



Naturhistoriska
riksmuseet

RAPPORT

Datum
2016-12-31

Dnr 1(11)
4.1-33-2015, 4.1-728-2015
(NRM). SLU.aqua.2015.5.1-
188 (SLU)

Centrum för genetisk identifiering Fisk, kräftor och musslor som eDNA – metod och fältprover



Naturhistoriska riksmuseet

Postadress:
Box 50007
104 05 Stockholm

Besöksadress:
Frescativägen 40
114 18 Stockholm

Telefon: 08-519 540 00
Telefax: 08-519 540 85
registrator@nrm.se

Centrum för genetisk identifiering vid Naturhistoriska riksmuseet är en uppdragsfinansierad verksamhet som erbjuder myndigheter och organisationer hjälp med genetiska analyser av biologiskt material.

Uppdraget

Centrum för genetisk identifiering (CGI) har 2015-2016 fått i uppdrag av SLU-aqua att DNA-analysa och vattenprover.

Redovisning av arbetsmetod

Protokoll för filtrering/pelletering av vattenprover

Tre metoder har testats för filtrering/pelletering av prover. Dessa är Durapore-filter (med olika porstorlekar), PALL-filter som ingår i MoBio Powerwater-kit och fällning av DNA enligt (Thomsen *et al.*, 2012). Durapore-filter är tillverkade av PVDF (polyvinyliden flourid) med diameter 47 mm och porstorlekar 0,22 μm , 0,45 μm och 0,65 μm . PALL-filter är tillverkade av glasfiber med diameter 47 mm och porstorlek 0,45 μm .

Filtrering har skett med vattensug för vakuumfiltrering. Vid filtrering med Durapore-filter har en filtreringsanordning av glas använts. Denna har steriliserats med klorin 1:10 och sköljts med EtOH mellan prover för att undvika kors-kontaminering. För filtrering med PALL-filter har engångsmaterial av plast som ingår i MoBio-kitet använts. Efter filtrering har filter bevarats i -20°C i eppendorf-rör innan extraktion. Volym vatten som har filtrerats har varit 1000 ml eller 500 ml förutom när 0,22 μm filter har använts. För dessa filter har endast 100-250 ml gått att filtrera. Dessa prover (0,22 μm) har inte analyserats vidare.

Pelletering av prover har gjorts med centrifugering (30 min 5000g) i 3x15 ml volymer.

För metodutveckling har två olika provtyper analyserats. Provtyp 1 är vattenprover där provtagning skett 2 h 20 min efter att samtliga arter (fisk, kräfta och musslor) lagts i akvariet. Protyp 2 är vattenprover där provtagning skett 5 dagar efter att samtliga arter (fisk, kräfta och musslor) lagts i akvariet.

Protokoll för DNA-extraktion

Två metoder har testats för DNA-extraktion, Qiagen DNeasy[®] & Tissue kit och MoBio Powerwater[®] kit.

Protokoll för Qiagen DNeasy[®] & Tissue kit (enligt tillverkarens instruktioner med vissa modifikationer)

1. Tillsätt 360 μl buffer ATL och 40 μl proteinas K till eppendorf-för med filter
2. Inkubera ON vid 56°C
3. Tillsätt 400 μl buffer AL, vortex
4. Tillsätt 400 μl 99% EtOH, vortex
5. Tillsätt 600 μl av lösningen från punkt 4 till filterkolonn och centrifugera 1 min i 8000 rpm
6. Tillsätt resterande 600 μl och centrifugera
7. Tvätta med 500 μl buffer AW1, centrifugera 1 min i 8000 rpm

8. Tvätta med 500 µl buffer AW2, centrifugera 3 min i 14 000 rpm
9. Eluera i 200 µl buffer AE

Protokoll för MoBio Powerwater[®] kit. (enligt tillverkarens instruktioner)

1. Använd förberedda rör med kulor. Lägg i filter och 1 ml buffer PW1.
2. Skaka i max hastighet i 5 min
3. Centrifugera 1 min i 4000 g
4. Överför supernatant (ca 600 µl) till ett nytt rör och centrifugera 1 min i 13 000 g
5. Överför supernatant till nytt rör och tillsätt 200 µl buffer PW2, mixa
6. Inkubera 5 min i 4°C
7. Centrifugera 1 min i 13 000 g
8. Överför supernatant till nytt rör och tillsätt 650 µl buffer PW3, mixa
9. Tillsätt till filterkolonn och centrifugera 1min i 13 000 g
10. Tvätta med 650 µl buffer PW4 och centrifugera 1min i 13 000 g
11. Tvätta med 650 µl buffer PW5 och centrifugera 1min i 13 000 g
12. Flytta filterkolonn till nytt rör och tillsätt 100 µl buffer PW6 och centrifugera 1min i 13 000 g

Protokoll för att ta bort inhibitorer

PCR-reaktioner kan inhiberas av humusämnen i vattenprover. Tre metoder har testats. Dessa är tillsats av BSA (bovine serume albumine) till PCR-reaktioner, Onestep[™] PCR inhibitor removal från ZYMO research och Powerclean[®] Pro DNA Clean-Up från MoBio. Tillsats av BSA till PCR-reaktioner har testats med hög (0,8 µg/µl) och låg koncentration (0,01 µg/µl).

Protokoll för Onestep[™] PCR inhibitor removal från ZYMO research

1. Förbered spinkolonn genom att vrida bort botten och skruva av locket
2. Sätt kolonnen i ett rör och centrifugera 3 min i 8000 g
3. Sätt kolonnen i ett nytt rör och applicera DNA-extrakt till matrix
4. Centrifugera 1 min 8000 g

Protokoll för Powerclean[®] Pro DNA Clean-Up från MoBio

1. Tillsätt 50 µl buffer DC1 till 100 µl DNA-extrakt, vortex
2. Tillsätt 50 µl buffer DC2, vortex
3. Centrifugera 2 min 13 000 g
4. Ta supernatant till nytt rör och tillsätt 400 µl buffer DC3, vortex
5. Applicera 600 µl från punkt 4 till spinkolonn och centrifugera 1 min i 10 000 g
6. Tvätta med 500 µl buffer DC4 och centrifugera 30 s i 10 000 g
7. Repetera punkt 6
8. Torka spinfilter genom centrifugering 2 min i maxfart
9. Flytta spinkolonn till nytt rör och applicera 100 µl buffer DC5, centrifugera 1 min i 10 000 g

Protokoll för PCR

Olika enzysystem har testats. Dessa är Phusion[™] High-Fidelity DNA polymerase, Amplitaq[™] DNA polymerase och Omni Klentaq[®] DNA polymerase.

PCR-protokoll för en reaktion med Phusion™ High-Fidelity DNA polymerase

Master Mix	10 µl
Primer (10 µM)	1 µl
Primer (10 µM)	1 µl
Ev. BSA	x µl
H ₂ O	Till 19 µl
Templat	1 µl

PCR-protokoll för en reaktion med Amplitaq™ DNA polymerase

10xBuffer	2 µl
dNTP (10 mM)	0,25 µl
Primer (10 µM)	0,5 µl
Primer (10 µM)	0,5 µl
Amplitaq	0,125 µl
Ev. BSA	x µl
H ₂ O	Till 19 µl
Templat	1 µl

PCR-protokoll för en reaktion med Omni Klentaq® DNA polymerase

10xBuffer	2,5 µl
dNTP (10 mM)	0,5 µl
Primer (10 µM)	0,5 µl
Primer (10 µM)	0,5 µl
BSA (10 mg/ µl)	2 µl
Klentaq	0,25 µl
H ₂ O	17,75 µl
Templat	1 µl

PCR-program

För Phusion™ High-Fidelity DNA polymerase

1. Initial denaturering	98°C	30 s
2. Denaturering	98°C	10 s
3. Annealing	60°C (-1°C/cykel)	10 s
4. Extension	72°C	30 s/kb
5. Till steg 2 x 5		
6. Denaturering	98°C	10 s
7. Annealing	55°C	10 s
8. Extension	72°C	30 s/kb
9. Till steg 6 x 35		
10. Extension	72°C	2 min

För Amplitaq™ DNA polymerase

1. Initial denaturering	95°C	3 min
2. Denaturering	94°C	30 s

3. Annealing	60°C (-1°C/cykel)	45 s
4. Extension	72°C	1 min/kb
5. Till steg 2 x 5		
6. Denaturering	94°C	30 s
7. Annealing	55°C	45 s
8. Extension	72°C	1 min/kb
9. Till steg 6 x 35		
10. Extension	72°C	5 min

För Omni Klentaq[®] DNA polymerase

1. Initial denaturering	94°C	3 min
2. Denaturering	94°C	40 s
3. Annealing	60°C (-1°C/cykel)	45 s
4. Extension	68°C	2 min/kb
5. Till steg 2 x 5		
6. Denaturering	94°C	30 s
7. Annealing	55°C	45 s
8. Extension	68°C	2 min/kb
9. Till steg 6 x 35		
10. Extension	72°C	5 min

Protokoll för qPCR

Tre olika enzymssystem har testats. Dessa är DyNAmo[™] Flash SYBR[®] Green qPCR kit, Sso Advanced[™] Universal SYBR[®] Green Supermix och SsoAdvanced-IT[™] Universal SYBR[®] Green Supermix.

Protokoll för en reaktion med DyNAmo[™] Flash SYBR[®] Green qPCR kit

MasterMix	10 µl
Primer (10µM)	1 µl
Primer (10µM)	1 µl
H ₂ O	6 µl
Templat	1 µl

Protokoll för en reaktion med SsoAdvanced[™] Universal SYBR[®] Green Supermix och SsoAdvanced-IT[™] Universal SYBR[®] Green Supermix

MasterMix	5 µl
Primer (10µM)	1 µl
Primer (10µM)	1 µl
H ₂ O	2 µl
Templat	1 µl

PCR-program

För DyNAmo[™] Flash SYBR[®] Green qPCR kit

1. Initial denaturering	95°C	7 min
2. Denaturering	95°C	10 s
3. Annealing	60°C	15 s
4. Till steg 2 x 39		
5. Smältkurva	60-98°C	2 s/0,5°C steg

För SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix och SsoAdvanced-IT™ Universal SYBR® Green Supermix

1. Initial denaturering	98°C	2 min
2. Denaturering	98°C	10 s
3. Annealing	60°C	30 s
4. Till steg 2 x 39		
5. Smältkurva	65-95°C	2 s/0,5°C steg

Primers

Primers har designats med Primer3 (<http://primer3.ut.ee>) (Untergasser *et al.*, 2012) och finns listade i tabell 4. Specificitet av primers har testats med verktyget BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) mot databasen nr/nt (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Primers för fiskar, 12S har hämtats från litteraturen (Kelly *et al.*, 2014).

Resultatredovisning

DNA extraktion

För alla tester gav extraktionskitet från Qiagen högre utbyte och renare extrakt. Alla fortsatta analyser är gjorda med Qiagen DNeasy® Blood & Tissue kit.

Det var små skillnader i mängden DNA som kunde extraheras med de olika filtertyperna (tab. 1). Variansen var högre med Durapore-filer. Med pelletering kunde endast små mängder DNA extraheras och dessa prover analyserades ej vidare.

Tabell 1. Resultat från analys av mängd DNA beroende på filtertyp.

Provtyp	Volym (ml)	Filtertyp	Mängd (µg)
1	1000	PALL	3140±226
		Durapore	2910±551
2	500	PALL	11200±1345
		Durapore	12640±3708

Inhibitorer

Tillsättning av BSA upp till 0,8 µg/µl hade positiv effekt på alla PCR-reaktioner. Tillsats av BSA rekommenderas särskilt för prover med humusämnen. Onestep™ PCR inhibitor removal från ZYMO research hade viss positiv effekt. Powerclean® Pro DNA Clean-Up från MoBio hade ingen eller liten effekt.

PCR enzystem

Av de testade enzystemen fungerade Amplitaq™ DNA polymerase något sämre än Omni Klentaq® DNA polymerase och Phusion™ High-Fidelity DNA polymerase. Kombinationen av Omni Klentaq® DNA polymerase med BSA fungerade bäst.

Resultat från test av filtertyp och primrar

DNA extraherat med Qiagen DNeasy® Blood & Tissue kit och amplifierat med Phusion™ High-Fidelity DNA polymerase testades med primrar för fisk, kräftor och musslor för de två olika filtertyperna. För DNA-extrakt från PALL-filter lyckades inga amplifieringar. För DNA-extrakt från Durapore-filter lyckades amplifiering för alla målgrupper för vattenprover tagna 5 dagar efter introduktion av organismer i akvariet. För vattenprover tagna efter 2 h 20 min var amplifieringar generellt svagare och lyckades inte för kräftor (tab. 2).

Tabell 2. Resultat från test av filtertyp och primrar. +-tecken anger styrkan på amplifiering.

Filtertyp	Provtyp	Målgrupp	Amplifiering
PALL	1	Fisk	-
		Kräftor	-
		Musslor	-
	2	Fisk	-
		Kräftor	-
		Musslor	-
Durapore	1	Fisk	++
		Kräftor	-
		Musslor	+
	2	Fisk	+++
		Kräftor	+
		Musslor	++

qPCR enzystem

De testade enzystemen (DyNAmo™ Flash SYBR® Green qPCR kit, SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix och SsoAdvanced-IT™ Universal SYBR® Green Supermix) fungerade utan större skillnader mellan system. Alla qPCR-reaktioner är körda på BioRad CFX96 apparat.

Slutsats

Den metod som rekommenderas baserat på erfarenheter från denna undersökning är: Filtrering av vattenprover med Durapore-filter (0,45 µm eller 0,65 µm porstorlek). DNA-extraktion med Qiagen DNeasy® Blood & Tissue kit. PCR-reaktioner med BSA och Omni Klentaq® DNA polymerase eller Phusion™ High-Fidelity DNA polymerase. qPCR-reaktioner med DyNAmo™ Flash SYBR® Green qPCR kit eller SsoAdvanced-IT™ Universal SYBR® Green Supermix.

Fältprover

qPCR

Primers för *Siluris glanis* (Mal) har testats på akvarievatten och har fungerat som markör. Resultat från qPCR-analys av fältprover redovisas i tabell 3.

Sekvensering

Analys från sekvensering av fältprover är inte klar. Ytterligare prover (filterkapslar) kommer att analyseras och resultat från fältprover redovisas tillsammans med resultat från filterkapslar.

DNA-extrakt och resultat lagras hos CGI tills vidare.

Niclas Gyllenstrand
Intendent

Tabell 3. Resultat från qPCR för målorganismer

Lokal	<i>Anguilla anguilla</i>	<i>Astacus astacus</i>	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	<i>Dreissena bugensis</i>	<i>Dreissena polymorpha</i>
<i>Stensjön_1</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Stensjön_2</i>	Negativ	Negativ	Positiv	Negativ	Negativ
<i>Stensjön_3</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Stensjön_4</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Stensjön_5</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Stensjön_6</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Stensjön_7</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Stensjön_8</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Stensjön_9</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Stensjön_10</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Stensjön_11</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Svennevadsån_1</i>	Negativ	Negativ	Positiv	Negativ	Negativ
<i>Svennevadsån_2</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Svennevadsån_3</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Svennevadsån_4</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Svennevadsån_5</i>	Negativ	Negativ	Positiv	Negativ	Negativ
<i>Svennevadsån_6</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Svennevadsån_7</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Svennevadsån_8</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ

<i>Lokal</i>	<i>Anguilla anguilla</i>	<i>Astacus astacus</i>	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	<i>Dreissena bugensis</i>	<i>Dreissena polymorpha</i>
<i>Svennevadsån_10</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Svennevadsån_11</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Svartälven_1</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Svartälven_2</i>	Positiv	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Svartälven_3</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Svartälven_4</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Svartälven_5</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Svartälven_6</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Svartälven_7</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Svartälven_8</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Svartälven_9</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Svartälven_10</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Svartälven_11</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Öresjö_1</i>	Positiv	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Öresjö_2</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Öresjö_3</i>	Negativ	Positiv	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Öresjö_4</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Öresjö_5</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Öresjö_6</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Öresjö_7</i>	Negativ	Positiv	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Öresjö_8</i>	Negativ	Positiv	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Öresjö_9</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Öresjö_10</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Öresjö_11</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Norasjön_1</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Norasjön_2</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Norasjön_3</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Norasjön_4</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Norasjön_5</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Norasjön_6</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Norasjön_7</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Norasjön_8</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Norasjön_9</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Norasjön_10</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Norasjön_11</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Mälaren_1</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Mälaren_2</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Mälaren_3</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Mälaren_4</i>	Positiv	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Mälaren_5</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Mälaren_6</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ

<i>Mälaren_7</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
<i>Mälaren_8</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Positiv
<i>Mälaren_9</i>	Positiv	Negativ	Negativ	Negativ	Positiv
<i>Mälaren_10</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Positiv
<i>Mälaren_11</i>	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ

Referenser

Kelly, R. P., Port, J. A., Yamahara, K. M. and Crowder, L. B. (2014) 'Using Environmental DNA to Census Marine Fishes in a Large Mesocosm', 9(1). doi: 10.1371/journal.pone.0086175.

Thomsen, P. F., Kielgast, J., Iversen, L. L., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, M. T. P., Orlando, L. and Willerslev, E. (2012) 'Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA', *Molecular Ecology*, 21(11), pp. 2565–2573. doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05418.x.

Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M. and Rozen, S. G. (2012) 'Primer3 — new capabilities and interfaces', 40(15), pp. 1–12. doi: 10.1093/nar/gks596.

Tabell 4. Detaljer om primers som använts

<i>Art/grupp</i>	<i>Namn</i>	<i>Sekvens 5'→3'</i>	<i>Metod</i>	<i>Ref.</i>
<i>Ål</i>	Angcytb_FWD	CCTACATGCAAATGGGGCCT	qPCR	Denna studie
	Angcytb_REV	CTCGGGCAATGTGGAGGTAT	qPCR	Denna studie
<i>Mal</i>	SilGlaDloop_L_5	TGCATCCTACCACAATCCGT	qPCR	Denna studie
	SilGlaDloop_R_5	TGCGTGGTTCAGTTATGTCA	qPCR	Denna studie
<i>Vandrarmussla</i>	DPolymorphaCytbF	CAAACGTGCCGTTTTACCCA	qPCR	Denna studie
	DPolymorphaCytbR	CTGGGTCAGCAAATAGATCTGG	qPCR	Denna studie
<i>Quaggamussla</i>	DBugensisCytbF	ACGGGTCTAGAAATCCACT	qPCR	Denna studie
	DBugensisCytbR	TCAGGGTCGCTAAACAAATCA	qPCR	Denna studie
<i>Flodkräfta</i>	AstacusCOIF	TTTTGATTGCTCCCCTTTTC	qPCR	Denna studie
	AstacusCOIR	TCGAAGATACACCTGCCAAG	qPCR	Denna studie
<i>Signalkräfta</i>	PacifastacusCOIF	AAGATTTTGATTACTTCCATTTTCTTT	qPCR	Denna studie
	PacifastacusCOIR	GAAGAAACACCCGCTAAATGA	qPCR	Denna studie
<i>Cyprinider</i>	Karp16SF	GACGAGAAGACCCTTTGGAG	Sekvensering	Denna studie
	Karp16SR	AGGTCATAAACCCCTCGT	Sekvensering	Denna studie
<i>Cyprinider</i>	CypL5	TACAYACCTCHAARCARCG	Sekvensering	Denna studie
	CypR5	GGGTGYTCTACDGGYATRC	Sekvensering	Denna studie
<i>Fisk</i>	Fish12SF	GACTGGGATTAGATACCCC	Sekvensering	Kelly et al 2014
	Fish12SR	CTAGAACAGGCTCCTCTAG	Sekvensering	Kelly et al 2014
<i>Musslor</i>	Mussel16SF	GCATCATGGAGAAGCAAC	Sekvensering	Denna studie
	Mussel16SR	CATAAGCTAGCACTTTGATGC	Sekvensering	Denna studie