,3	2,39	0,21	0,91
FF16	M	3	29	235	9,4	0,2	4,00	0,09	0,96
FF17	M	3	26	171	4,9	0,5	2,87	0,29	0,97
FF18	F	2	33	341	20,7	2,3	6,07	0,67	0,95
FF19	F	2	31	275	10,4	1,5	3,78	0,55	0,92
FF20	M	3	30	293	17,2	0,8	5,87	0,27	1,09
FF21	F	3	34	349	9,6	2,5	2,75	0,72	0,89
FF22	F	3	32	289	12,3	1,4	4,26	0,48	0,88
FF23	M	3	29	239	10,5	0,4	4,39	0,17	0,98
FF24	F	3	37	523	14,4	3,5	2,75	0,67	1,03
FF25	M	2	30	300	22,6	0,7	7,53	0,23	1,11
EB1	F	1	28,0	183,4	9,2	0,5	5,02	0,27	0,84
EB2	M	1	27,0	161,0	11,5	0,1	7,14	0,06	0,82
EB3	F	1	31,0	250,2	21,8	1	8,71	0,40	0,84
EB4	M	2	32,0	291,5	12,7	2,5	4,36	0,86	0,89
EB5	F	1	31,0	242,9	19,1	1,7	7,86	0,70	0,82
EB6	F	1	28,0	205,0	12	0,6	5,85	0,29	0,93
EB7	M	1	28,0	10,9	10,4	0,7	95,41	6,42	0,05

EB8	M	1	29,0	233,8	13,4	0,8	5,73	0,34	0,96
EB9	M	1	32,0	287,7	15,7	0,4	5,46	0,14	0,88
EB10	M	1	27,0	178,3	9,9	0,2	5,55	0,11	0,91
EB11	M	1	31,0	233,1	14,9	1,2	6,39	0,51	0,78
EB12	M	1	28,0	197,9	10,1	0,8	5,10	0,40	0,90
EB13	M	3	38,0	503,0	28,5	3,5	5,67	0,70	0,92
EB14	M	1	33,0	346,0	16,6	0,7	4,80	0,20	0,96
EB15	F	1	31,0	277,3	17	0,7	6,13	0,25	0,93
EB16	F	1	31,0	255,5	20,9	1,2	8,18	0,47	0,86
EB17	F	1	30,0	211,1	15,4	0,8	7,30	0,38	0,78
EB18	F	1	32,0	294,0	25,8	1,6	8,78	0,54	0,90
EB19	M	1	30,0	253,9	14,2	1,3	5,59	0,51	0,94
EB20	M	3	40,0	555,0	34,6	4,5	6,23	0,81	0,87
EB21	M	3	41,0	652,0	51,1	7,2	7,84	1,10	0,95
EB22	M	1	33,0	347,0	20	0,8	5,76	0,23	0,97
EB23	M	3	39,0	494,8	26,4	3,5	5,34	0,71	0,83
EB24	M	1	30,0	257,0	16,1	0,8	6,26	0,31	0,95
EB25	M	1	29,0	244,0	9,7	0,3	3,98	0,12	1,00
OSF-U-1	F		37	535					
OSF-U-2	M		48	1170					
OSF-U-3	F		38	580					
OSF-U-4	F		47	953					
OSF-INJ-1	F		41	728					
OSF-INJ-2	F		44	926					
OSF-INJ-3	M		37	595					
OSF-E2-1	F		43	856					
OSF-E2-2	M		35	457					
OSF-E2-3	F		47,5	1011					
OSF-E2-4	F		42	705					
OSF-ZN-1	F		40	651					
OSF-ZN-2	F		31,5	347					
OSF-ZN-3	M		35	323					
OSF-ZN-4	F		45	953					

Vedlegg A: Alder= år; Lengde= cm; vekt, levervekt og gonade vekt= gram; LSI og GSI= % .

11.

12.

13.

14.

15.

16.

17.

18.

Vedlegg B: Normalisert genekspresjon

STASJON #	NORM CYP1A	NORM CYP3	NORM MT	NORM VTGA	NORM VTGB	NORM GR
IS1-1	0,2192498	0,4453695	1,917497 3	0,000000 6	0,0000154	0,1824207
IS1-2	0,8477742	0,9452659	0,827407 6	0,000000 2	0,0000068	0,7942097
IS1-3	0,5125337	0,8317514	0,442557 6	0,000018 5	0,0002531	0,1897273
IS1-14	0,1987071	0,6643025	0,625064 0	0,000000 3	0,0005565	0,3751773
IS1-15#2	0,5521293	0,7399921	0,732414 7	0,000000 5	0,0000076	0,8669520
IS1-17#2	0,4660722	1,1559447	0,585936 2	0,000000 1	0,0000045	1,3467327
IS1-21	0,3387196	0,5241306	0,440319 4	0,000000 1	0,0000046	0,3950200
IS1-22	0,6921142	0,5922765	0,516359 2	0,000000 6	0,0000167	0,7370337
IS1-4	0,5228026	1,1613268	0,416112 9	0,000000 2	0,0000024	1,4391806
IS1-5	0,5503542	1,3886795	0,685291 2	0,000000 1	0,0000026	0,6413448
IS1-11	0,4296037	0,3709376	0,510871 4	0,000000 2	0,0000018	0,1748673
IS1-12	0,2187455	0,7211424	0,712095 3	0,000000 1	0,0000040	0,5073351
IS1-19#2	0,6137814	1,1500303	0,491792 4	0,001834 6	0,0000036	0,6919445
IS1-20	0,5175679	0,7205971	0,450894 0	0,000000 2	0,0000163	0,9866757
IS1-23#2	0,4169198	1,0361914	0,634771 8	0,000000 1	0,0000026	0,7534694
IS1-25	0,6270451	1,3739627	0,631942 4	0,000000 4	0,0000122	0,3391357
IS2-9	0,6826876	1,0244072	0,796032 8	0,000060 5	0,0000832	1,4576320
IS2-13#2	0,6864594	1,1810480	0,605350 3	0,000000 1	0,0000035	0,3000226

IS2-20	0,8168688	0,6388002	0,316191 8	0,000000 1	0,0000061	0,4595338
IS2-25#2	0,4796796	0,9464865	0,845281 3	0,000000 1	0,0000033	1,0805931
IS2-4	0,9681052	0,8560306	0,398668 8	0,000000 1	0,0000049	1,2078185
IS2-11	0,7439753	0,6951498	1,472293 3	0,000000 2	0,0000032	0,3844854
IS2-19	0,5546779	0,9464279	0,342943 2	0,000000 0	0,0000029	0,5474595
IS2-1	1,2699183	1,3707919	0,631087 8	0,000025 0	0,0082173	0,7449409
IS2-3	0,5671914	1,0154202	0,789977 9	0,000000 2	0,0000042	0,9334177
IS2-6	0,7232071	0,9657829	0,721940 7	0,000000 6	0,0000056	1,0677427
IS2-8#2	1,7416934	3,0634354	0,958137 4	0,000000 4	0,0000606	0,9461557
IS2-10#2	0,4407008	0,3952967	0,942732 7	0,000000 8	0,0000038	0,5470396
IS2-14	0,6138134	1,3327509	0,366066 2	0,000000 7	0,0000033	0,1338010
IS2-23	1,0921195	1,5809967	0,683234 3	0,000000 1	0,0000032	0,4746340
FF3#2	1,3777355	1,1556791	0,928642 7	0,000846 4	0,0014167	0,3788045
FF4	1,3894865	1,5558063	0,417230 1	0,000007 5	0,0038220	0,5366816
FF13#2	1,0883950	1,6274698	0,592946 5	0,000002 1	0,0002259	0,4294211
FF7	0,4431964	0,7513504	0,698514 0	0,000004 5	0,0002266	0,5709633
FF14	0,6363624	0,9163468	1,188826 7	0,000003 6	0,0040319	0,4582484
FF22	0,4613155	0,5491568	0,716247 1	0,000000 4	0,0000780	0,5783593
FF19	0,6267331	1,5761695	0,775202 6	0,000000 4	0,0000256	0,3687838
FF1	1,3189390	1,3125704	0,720377 7	0,000000 5	0,0000030	0,4772090
FF8	1,5846615	1,5291459	1,454172 2	0,000000 2	0,0000078	0,9793390
FF10#2	1,4380490	1,2303846	0,902630 3	0,000000 4	0,0000038	0,7360487
FF15	1,4993910	0,9764372	0,963345	0,000000	0,0000023	0,3851726

			6	4		
FF16	1,1656580	1,7635703	1,551837 1	0,000000 0	0,0000060	1,0325097
FF17	1,2577514	3,4045845	1,030032 1	0,000022 2	0,0000731	0,8139628
FF23	0,8200967	0,7052289	0,656681 1	0,000000 5	0,0000037	0,4378786
FF25#2	1,3907713	1,1350896	2,471589 8	0,000002 8	0,0000100	1,6976278
EB5	0,5642236	1,1444545	1,279184 3	0,000007 4	0,0002403	0,4621884
EB15	0,9901588	1,0000000	0,923171 1	0,000000 3	0,0000086	0,8468400
EB16	0,6773751	1,1851950	0,612007 0	0,000000 6	0,0000363	1,3808801
EB17#2	0,8004802	0,9061333	0,754412 1	0,000000 1	0,0000053	0,9031700
EB6	1,0100644	1,5655630	0,745797 8	0,000000 2	0,0000023	1,7006832
EB1#2	0,5839169	1,1242038	0,520015 3	0,000000 2	0,0000027	1,3235759
EB7#2	1,0039437	0,9007567	0,784501 9	0,000000 0	0,0000017	1,3794033
EB 18	1,2261873	0,8612348	0,825716 2	0,000001 2	0,0000048	1,1127023
EB8	0,9843922	0,7701378	1,217326 2	0,000001 0	0,0002531	0,8388464
EB9	1,8977544	0,6678747	1,764319 6	0,000000 0	0,0000077	0,5928873
EB11#2	0,9087926	0,4482470	0,932814 3	0,000000 1	0,0000211	0,2043607
EB 12	0,8613260	1,0562603	1,038849 5	0,000001 6	0,0000044	0,7568517
EB 13	1,4686343	1,0590560	1,210750 8	0,000000 3	0,0000046	0,5583899
EB 20#2	1,3512593	0,2174631	1,303558 7	0,000002 6	0,0000095	0,6189830
EB 21#2	0,5571830	0,7464681	1,624351 9	0,000000 4	0,0005812	0,6634252
EB 22	1,8002543	0,4754971	0,940931 2	0,000002 0	0,0000332	0,5894427
osf-u-1	0,5892018	0,7567220	0,505674 1	1,237850 9	0,0020408	0,4624862
osf-u-2	0,6769911	0,7768073	0,526781 5	0,000660 3	0,0007715	0,5831282

osf-u-3	0,9037369	0,6513936	0,236012 0	2,912143 5	0,0672975	0,2423901
osf-u-4	2,1803296	0,6904825	0,336155 5	0,000492 1	0,5548442	0,2521045
osf-inj-1	1,2968797	0,3873517	0,412549 4	0,030752 8	0,0008959	0,3652095
osf-e2-3	0,4452543	0,3365331	0,535162 6	0,057370 2	0,0627405	0,3920436
osf-inj-3	1,4956339	1,2860456	0,528282 1	0,089004 4	0,0011968	0,2688966
osf-e2-1	0,3116899	0,4669481	0,801963 1	0,000464 2	3,1476333	0,3249498
osf-e2-2	0,9926551	1,6835313	0,491450 6	0,068317 8	0,0016068	0,2533547
osf-inj-2	0,1103351	0,1616630	0,885524 7	0,000705 0	0,0002340	0,4321244
osf-e2-4	0,3609330	0,7906656	0,248204 4	0,030261 6	0,0000106	0,1419224
osf-zn-1	1,1095490	1,5821109	0,347632 5	0,035394 1	0,2451824	0,1616074
osf-zn-2	113,0849660	62,8538694	3,042615 5	0,000413 6	186,573175 7	2,9194227
osf-zn-3	286,4538657	280,2862494	5,109986 0	0,000128 2	5,9548843	49,2933672
osf-zn-4	2356,918649 9	1428,057299 8	1,385343 2	9,561150 8	10,4459294	125,872465 4

19.

20.

21.

22.

23.

24.

Vedlegg C: Normalisert genekspresjon referansegener

STASJON #	CP UB	EFF UB	REL Q EB	CP S9	EFF S9	REL Q S9	NORM FAKT
IS1-1	25,460	1,976	0,173	22,125	1,932	0,487	0,290
IS1-2	26,345	1,976	0,094	22,625	1,932	0,351	0,182
IS1-3	23,715	1,976	0,566	21,930	1,932	0,554	0,560
IS1-14	23,790	1,976	0,538	21,785	1,932	0,610	0,573
IS1-15#2	23,720	1,976	0,564	21,980	1,932	0,536	0,550
IS1-17#2	24,845	1,976	0,262	22,900	1,932	0,292	0,277
IS1-21	23,810	1,976	0,531	22,070	1,932	0,505	0,518

IS1-22	24,173	1,976	0,414	22,265	1,932	0,444	0,429
IS1-4	23,923	1,976	0,491	21,955	1,932	0,545	0,517
IS1-5	23,980	1,976	0,473	22,165	1,932	0,475	0,474
IS1-11	23,280	1,976	0,762	21,765	1,932	0,618	0,686
IS1-12	24,017	1,976	0,461	22,490	1,932	0,383	0,420
IS1-19#2	24,625	1,976	0,305	22,505	1,932	0,379	0,340
IS1-20	24,853	1,976	0,261	22,440	1,932	0,396	0,321
IS1-23#2	23,895	1,976	0,501	22,245	1,932	0,450	0,475
IS1-25	26,520	1,976	0,084	24,220	1,932	0,123	0,101
IS2-9	24,020	1,976	0,460	22,513	1,932	0,377	0,417
IS2-13#2	24,563	1,976	0,318	22,475	1,932	0,387	0,351
IS2-20	24,067	1,976	0,446	22,103	1,932	0,494	0,469
IS2-25#2	24,363	1,976	0,364	22,500	1,932	0,381	0,372
IS2-4	25,125	1,976	0,217	22,865	1,932	0,299	0,255
IS2-11	24,825	1,976	0,266	21,925	1,932	0,556	0,384
IS2-19	24,240	1,976	0,396	22,203	1,932	0,463	0,428
IS2-1	24,890	1,976	0,254	23,155	1,932	0,247	0,251
IS2-3	23,695	1,976	0,574	22,540	1,932	0,371	0,461
IS2-6	24,455	1,976	0,342	22,633	1,932	0,349	0,345
IS2-8#2	24,793	1,976	0,272	22,987	1,932	0,276	0,274
IS2-10#2	24,020	1,976	0,460	22,440	1,932	0,396	0,427
IS2-14	23,390	1,976	0,707	23,523	1,932	0,194	0,370
IS2-23	23,935	1,976	0,487	22,797	1,932	0,313	0,391
FF3#2	22,957	1,976	0,949	22,175	1,932	0,471	0,669
FF4	24,615	1,976	0,307	22,857	1,932	0,301	0,304
FF13#2	24,120	1,976	0,430	22,447	1,932	0,394	0,412
FF7	23,977	1,976	0,474	22,603	1,932	0,356	0,410
FF14	23,597	1,976	0,614	22,535	1,932	0,372	0,478
FF22	23,250	1,976	0,777	22,170	1,932	0,473	0,606
FF19	24,860	1,976	0,260	22,887	1,932	0,295	0,277
FF1	23,855	1,976	0,515	22,747	1,932	0,324	0,408
FF8	25,267	1,976	0,197	24,170	1,932	0,127	0,158
FF10#2	24,243	1,976	0,395	23,030	1,932	0,268	0,326
FF15	23,735	1,976	0,559	22,025	1,932	0,520	0,539
FF16	24,970	1,976	0,241	23,685	1,932	0,174	0,205
FF17	25,670	1,976	0,150	24,155	1,932	0,128	0,138
FF23	24,470	1,976	0,339	22,710	1,932	0,331	0,335
FF25#2	25,790	1,976	0,138	24,370	1,932	0,111	0,124
EB5	24,103	1,976	0,435	22,190	1,932	0,467	0,450
EB15	22,880	1,976	1,000	21,033	1,932	1,000	1,000
EB16	24,465	1,976	0,340	23,610	1,932	0,183	0,250
EB17#2	23,615	1,976	0,606	22,385	1,932	0,411	0,499
EB6	23,667	1,976	0,585	22,047	1,932	0,513	0,548
EB1#2	23,490	1,976	0,660	22,080	1,932	0,502	0,576

EB7#2	22,885	1,976	0,997	22,005	1,932	0,527	0,725
EB 18	25,050	1,976	0,228	22,900	1,932	0,292	0,258
EB8	24,230	1,976	0,399	22,760	1,932	0,321	0,358
EB9	25,145	1,976	0,214	24,263	1,932	0,119	0,160
EB11#2	24,855	1,976	0,261	23,363	1,932	0,216	0,237
EB 12	24,277	1,976	0,386	23,455	1,932	0,203	0,280
EB 13	23,870	1,976	0,510	24,000	1,932	0,142	0,269
EB 20#2	24,150	1,976	0,421	22,960	1,932	0,281	0,344
EB 21#2	23,365	1,976	0,719	22,005	1,932	0,527	0,616
EB 22	24,905	1,976	0,252	25,320	1,932	0,059	0,122
osf-u-1	23,610	1,976	0,608	22,400	1,932	0,407	0,497
osf-u-2	23,185	1,976	0,812	21,065	1,932	0,979	0,892
osf-u-3	24,230	1,976	0,399	22,883	1,932	0,296	0,343
osf-u-4	23,920	1,976	0,492	22,325	1,932	0,427	0,459
osf-inj-1	24,777	1,976	0,275	21,945	1,932	0,549	0,388
osf-e2-3	24,265	1,976	0,389	22,460	1,932	0,391	0,390
osf-inj-3	23,755	1,976	0,551	22,680	1,932	0,338	0,432
osf-e2-1	24,800	1,976	0,270	22,530	1,932	0,373	0,318
osf-e2-2	24,965	1,976	0,242	23,405	1,932	0,210	0,225
osf-inj-2	23,400	1,976	0,702	22,170	1,932	0,473	0,576
osf-e2-4	22,910	1,976	0,980	21,303	1,932	0,837	0,906
osf-zn-1	24,580	1,976	0,314	22,897	1,932	0,293	0,303
osf-zn-2	31,910	1,976	0,002	27,180	1,932	0,017	0,006
osf-zn-3	31,255	1,976	0,003	30,635	1,932	0,002	0,002
osf-zn-4	37,780	1,976	0,000	32,540	1,932	0,001	0,000

25.

26.

27.

28.

29.

30.

31.

Vedlegg D: Rådata ELISA verdier:

Station	Plate	Station #	R1	R2	R3	R4	AV
IS1	PL2	IS1-1	0,293	masked	0,289	0,292	0,291
IS1	PL2	IS1-2	0,141	0,124	0,120	0,137	0,130
IS1	PL1	IS1-3	0,192	0,186	0,159	0,172	0,177
IS1	PL1	IS1-4	0,187	0,197	0,180	0,203	0,192
IS1	PL2	IS1-5	0,159	0,158	0,168	0,160	0,161

IS1	PL 3	IS1-6	0,035	0,034	0,029	0,033	0,033
IS1	PL1	IS1-8	0,152	masked	0,129	0,114	0,132
IS1	PL2	IS1-9	0,220	0,187	0,190	0,202	0,199
IS1	PL4	IS1-10	0,034	0,032	0,032	0,035	0,033
IS1	PL 3	IS1-11	0,049	0,041	0,038	0,036	0,041
IS1	PL 3	IS1-12	0,074	0,070	0,076	0,081	0,076
IS1	PL1	IS1-13	0,240	0,230	0,225	0,322	0,254
IS1	PL5	IS1-14	0,039	0,039	0,033	0,048	0,040
IS1	PL4	IS1-15	0,042	0,040	0,044	0,047	0,043
IS1	PL5	IS1-16	0,049	0,041	0,062	0,040	0,048
IS1	PL2	IS1-17	0,107	0,099	0,172	0,181	0,139
IS1	PL5	IS1-18	0,043	0,043	0,040	0,037	0,041
IS1	PL1	IS1-19	0,130	0,111	0,096	masked	0,112
IS1	PL2	IS1-20	0,144	0,140	Masked	0,137	0,140
IS1	PL 3	IS1-21	0,025	0,031	0,032	0,027	0,029
IS1	PL4	IS1-22	0,042	0,031	0,044	0,035	0,038
IS1	PL 3	IS1-23	0,048	0,038	0,037	0,041	0,041
IS1	PL4	IS1-24	0,073	0,076	0,080	0,083	0,078
IS1	PL4	IS1-25	0,105	0,093	0,090	0,098	0,097
IS2	PL1	IS2-1	0,288	0,265	0,257	0,266	0,269
IS2	PL5	IS2-2	0,054	0,039	0,045	0,052	0,048
IS2	PL2	IS2-3	0,156	0,164	0,175	0,184	0,169
IS2	PL1	IS2-4	masked	0,149	0,151	0,152	0,151
IS2	PL2	IS2-5	0,228	0,216	0,252	0,221	0,229
IS2	PL1	IS2-6	0,304	0,225	0,246	0,229	0,251
IS2	PL 3	IS2-7	0,038	0,039	0,036	0,033	0,037
IS2	PL4	IS2-8	0,062	0,048	0,050	0,041	0,050
IS2	PL5	IS2-9	0,060	0,069	0,096	0,070	0,074
IS2	PL2	IS2-10	0,099	0,093	0,154	0,146	0,123
IS2	PL2	IS2-11	0,114	0,185	0,148	0,152	0,149
IS2	PL4	IS2-12	0,036	0,026	0,034	0,030	0,032
IS2	PL1	IS2-13	0,214	0,190	0,198	0,185	0,197
IS2	PL4	IS2-14	0,034	0,038	0,040	0,039	0,038
IS2	PL4	IS2-15	0,039	0,040	0,032	0,454	0,141
IS2	PL4	IS2-16	0,040	0,036	0,035	0,035	0,037
IS2	PL2	IS2-17	0,099	masked	0,102	0,100	0,100
IS2	PL1	IS2-18	0,176	0,177	0,171	0,181	0,176
IS2	PL 3	IS2-19	0,043	0,054	0,066	0,099	0,066
IS2	PL 3	IS2-20	0,039	0,033	0,032	0,029	0,034
IS2	PL4	IS2-21	0,043	0,044	0,043	0,041	0,043
IS2	PL2	IS2-22	0,149	0,149	0,168	0,165	0,157
IS2	PL4	IS2-23	0,045	0,038	0,046	0,034	0,041
IS2	PL5	IS2-24	0,035	0,029	0,033	0,032	0,033
IS2	PL 3	IS2-25	0,038	0,078	0,076	0,074	0,067

FF	PL1	FF1	masked	0,214	0,216	0,234	0,221
FF	PL1	FF2	0,176	0,156	0,169	0,164	0,166
FF	PL2	FF-3	0,110	0,122	0,147	0,137	0,129
FF	PL2	FF4	0,194	0,185	0,189	0,184	0,188
FF	PL4	FF5	0,045	0,033	0,033	0,035	0,037
FF	PL5	FF6	0,114	0,090	0,094	0,097	0,099
FF	PL2	FF7	0,111	0,110	0,124	0,112	0,114
FF	PL5	FF8	0,054	0,049	0,046	0,054	0,051
FF	PL 3	FF9	0,036	0,033	0,042	0,034	0,037
FF	PL 3	FF10	0,036	0,032	0,030	0,032	0,033
FF	PL 3	FF11	-0,036	-0,037	-0,036	-0,037	-0,036
FF	PL2	FF12	0,235	0,221	0,229	0,226	0,227
FF	PL2	FF13	0,209	0,196	0,195	0,198	0,199
FF	PL4	FF14	0,036	0,035	0,035	0,031	0,034
FF	PL5	FF15	0,062	0,050	0,056	0,044	0,053
FF	PL 3	FF16	0,048	0,044	0,043	0,037	0,043
FF	PL1	FF17	0,197	0,178	0,181	0,186	0,186
FF	PL4	FF18	0,043	0,049	0,047	0,038	0,044
FF	PL1	FF19	0,207	0,000	0,218	masked	0,142
FF	PL4	FF20	0,045	0,036	0,038	0,037	0,039
FF	PL2	FF21	0,095	0,097	0,105	masked	0,099
FF	PL 3	FF22	0,042	0,040	0,040	0,058	0,045
FF	PL 3	FF23	0,037	0,061	0,051	0,118	0,067
FF	PL5	FF24	0,054	0,044	0,042	0,048	0,047
FF	PL1	FF25	0,223	0,221	0,219	0,222	0,221
EB	PL5	EB1	0,040	0,036	0,035	0,035	0,037
EB	PL1	EB2	0,269	0,261	0,266	0,263	0,265
EB	PL1	EB3	0,171	0,147	0,142	0,142	0,151
EB	PL1	EB4	0,103	0,094	0,094	0,094	0,096
EB	PL1	EB5	0,188	0,173	0,178	0,181	0,180
EB	PL5	EB6	0,072	0,079	0,075	0,066	0,073
EB	PL4	EB7	0,070	0,049	0,090	0,055	0,066
EB	PL 3	EB8	0,046	0,046	0,048	0,047	0,047
EB	PL 3	EB9	0,039	0,037	0,037	0,035	0,037
EB	PL4	EB10	0,093	0,072	0,075	0,106	0,087
EB	PL5	EB11	0,048	0,042	0,048	0,054	0,048
EB	PL2	EB12	masked	0,192	0,191	0,195	0,192
EB	PL2	EB13	0,228	0,212	0,224	0,211	0,218
EB	PL 3	EB14	0,043	0,039	0,034	0,044	0,040
EB	PL2	EB15	0,137	0,127	masked	0,144	0,136
EB	PL2	EB16	0,158	0,150	0,146	0,152	0,151
EB	PL2	EB17	0,228	0,199	0,209	0,205	0,210
EB	PL 3	EB18	0,030	0,026	0,032	0,025	0,029
EB	PL 3	EB19	0,044	0,041	0,048	0,053	0,047

EB	PL1	EB20	0,223	0,215	masked	0,226	0,221
EB	PL1	EB21	masked	0,208	0,205	0,195	0,203
EB	PL4	EB22	0,044	0,031	0,038	0,036	0,037
EB	PL4	EB23	0,043	0,059	0,041	0,040	0,046
EB	PL5	EB24	0,055	0,046	0,044	0,046	0,048
EB	PL4	EB25	0,046	0,041	0,040	0,039	0,042

32.

33.

34.

35.

36.

37.

38.

39.

40.

41.

42.

43.

44.

45.

46.

47.

48.

49.

50.

Vedlegg E: PreDNase RNA kvalitet

Stasjon #	ng/ul	260/280	260/230	RIN-verdi
IS1-1	386,68	1,98	2,34	9,10

IS1-2	520,68	1,99	2,43	9,10
IS1-3	69,32	1,96	1,69	9,00
IS1-4	1010,61	1,98	2,37	9,20
IS1-5	282,76	1,91	2,31	8,60
IS1-6	973,49	1,98	2,25	7,60
IS1-6#2	1092,96	1,99	2,19	7,20
IS1-7				
IS1-8	626,47	1,99	2,09	7,30
IS1-8	626,47	1,99	2,09	7,30
IS1-8#2	189,82	1,88	2,37	8,00
IS1-9	418,47	1,97	1,72	9,60
IS1-10	392,90	1,99	-6,80	
IS1-10	399,34	1,96	-5,61	
IS1-11	358,78	1,92	2,27	9,30
IS1-11#2	409,18	1,94	1,88	8,90
IS1-12	389,43	1,96	2,13	8,90
IS1-13	686,33	1,98	2,40	6,90
IS1-13#2	614,67	2,01	2,42	7,30
IS1-14	500,38	1,99	1,69	8,00
IS1-15	29,06	1,83	1,96	5,80
IS1-15#2	452,98	1,93	2,00	8,90
IS1-16	624,45	2,00	3,18	6,60
IS1-17	719,08	1,97	2,33	6,80
IS1-17#2	706,18	1,96	1,87	7,90
IS1-18	338,66	1,97	1,77	7,30
IS1-19	861,54	1,96	2,37	7,00
IS1-19#2	784,49	1,98	2,44	8,60
IS1-19kolonne	228,01	2,11	1,33	7,20
IS1-19licl	465,01	1,86	2,46	7,20
IS1-20	317,18	1,95	2,04	8,30
IS1-21	725,07	1,99	2,39	8,30
IS1-22	634,68	1,99	2,36	7,20
IS1-23	362,49	1,96	2,34	8,50
IS1-23#2	328,99	1,94	2,24	8,50
IS1-24	202,36	1,92	2,18	???
IS1-24#2	276,96	2,00	-3,14	
IS1-24#2kolonne	424,07	2,04	2,29	7,30
IS1-24#2kolonne(fortynnet)	321,64	2,03	2,33	
IS1-25	616,72	1,96	2,17	8,30
IS2-1	396,34	1,94	1,84	8,20
IS2-2	700,37	2,00	3,34	7,90
IS2-3	796,14	1,96	2,25	7,80
IS2-3#2	925,36	1,97	2,33	7,00
IS2-4	137,19	1,39	1,43	7,80
IS2-4	92,22	1,72	2,00	7,80
IS2-4#2	294,62	1,92	2,30	7,50
IS2-5	379,41	1,93	2,17	8,50
IS2-6*	812,49	2,01	2,17	8,80
IS2-7	283,60	2,02	2,12	7,70
IS2-7#2	359,55	1,92	2,40	7,20

IS2-8	1380,81	2,03	2,38	N/A
IS2-8#2	1156,98	2,00	1,96	8,10
IS2-9	799,12	2,00	2,32	8,20
IS2-10	256,21	1,93	2,30	7,30
IS2-10#2	406,03	1,96	2,39	8,00
IS2-11	759,17	1,98	2,32	7,70
IS2-12	1354,59	2,00	2,36	2,80
IS2-13	333,37	1,93	2,12	7,3
IS2-13#2	270,27	1,94	2,10	8,10
IS2-14	432,35	1,97	2,46	9,10
IS2-15	843,72	1,98	2,39	8,40
IS2-16	465,10	1,93	2,23	8,50
IS2-17				
IS2-18	969,90	1,99	2,42	??
IS2-19	599,55	1,99	2,41	7,20
IS2-19#2	554,54	1,95	2,39	7,10
IS2-20	778,34	2,00	2,45	8,90
IS2-21				
IS2-22	518,73	1,99	2,15	8,70
IS2-23	1213,64	2,00	2,19	8,50
IS2-24	736,49	2,00	3,19	6,60
IS2-24#2	593,13	1,94	2,16	6,70
IS2-25	773,25	2,02	2,40	7,80
IS2-25#2	729,60	2,00	1,34	9,50
FF1	433,52	1,95	2,06	8,30
FF2	498,63	1,93	2,34	6,70
FF3	745,72	1,99	2,14	7,10
FF3#2	603,34	1,97	1,97	9,40
FF4	362,49	1,92	2,10	8,10
FF5	21,79	1,98	1,25	8,10
FF6	341,43	1,94	2,10	7,50
FF7	257,64	1,93	2,21	9,50
FF8	419,84	1,91	2,27	8,00
FF9	217,13	1,93	1,96	7,80
FF10	611,60	1,95	2,11	8,70
FF10#2	555,70	2,00	3,12	9,20
FF11	592,55	1,96	1,93	8,40
FF12	12,76	1,33	0,16	
FF12#2	257,36	1,97	1,76	9,40
FF12#2 kolonne	26,69	1,88	2,18	8,50
FF13	744,92	1,97	2,31	6,90
FF13#2	413,76	1,99	2,03	8,30
FF14	327,45	1,95	2,25	9,40
FF15	943,65	2,00	2,08	8,00
FF16	445,64	1,97	2,04	8,20
FF17	602,73	1,99	2,32	8,60
FF18	213,48	1,95	1,67	8,70
FF18#2	284,18	1,99	-5,05	
FF19	696,81	2,03	1,96	9,00
FF20	422,61	1,97	-16,18	
FF20 kolonne	569,37	2,05	2,46	7,30

FF20 kolonne(fortynnet)	274,85	2,00	2,47	
FF21	647,64	1,99	2,41	2,50
FF22	503,37	1,93	2,28	9,00
FF23	402,76	2,00	2,03	8,40
FF24	331,44	1,94	2,17	8,30
FF25	464,82	1,92	1,72	N/A
FF25#2	280,36	1,94	1,84	8,30
EB1	76,44	2,01	1,68	8,50
EB-1#2	590,21	1,90	1,61	7,80
EB2	253,91	1,90	2,17	6,20
EB2#2	368,16	1,94	1,67	7,30
EB3	305,09	1,92	2,08	7,10
EB3#2	274,98	1,99	2,14	6,80
EB-3kolonne	654,12	2,10	2,26	N/A
EB3licl	218,64	1,83	2,58	7,50
EB4	692,43	1,99	2,13	6,80
EB4#2	132,22	2,40	1,41	7,30
EB4#2	164,88	2,00	1,21	
EB5	303,07	1,93	2,36	8,60
EB6	75,39	2,01	1,92	8,20
EB7	119,43	2,03	-2,10	
EB7	403,60	1,97	1,65	
EB7kolonne	187,87	2,05	2,36	7,10
EB7#2	400,91	1,95	1,02	8,20
EB8	366,21	1,95	2,31	8,30
EB9	369,40	1,94	2,20	8,30
EB10	346,85	1,98	-4,27	
EB-10#2	195,33	1,89	1,66	7,80
EB11	339,77	1,92	2,16	7,80
EB11#2	354,10	1,96	1,81	8,50
EB12	450,79	1,94	2,22	N/A
EB13	371,28	1,93	2,15	8,40
EB14	254,06	1,95	2,29	7,90
EB15	445,14	1,93	2,17	8,30
EB16	328,69	1,95	2,14	N/A
EB17	65,48	1,76	1,92	N/A
EB-17#2	297,04	1,92	2,16	8,90
EB18	253,50	1,98	2,12	9,10
EB18#2	397,24	1,94	1,98	8,20
EB19	344,91	1,95	1,91	7,80
EB19#2	606,53	1,97	1,11	8,00
EB20	201,95	1,96	1,88	7,60
EB20#2	444,68	1,95	1,83	8,00
EB-21	208,09	1,46	1,77	8,30
EB21#2	281,41	1,91	2,00	8,90
EB22	335,82	1,90	2,21	8,30
EB23	478,21	1,93	1,86	7,50
EB23#2	543,25	1,99	1,48	
EB23#3	593,76	1,99	1,71	8,30
EB24	276,06	2,00	-2,83	
EB24	277,43	1,99	-3,13	

EB24#2	203,17	1,90	1,99	6,90
EB24c	362,13	1,92	1,77	6,90
EB25	862,65	1,99	2,02	7,10
EB25#2	240,26	1,94	1,70	
EB25#2	243,83	1,94	1,74	
OSF-U-1	702,32	2,00	2,08	10,00
OSF-U-2	412,05	1,95	2,22	10,00
OSF-U-3	720,98	1,98	2,19	8,90
OSF-U-4	504,95	1,98	2,17	9,80
OSF-INJ-1	440,37	2,01	1,64	10,00
OSF-INJ-2	1612,41	2,01	2,11	9,70
OSF-INJ-3	379,87	1,94	2,09	9,70
OSF-E2-1	668,20	1,98	2,01	9,90
OSF-E2-2	332,86	1,93	1,99	9,20
OSF-E2-3	636,04	1,98	2,19	9,90
OSF-E2-4	790,85	2,00	2,38	9,50
OSF-ZN-1	649,17	2,00	2,15	9,70
OSF-ZN-2	538,68	1,96	2,29	9,70
OSF-ZN-3	583,65	2,00	2,29	9,40
OSF-ZN-4	469,12	1,96	2,13	9,90

51.

52.

53.

54.

55.

56.

57.

58.

59.

60.

61.

62.

63.

64.

65.

66.

Vedlegg F: Post DNase RNA kvalitet

Stasjon #	ng/ul	260/280	260/230	RIN
IS1-1	61,55	1,96	2,2	7,1
IS1-2	80,18	1,87	1,45	6,5
IS1-3	103,02	1,97	1,66	6,6
IS-14	120,54	1,99	2,39	7
IS-15-2	18,01	1,92	1,56	1
IS-17-2	74,71	1,94	2,18	N/A
IS1-21	131,23	2,07	2,15	
IS1-22	49,81	2,06	1,84	6,3
IS1-4	66,78	2,07	2,15	7,1
IS1-5	36,74	2	2,05	6,7
IS1-9				
IS-11	102,24	1,99	2,29	7,3
IS1-12	62,16	1,88	2,13	7,4
IS1-19-2	94,79	1,92	2,11	5,7
IS1-20	76,54	1,9	2,38	7,3
IS1-23	78,3	1,89	2,44	5,8
IS1-25	84,19	1,94	2,29	7,4
IS2-9	14,29	1,92	1,73	N/A
IS2-13-2	35,5	1,92	1,31	7,4
IS2-16	0,7	1,81	2,67	
IS2-20	69,99	1,99	2,1	7,3
IS2-25-2	89,88	2,06	2,22	8
IS2-4	26,47	2,13	1,96	5,7
IS2-11	43,74	2,05	2,11	6,9
IS2-19	73,18	1,99	2,11	5,4
IS2-1	59,8	1,8	2,44	8,4
IS2-3	66,4	1,96	2,41	7,2
IS2-5	99,38	1,96	2,31	5,8
IS2-6	150,9	2,03	2,29	8,1
IS2-8#2	86,09	1,91	2,34	7
IS2-10-2	84,83	1,94	2,4	1
IS2-14	57,52	1,97	2,24	7,7
IS2-23	86,15	1,83	1,71	7,3
FF3#2	59,43	2,09	2,14	8,5
FF4	65,16	2	2,32	6,5
FF7	43,48	2,01	2,08	N/A
FF13-2	56,26	2	2,21	7,2
FF14	86,48	2,07	1,98	8,8
FF22	100,92	2,02	2,34	7,1
FF24	7,4	1,51	1,75	N/A
FF19	15,03	2,06	2,17	6,5

FF1	42,5	2,02	2,24	7,2
FF8	53,85	2,03	2,19	6,5
FF10#2	41,48	1,93	2,29	7,8
FF15	95,54	1,95	2,38	6,2
FF16	36,45	2,09	1,87	7,8
FF17	49,14	2,09	2,14	8,1
FF23	18,37	2,14	1,92	6,9
FF25#2	33,86	2,02	1,98	6,7
EB5	23,8	2	1,89	6,6
EB15	88,18	2,06	2,15	6,2
EB16	72,97	2,09	2,23	7,3
EB17#2	43,17	2,05	1,72	7,4
EB6	61,34	2,1	1,91	7,3
EB1	36,27	2,01	1,65	6,3
EB#7	42,5	2,08	2,22	2,6
EB18	72,74	2,02	2,42	7,7
EB8	64,93	2,02	2,27	7,4
EB9	60,1	2,11	2,03	6,6
EB11-2	98,49	2,06	2,28	2,2
EB12	62,37	2,03	2,34	7,1
EB13	77,75	2,06	2,04	7,7
EB20#2	21,1	2,05	2,13	7,3
EB21#2	49,56	2,02	1,99	7,4
EB22	61,95	2,09	2,08	7,6
OSF-U-1	54,86	2,03	2,19	N/A
OSF-U-2	60,65	2,05	2,35	8,4
OSF-U-3	81,52	2,01	2,25	7,3
OSF-U-4	75,38	2	2,46	7,2
OSF-INJ-1	75,84	2,03	2,43	8
OSF-INJ-2	78	2,05	2,41	6,6
OSF-INJ-3	70,7	2,09	2,34	7,1
OSF-E2-1	88,32	2,1	2,38	8,8
OSF-E2-2	116,21	2,02	2,22	7,2
OSF-E2-3	79,37	2,13	2,32	7,6
OSF-E2-4	51,23	1,97	2,64	4,3
OSF-ZN-1	69,68	2,1	2,31	N/A
OSF-ZN-2	84,46	2,03	2,19	2,6
OSF-ZN-3	79,01	1,97	2,19	7,8
OSF-ZN-4	102,32	2	2,39	8,5

67.

68.

69.

70.

71. Vedlegg G: RNA kvalitet uttesting

	ng/ul	260/280	260/230	RIN VERDI	
1. uttesting:					
T2	288,79	1,79	2,24	5,2	
T40	3756,8	1,88	2,04	3,2	
T47	646,47	1,9	1,92	4,7	
T44	900,36	1,97	1,83	4,3	
T11	4597,3	1,3	1,38	3,6	
IS2-11	1119,5	2,01	2,29	4,5	
IS1-8	911,77	2,04	1,64	5,8	
FF2	435,07	1,94	1,83	6,3	
EB10	338,39	1,93	1,6	6,4	
2, uttesting					
BaP1-l6	626,96	1,99	1,46	8,2	
FF3	628,38	2,01	1,63	6,4	
EB6	454,29	1,92	1,82	6,1	
IS2-15	1141,2	2,03	1,84	4,2	
IS1-20	412,3	1,94	1,48	5,8	
BaP1-l6licl	435,39	1,88	2,19	6,5	
FF3licl	358,57	1,88	2,16	5,8	
EB6licl	120,17	1,78	2,05	4,2	
IS2-15licl	833,1	2,03	2,34	4,7	
IS1-20licl	359,5	1,94	2,22	4,9	
3, uttesting					
is1-2#1	185,28	1,86	1,36	N/A	OK
is1-2#2	90,31	2,00	0,49	N/A	OK
is1-2#3	4,81	3,01	0,26	N/A	Ikke signal
IS1-2#4	56,48	2,00	0,23	N/A	OK
IS1-2#6	32,82	1,97	0,18	N/A	OK
IS1-2#7	6,42	1,79	0,16	N/A	Ikke signal
IS1-2#8	15,04	1,43	0,14	N/A	Ikke signal
IS1-2#9	9,62	1,65	0,04	N/A	Ikke signal
4, uttesting					
E2-9l3	578,09	1,96	0,88	9,5	
BaP3-l3	912,39	1,96	0,83	9,6	
K13-l3	897,26	1,93	0,57	9,6	
BaP10-l10#2	1141,81	2,01	0,77	9,4	
E2-9l3sf	1178,16	2,02	2,00	8,8	
BaP3-l3-6sf	809,18	2,05	1,73	8,6	
K13-l3sf	258,94	1,98	1,37	9,2	
BaP10-l10sf	553,56	2,07	1,57	9,4	

72.

73.

74.

Vedlegg H: Kjemikaler og kit

Utstyr/ Software	Produsent
Kapittel 3.1:	
CXR500 Dry Shipper kryoshipper	Taylor-Wharton
Kapittel 3.3	
Potter-Elverheim homogenisator	
Biofuge 28 RS	Heraeus
Sorvall RC-6	Kendro
Kapittel 3.4	
96 brønns mikroplate	Sarstedt
Thermomax microplatereader	Molecular Devices Corp.
SOFTmax v2.32 1992	Molecular Devices Corp.
Kapittel 3.5	
Maxisorp 96 brønns mikorplate	Nunc
Skanswasher 300	Skatron Instruments
Thermomax microplatereader	Molecular Devices Corp.
SOFTmax v2.32 1992	Molecular Devices Corp.
Kapittel 3.6	
Agilent Bioanalyser 2100	Agilent Technologies
Agilent bioanalyser 2100 Expert Software	Agilent Technologies
Biofuge pico	Kendro Laboratory products
Eppendorf Centrifuge 5415R	Eppendorf
Keramiske zirconium oksid perler til homogenisering	Bertin technologies
Homogeniseringsrør	Nunc
Heraeus Fresco 21 Centrifuge	Thermo electron corporation
Linsepapir	Watman
nandrop 2000 software	thermo scientific
Precellys24homogenizer	Bertin technologies
QBT 2 varmeblokk	Grant instruments
Thermo Scientific Nanodrop®ND-1000	NanoDrop Technologies
Vortekser	IKA Works
Kapittel 3.7	
Agilent Bioanalyser 2100	Agilent Technologies
Agilent bioanalyser 2100 Expert Software	Agilent Technologies
Vortekser	IKA Works
3.8	
PCR 8-strip tubes	Eppendorf

Eppendorf Centrifuge 5415R	Eppendorf
QBT2 varmeblokk	Grant instruments
Mastercycler epigradiant S	Eppendorf
96-well half-skirt Microplates	Axygen
Adhesive PCR Film	Abgene
Kapittel 3.9	
LightCycler®480 multiwell plate 96	Roche
Biomek®3000 Robot	Beckman Coulter
Forsglingsfolie	Roche
LightCycler®480 Instrument I	Roche
LightCycler480® Software version 1.5	Roche
Allegra™ 25R centrifuge	Beckman Coulter
PCR strip of 8 tubes	Sarstedt
Kapittel 3.10	
JMP	SAS
Graphpad prism 5.0	Graphpad Software

75.

76.

77. Vedlegg I: Buffere

Mikrosomalbuffer (opparbeiding av lever)

Homogeniseringsbuffer u/glyserol

Glyserol 20%
EDTA 1mM

Coatingbuffer (CYP1A)

Karbonat-bikarbonatbuffer 10 kapsler/l

78.

TTBS (CYP1A)

Tris-buffer, pH 8,5 20mM
NaCl 0,5M
Tween-20 0,0005%

79.

Blokkeringsløsning (CYP1A)

TTBS
BSA 1%

Antistoffbuffer (CYP1A)

TTBS
BSA 0,1%

80.

81. Utfellingsbuffer (RNA)

82. dinatriumhydrogencitrat 21,05 g

83. Natriumklorid 7,01g

84. Nukleasefritt vann 100 ml

85.

86.

87. Vedlegg J: Software og utstyr

Utstyr/ Software	Produsent
Kapittel 3.1:	
CXR500 Dry Shipper kryoshipper	Thaylor-Wharton
Kapittel 3.3	
Potter-Elverheim homogenisator	
Biofuge 28 RS	Heraeus
Sorvall RC-6	Kendro
Kapittel 3.4	
96 brønns mikroplate	Sarstedt
Thermomax microplatereader	Molecular Devices Corp.
SOFTmax v2.32 1992	Molecular Devices Corp.
Kapittel 3.5	
Maxisorp 96 brønns mikorplate	Nunc
Skanswasher 300	Skatron Instruments
Thermomax microplatereader	Molecular Devices Corp.
SOFTmax v2.32 1992	Molecular Devices Corp.
Kapittel 3.6	
Agilent Bioanalyser 2100	Agilent Technologies
Agilent bioanalyser 2100 Expert Software	Agilent Technologies
Biofuge pico	Kendro Laboratory products
Eppendorf Centrifuge 5415R	Eppendorf
Keramiske zirconium oksid perler til homogenisering	Bertin technologies
Homogeniseringsrør	Nunc
Heraeus Fresco 21 Centrifuge	Thermo electron corporation
Linsepapir	Watman
nandrop 2000 software	thermo scientific
Precellys24homogenizer	Bertin technologies

QBT 2 varmeblokk	Grant instruments
Thermo Scientific Nanodrop®ND-1000	NanoDrop Technologies
Vortekser	IKA Works
Kapittel 3.7	
Agilent Bioanalyser 2100	Agilent Technologies
Agilent bioanalyser 2100 Expert Software	Agilent Technologies
Vortekser	IKA Works
3.8	
PCR 8-strip tubes	Eppendorf
Eppendorf Centrifuge 5415R	Eppendorf
QBT2 varmeblokk	Grant instruments
Mastercycler epigradient S	Eppendorf
96-well half-skirt Microplates	Axygen
Adhesive PCR Film	Abgene
3.9	
LightCycler®480 multiwell plate 96	Roche
Biomek®3000 Robot	Beckman Coulter
Forseglingsfolie	Roche
LightCycler®480 Instrument I	Roche
LightCycler480® Software version 1.5	Roche
Allegra™ 25R centrifuge	Beckman Coulter
PCR strip of 8 tubes	Sarstedt