

eDNA onderzoek grote modderkruiper.



Colofon

Titel	eDNA onderzoek grote modderkruiper.
Tekst, foto's en samenstelling	K. van Bochove
In opdracht van	Agrifirm Exlan
Naam opdrachtgever	Anton van Zeeland
Rapportnummer	RA2016145-1
Datum oplevering rapport	1 februari 2016
Aantal pagina's	7
Wijze van citeren	van Bochove K. 2016. eDNA onderzoek grote modderkruiper. Rapport RA2016145-1, Datura, Delft.
Laboratorium analist	K. van Bochove



Datura

Gevestigd te: Fuutlaan 21
2623 MX, Delft
Nederland

Postadres laboratorium: t.a.v. Datura (NCB)
Sylviusweg 72
2333 BE, Leiden
Nederland

0031(0)629455328
www.datura.nl
keesvanbochove@datura.nl

Inhoudsopgave

1. Doelstelling.....	4
2. Methode.....	4
1.1 Bemonstering.....	4
1.2 Laboratoriumanalyse.....	4
1.3 Kwaliteitswaarborging.....	6
3. Resultaten.....	7

1. Doelstelling

Analysen van een watermonster op aanwezigheid van eDNA van grote modderkruiper (*Misgurnus fossilis*) in opdracht van Agrifirm Exlan.

2. Methode

1.1 Bemonstering

De bemonstering is uitgevoerd door Agrifirm Exlan.

1.2 Laboratoriumanalyse

De eDNA monsters zijn geanalyseerd op de aanwezigheid van eDNA van grote modderkruiper. Het analyseren van een eDNA monster vindt plaats in drie stappen. Eerst wordt het DNA uit een monster geconcentreerd en gezuiverd. Vervolgens wordt eDNA gedetecteerd met behulp van een real-time quantitative PCR. Tenslotte wordt een controle analyse uitgevoerd om te testen of eDNA detectie in een monster eventueel geïnhibeerd wordt door storende stoffen.

1. Het monster wordt geconcentreerd in een pellet door 35 minuten te centrifugeren (7830g, 6 °C). Vervolgens wordt het DNA in de pellet gezuiverd met behulp van de Qiagen Dneasy Blood & Tissue Kit. Storende stoffen als humuszuren kunnen detectie van het eDNA inhiberen wat kan leiden tot vals negatief resultaat. Met deze stap worden dergelijke inhiberende stoffen zo veel mogelijk verwijderd.
2. Detectie van eDNA vindt plaats door middel van een real-time quantitative PCR. Het principe achter deze techniek is dat een specifiek deel van het DNA zeer vaak vermenigvuldigd (geamplificeerd) wordt. Datura maakt gebruik van soort-specifieke primers die uitsluitend DNA van de doelsoort vermenigvuldigen. Datura gebruikt bovendien een soort-specifieke probe (een soort primer) die uitsluitend binden aan eDNA van de doelsoort. Binding van de probe aan het vermenigvuldigde eDNA van de doelsoort resulteert in een fluorescent signaal. Dit signaal wordt gedetecteerd met behulp van een qPCR platform (CFX96 Touch™ van Bio-Rad). De qPCR detectie wordt uitgevoerd met 12 replica's. Het aantal positieve replica's is een indicatie voor de concentratie eDNA. Het is echter (vooralsnog) niet mogelijk om op basis van de concentratie van eDNA de populatiedichtheid te bepalen. De qPCR detectie wordt uitgevoerd met de TaqMan® Environmental Mastermix 2.0 (Life Technologies®).

3. Tenslotte wordt er altijd een controle uitgevoerd om na te gaan of eDNA detectie in een monster geïnhibeerd wordt. Dit wordt gedaan door een bekende hoeveelheid van een fragment artificieel DNA toe te voegen. Vervolgens wordt de concentratie van dit fragment artificieel DNA gemeten. Dit wordt zowel gedaan in een reactie waar een hoeveelheid monster aan toegevoegd wordt, als in een reactie waar geen monster aan toegevoegd wordt. Als DNA detectie in een monster geïnhibeerd wordt, dan is de gemeten concentratie artificieel DNA in de reactie waarin monster toegevoegd wordt lager ten opzichte van de reactie waaraan geen artificieel DNA is toegevoegd. Met name in zuur water, waarin veel organische deeltjes aanwezig zijn kan inhibitie optreden. In dergelijk geval wordt een extra zuivering stap uitgevoerd of wordt het monster verdund. Vervolgens wordt de analyse herhaald vanaf stap 2.

1.3 Kwaliteitswaarborging

Wat maakt eDNA detectie van Datura gevoelig, specifiek en betrouwbaar?

1. De qPCR detectie wordt uitgevoerd met behulp van **12 replica's**;
2. Gebruik van een **zeer korte merker** van maximaal 100 baseparen;
3. Vakkundig ontwikkelde, zeer **specifieke primers**. De primers zijn met behulp van software ontwikkeld, en vervolgens in het laboratorium getest met behulp van weefselmonsters en eDNA monsters;
4. Een **qPCR** detectie met behulp van een zeer specifieke **probe**;
5. Werken met een **2-staps** qPCR protocol;
6. Gescheiden **pre- en post PCR laboratorium**, waarin een **unidirectionele workflow** gehanteerd wordt;
7. In iedere analyse worden **controle analyses** uitgevoerd (zogenaamde standaard, negatieve controle en een interne controle om te testen of er sprake is van inhibitie);
8. Ter **validatie** van de ontwikkelde eDNA detectietechniek worden er met regelmaat monsters genomen op locaties waar het voorkomen van de doelsoorten uitgesloten is. Deze monsters mogen uiteraard niet leiden tot een positief signaal. Met behulp van deze monsters kan dus geverifieerd worden dat er geen contaminatie plaats vindt en of de detectie techniek soort-specifiek is.
9. Bij de inzet van nieuw ontwikkelde assays worden qPCR producten standaard **gesequenced** om te valideren of het gedetecteerde eDNA inderdaad DNA van de doelsoort betreft.

3. Resultaten

Geen van de twee monsters (676 en 678) bevatte eDNA van grote modderkruiper.

Er is geen amplificatie waargenomen in de negatieve controle reacties waar geen monster aangevoegd is. De positieve controle reacties waar DNA van weefsel van grote modderkruiper aan toegevoegd is werden naar verwachting geamplificeerd. Dit bewijst dat de analyse juist is uitgevoerd.

Humuszuren kunnen een qPCR reactie inhiberen wat kan leiden tot vals positief resultaat. Daarom wordt altijd een interne controle mee geanalyseerd om vast te kunnen stellen of er sprake is van inhibitie. Er werd geen significante afwijking gevonden in de Cq-waarde van de interne controles waar monster aan toegevoegd ten opzichte van de reacties waar geen monster aan toegevoegd is. Dit laat zien dat er geen noemenswaardige inhibitie heeft opgetreden.

Samenvattend, de eDNA analyses zijn met succes uitgevoerd en in geen van de twee monsters is eDNA van grote modderkruiper aangetoont.

Tabel 2. Resultaten van eDNA analyse.

Monsternummer	Aantal positieve reacties grote modderkruiper	Locatie
669	0/12	Haaften
673	0/12	Haaften