

Titel: Teknisk vejledning for indsamling af marine vandprøver og analyse for 'environmental DNA' (eDNA)			
Dokumenttype: Teknisk anvisning	TA. nr.: X01	Version: 1	Oprettet: 01.11.2015
Forfattere: - Steen W.Knudsen, Amphi Consult ApS/Afdeling for Evolutionary Genomics, Statens Naturhistoriske Museum, Københavns Universitet - Martin Hesselsøe, Amphi Consult Aps - Peter Rask Møller, Afdeling for Evolutionary Genomics, Statens Naturhistoriske Museum, Københavns Universitet - Jesper Andersen, NIVA Danmark	Gyldig fra: 01.05.2016		
	Sider: 16		
	Sidst ændret: 08.maj.2017		
TA henvisninger	V07 – N12 – A02		

0 Indhold

1 Indledning	2
2 Metode	2
Del I. Indsamling af vand	3
Del II. Ekstraktion af eDNA fra det indsamlede vand	8
Del III. In vivo detektering af eDNA ved kvantitativ PCR	8
2.1 Tid, sted og periode	10
2.2 Udstyr	11
2.3 Procedure	17
2.4 Tjekliste	21
2.5 Vedligehold af instrumenter	22
2.6 Særlige forholdsregler - faldgruber	23
3 Databehandling	23
3.1 Beregninger	23
3.2 Data og koder	24
4 Kvalitetssikring	27
4.1 Kvalitetssikring af metode	27
4.2 Kvalitetssikring af data og dataaflevering	27
5 Referencer	27
6 Oversigt over versionsændringer	30

1 Indledning

Denne tekniske anvisning er udarbejdet for indsamling af marine vandprøver med henblik på detektering af miljø-DNA ('environmental DNA' eller 'eDNA'), som beskrevet i flere aktuelle studier (f.eks. Ficetola et al., 2008; Goldberg et al., 2011; Olson et al., 2012; Thomsen et al., 2012a,b; Takahara et al., 2012; Pilliod et al., 2013; Taberlet et al., 2012, 2013; Deiner et al., 2015; Sigsgaard et al., 2015).

Den tekniske anvisning forudsætter for selve eDNA-analysen at der forudgående er designet artsspecifikke primere og prober – gennem *in silico* design (dvs. design gennem analyse af nukleotidsekvens data) – for den pågældende art, der ønskes detekteret og at eDNA i den indsamlede vandprøve forekommer i tilstrækkeligt høje koncentrationer til at kunne detekteres. Anvisningen er under stadig udvikling ved afdelingen for Evolutionary Genomics ved Statens Naturhistoriske Museum, Københavns Universitet, og bør derfor betragtes som foreløbig. Det skyldes bl.a. at det ikke er endeligt fastlagt uafklaret hvorledes eDNA bedst kan indsamles, opbevares og detekteres, da det i høj grad afhænger af både vandkvalitet, indsamling og opbevaring af vandprøve, ekstraktion af DNA og brugerens erfaring med både taxonomi og bioinformatik (jf. Deiner et al., 2015; Renshaw et al., 2015; Thomsen og Willerslev, 2015; Taberlet et al., 2012; Sigsgaard et al., 2015). Erfaringer fra de først års overvågning vil således medvirke til en løbende udvikling af anvisningen.

Denne anvisning bør som udgangspunkt kun følges såfremt indledende valideringstest (også kaldet *in vitro* test) er blevet udført for de benyttede primer- og probe systemer på DNA ekstraheret fra væv fra både den eftersøgte art, samt på DNA ekstraheret fra væv fra tætbeslægtede arter. Indledende *in vitro* test er påkrævet for ikke at risikere at fejlagtige konklusioner baseres på grundlag af falske positive signaler fra analysen.

2 Metode

Fremgangsmåden er delt i tre: (Del I) indsamling af vand, (Del II) ekstraktion af eDNA fra det indsamlede vand og (Del III) detektering af artsspecifik eDNA vha. kvantitative PCR (qPCR). Bemærk at mange studier benytter forskellige metoder for indsamling og ekstraktion af eDNA (jf. Ficetola et al., 2008; Takahara et al., 2012, 2013; Tréguier et al., 2014; Deiner et al., 2015). For at sikre at resultater er sammenlignelige på tværs af prøver, indsamling og arter, er det vigtigt at fremgangsmåden bliver standardiseret fra start.

Indsamling af vand (Del I) og ekstraktion af eDNA fra det indsamlede vand (Del II) kan som udgangspunkt gennemføres allerede nu. Detektering arts-specifik eDNA vha. qPCR (Del III) forudsætter at både forudgående *in silico* design og grundig *in vitro* test er udført.

Del I. Indsamling af vand

Udbyttet af eDNA er umiddelbart koblet med mængden af indsamlet vand – jo mere vand, jo mere eDNA (Thomsen et al., 2012a; Taberlet et al., 2012; Goldberg et al., 2015). Ved filtrering af vand anbefales det derfor, at så meget vand som muligt filtreres igennem en filterenhed. Eftersom både Amphi Consult og Statens Naturhistoriske Museum har bedst erfaring med filtrering, bygger denne anvisning udelukkende på filtrering.

Inden indsamling af vandprøver indledes, skal selve vandindsamlingen tilrettelægges hensigtsmæssigt for at opnå maksimalt eDNA udbytte i de efterfølgende trin. Indsamlingen af vandprøver skal foretages sen sommer/tidligt efterår, og skal de efterfølgende år finde sted så tæt som muligt på de forrige års indsamlingsdato, for at vandprøver kan sammenholdes over årrækker. Derudover skal vandindsamlingen samtidig finde sted i et tidsrum, der mest muligt udelukker risiko for at store koncentrationer af alger eller opslemmede partikler i vandsøjlen (eks. vis under algeopblomstringsperioder) kan blokere filteret, og forhindre at det nødvendige 1,5 L volumen vand per filter-enhed bliver filtreret.

Vandindsamling skal også tilrettelægges således at en evt. optælling eller vurdering af størrelsen af bestanden af invasive arter gennem fiskeri, foretages på samme dato eller på datoer så tæt ved hinanden som muligt. Der må maksimalt være en uges tidsrum imellem datoen for vandprøvetagningen og datoen for fiskeri efter den invasive art.

Vandprøven skal indhentes fra midten af vandsøjlen –dvs. halvvejs mellem bund og overflade, såfremt vandsøjlen er opblandet. Dog ikke tættere på bunden end 1 m over bunden. Er vandsøjlen lagdelt (pga. termoklin eller haloklin) skal der indsamles to vandprøver. En prøve over lagdelingen og en prøve under. Hver prøve fra midten af hver lagdeling.

Hvis lagdelingen af vandsøjlen bevirker at vandprøven fra det nederste lag skal foretages i en dybde der er < 1 m over bunden, skal der ikke indsamles vandprøver fra denne del af vandsøjlen. I stedet indsamles der kun vandprøver over lagdelingen fra midten af det øverste lag.

Ved vandprøveindsamling i fbm. transekter gående ud fra kysten, skal vandprøverne indsamles i den del af transektet, der er dybest og længst væk fra kysten, og stadig være over mere end 1 m over bunden.

Prøver må ikke samles ind fra dybder der er mindre end 1 m over bunden, da det kan bevirke at det sporede eDNA i stedet stammer fra bunden og ikke fra hvad der er opblandet i vandsøjlen.

Er det ikke muligt at samle ind både over og under et springlag, men kun fra enten over eller under, må vandprøveindsamlingen ske i det springlag hvor de eftersøgte invasive arter forventes at være mest talrige. Baseret på at eDNA fra bundlevende dyr nok forefindes under et springlag, mens pelagiske organismer nok kan forventes at have afkastet større eDNA mængder over et springlag.

En nedprioritering af to filtre per lokalitet for både over og under springlag til kun at omfatte en enkelt vandprøve enten over eller under, forudsætter derfor at en afvejelse er gjort forinden om hvilke organismer der ønskes sporet. Ønskes det hovedsagligt at spore eDNA fra pelagiske organismer, er det mest fordelagtigt at vandindsamlingen sker over springlaget. Medens ønskes der hovedsagligt at spore bundlevende organismer, skal vandindsamlingen gøres 1 m over bunden under springlaget.

Når vandindsamlingen er påbegyndt for en sæson skal alle prøver tages på tilsvarende facon. Det betyder, at besluttes det f.eks. at der kun indsamles prøver under et springlag, så skal alle efterfølgende prøver ved lokaliteter med springlag alle tages under et springlag.

Idet den nuværende liste (maj-2017) over 21 marine invasive arter der ønskes sporet med eDNA hovedsagligt omfatter pelagiske arter (14 pelagiske og 7 bundlevende), vil det være fordelagtigt at foretage alle vandindsamlinger ved lokaliteter med springlag på dybder over springlaget, såfremt der kun er mulighed for at indsamle én vandprøve per lokalitet. Men det skal holdes for øje at kun én enkelt vandprøve per lokalitet hvor der forekommer springlag må betragtes som værende suboptimalt i hht. sporing af de eftersøgte invasive arters eDNA.

Filterenheden skal være steril inert og have en effektiv porestørrelse på 0.2–0.5 μm (se også Goldberg et al. 2011; Thomsen et al., 2012b). Filtret placeres i en integreret filterholder, som tillader læk-tæt samling med tryksat filtreringsenhed (f.eks. Amphiltrator, se www.amphi-consult.dk) ved et effektivt overtryk på minimum 1 bar atm (101 kPa), men gerne op imod 3 bar (304 kPa). Indsamles vandprøven fra en større beholder, er det nødvendigt at fjerne potentielt kontaminerende rester af eDNA fra evt. tidligere vandprøvetagning. En større beholder, som f. eks. en vand-beholder i en Rosette vandhenter, skal derfor gennemskylles med vand fra den nye indsamlingslokalitet, så vand fra den forrige indsamlingslokalitet ikke kan lede til senere falsk sporing af eDNA. En vandbeholder skal derfor inden prøvetagning gennemskylles med minimum 10 gange det volumen vand, som vandhenteren kan indeholde. Derved sikres det at filteret kun indsamler eDNA fra den pågældende indsamlingslokalitet. For en Rosette-vandhenter vil en sådan gennemskylning automatisk finde sted når vandhenteren i åben tilstand sænkes ned til den ønskede vanddybde.

Indsamles prøven med vandslange skal vandslangen først gennemskyllles. Der skal gennemskyllles med minimum 10 gange det volumen vand, der kan være i slangen, inden selve vandprøven udtages. Vandslangen gennemskyllles med havvand fra den indsamlingslokalitet hvorfra vandprøven skal indsamles, inden selve vandprøven aftages. Dette sikrer at vandslangen kun indeholder vand fra netop den pågældende indsamlingslokalitet hvor prøven skal indsamles fra. Derved undgås kontamination med eDNA fra tidligere indsamlingslokaliteter.

For den efterfølgende filtrering skal et 'Sterivex' filter benyttes sammen med en Amphiltrator med dertilhørende engangsplastic, der forhindrer krydskonatmination. Studier i filtrering og efterfølgende opbevaring udført ved Københavns Universitet peger på at 'Sterivex' filterer er den letteste løsning, der samtidig sikrer et højt udbytte af eDNA i filtratet og den efterfølgende ekstraktion (Spens et al., 2016). Amphi Consults Amphiltrator eDNA indsamlingskit bygger netop på 'Sterivex' filter teknikken, og er inkluderet i prøveindsamlingskittet (se mere på www.amphi-consult.dk). Med Amphi Consults Amphiltrator følger også instruktion og vedledning i prøvetagning, samt anbefaling af pumpe eller kompressorer, der kan kobles til Amphiltrator-kittet. En almindelig cykelpumpe kan sagtens bruges for at lave overtryk.

Indsamlet vand, hentet med f.eks. en Rosette vandhenter, skal filtreres straks efter vandet er indsamlet. eDNA i vandprøver vil henfalde eksponentielt med en halveringstid på under 12 timer (Sigsgaard et al., 2016). Filtrering af vandprøven skal derfor ske indenfor 1 time efter vandprøven er indsamlet. Øjeblikkelig filtrering på indsamlingslokalitet gør også efterfølgende transport mere enkel, da et 'Sterivex'-filter ikke optager lige så meget plads som flere liter vand gør.

Den indsamlede vandprøve må ikke opvarmes i tidsrummet, der følger fra vandet er indsamlet til den bliver filtreret, da temperaturstigning kan medvirke til at nedbryde det indsamlede eDNA (Strickler et al., 2015; Tsuji et al., 2017). Kan filtrationen ikke finde sted straks efter indsamling, må vandprøven holdes kold, indtil den skal filtreres indenfor det 1 times maksimale tidsrum vandprøven må henstå. Et køleskab kan sagtens bruges til at holde vandprøven kold, indtil filtrering kan påbegyndes indenfor de maksimale 1 times interval, der må gå fra prøven er indsamlet til filtreringen kan finde sted.

Som minimum skal der filtreres 1,5 liter vand fra indsamlingslokaliteten igennem hvert ét enkelt 'Sterivex'-filter. Men i tilfælde af voldsomme koncentrationer af alger eller andre opslemmede partikler i vandprøven kan 'Sterivex'-filteret blive blokeret efter mindre vandvolumen er forsøgt filtreret. I såfald noteres det vandvolumen som succesfuldt blev forceret igennem 'Sterivex'-filteret. En vandbeholder på siden af Amphiltratoren opsam-

ler det filtrerede vand, og gør det let at aflæse hvor stort et volumen vand der er blevet filtreret.

Med henblik på at der for hver indsamlingslokalitet skal indsamles minimum 3 indsamlingsreplikater, skal der altså påregnes at minimum 4,5 L vand er nødvendig for filtrering gennem 3 'Sterivex'-filtre, med 1,5 L vand per filter. Er der lagdeling i vandsøjlen skal der som udgangspunkt indsamles 2 gange 3 indsamlingsreplikater. Der skal således indsamles 3 replikater fra under lagdelingen, og 3 replikater fra over lagdelingen. Indsamles der kun 3 replikater fra indsamlingslokaliteten på trods af der er lagdeling i vandsøjlen, skal alle 3 filtre være baseret på vand hentet fra samme dybde. Det er ikke muligt at sammenholde indsamlingsreplikater indsamlet under lagdelingen med indsamlingsreplikater indsamlet over lagdelingen.

Efter endt filtrering med et Sterivex-filter, skal resterende vand inde i 'Sterivex'-filteret presses ud. Dette kan gøres ved at en tom 60-100 mL håndsprøjte, der fyldt med luft kobles på 'Sterivex'-filteret, og dermed kan resterende vand presses ud. Indsamlingsprotokollen vedlagt Amphiltrator filtreringskittet beskriver denne del af protokollen med billeder og anvisninger. Filteret må IKKE indfryses med restvand i. Bemærk at det er vanskeligt at tømme et 'Sterivex'-filter fuldstændig for rest-vand og et mindre volumen rest vand (mindre end en tiende-del af 'Sterivex'-filterets totale volumen) vil være forventeligt.

Det endelige filter med filtrat og tørt for vand, lukkes derefter med de medfølgende 'caps', i begge ender. Med Amphiltrator filtreringskittet følger 'caps' for hvert eneste 'Sterivex'-filter.

Det lukkede 'Sterivex'-filter puttes derpå i en zip-lock pose, med unikt indsamlingsnummer noteret på zip-lock posens hvide skrivefelt. Og posen med filteret indfryses straks. Enten i en almindelig fryser (<-15°C) eller ved opbevaring i en flamingo-kasse med tøris.

Der benyttes én zip-lock pose per hvert enkelt 'Sterivex'-filter. Ikke flere filtre i samme pose.

For at kunne sammenligne filtrerede vandprøver senerehen, skal det noteres hvor langt et tidsrum der gik fra vandprøven blev indsamlet, til den færdige filtrerede prøve blev lagt på is.

Notater om indsamlingstidspunkt, tidsrum fra vandindsamling til endt filtrering og indfrysning, prøvetager, prøvetagningslokalitet og filterenhed noteres på det notat-ark der er vedlagt denne tekniske anvisning.

Et rekvisitionsskema (eller prøvetagningskema) er indsat i denne tekniske anvisning (tabel 2), og kan printes og medbringes i felten for notater og optegnelser. Beregn en kopi af rekvisitionsskemaet per indsamlet filter.

En udstyrsliste over hvilke komponenter, der er brug for vandprøveindsamling er også indsat i denne tekniske anvisning (tabel 1), og kan bruges som tjekliste når feltarbejdet planlægges, og øvrigt udstyr klargøres for feltarbejde.

Gør alle notater med blyant, da tusch eller blæk let kan blive tværet ud. Prøvetagningseskemaet (tabel 2) kan med fordel printes på vandfast papir hvis der forventes meget vandpjaskeri hvor prøven skal indsamles og notaterne opgjort.

Notater fra prøvetagningseskemaet skal overføres til et excel-regneark efter prøvetagningen er afsluttet.

For at sikre validering af resultatet er det nødvendigt med flere replikater. Som minimum skal der indsamles tre filterprøve-replikater per lokalitet, men flere replikater kan med fordel indsamles. Vandindsamling, filtertype og præservering af filter skal standardiseres fra start for at sikre sammenlignelighed på tværs af både prøvetagningstidspunkt samt prøvetagningslokalitet.

Med henblik på langtidssigtet sammenholdning af prøver, skal den indsamlede filtrerede vandprøve efter indfrysning til $< -15^{\circ}\text{C}$ overflyttes til -80°C . Under overflytningen fra -15°C til -80°C må filterprøven ikke optøes (ikke overstige 0°C). Indfryses filteret ($< -15^{\circ}\text{C}$) øjeblikkeligt efter endt filtrering, enten ved placering i tøris eller i en almindelig fryser, kan det frosne filter uden problem bevare eDNA-mængden i op til 2-4 uger (Spens et al., 2016), ind til det overflyttes til -80°C fryser.

Der er ikke gjort empiriske studier af hvor lang tid filtreret eDNA i sterivex-filtrer kan bevare deres eDNA, når filtrerne er opbevaret ved -80°C , men med forsøg på ekstraktion af DNA fra isborekerner og permafrostjord (Pedersen et al., 2015), kan det ikke udelukkes at opbevaring af filtrer på -80°C kan bevare DNA'et i mere end 1000 år (se også Willerslev et al., 2013; Thomsen & Willerslev, 2015).

Som udgangspunkt er 'Sterivex'-filterenheden en lukket steril enhed, og er vanskelig at kontaminere med udefrakommende eDNA. Når filteret er lukket med 'caps' og opbevaret i zip-lock pose og indfrosset er risiko for krydskontamination uhyre begrænset. Den største risiko for krydskontamination mellem prøver beror på om vand fra tidligere indsamlingslokaliteter på uheldig vis bringes i kontakt med ny prøvetagning. Idet alle detekteringsystemer bygger på artsspecifik sporing af DNA fra hvirvelløse dyr, benfisk og alger, er der minimal risiko for at DNA fra menneskelig håndtering og menneskeligt DNA kan kontaminere prøven.

Derfor er det yderst vigtigt at vandprøveindsamler (vandslange, rosettevandhenter eller lignende) gennemskylles behørigt inden vandprøven indsamles. Derudover er det vigtigt at den person der foretager filtreringen ikke også forinden vandprøvetagningen har håndteret individer af forskellige

invasive arter. Der medfølger både engangshandsker og instruktioner til Amphiltrator-kittet der hjælper til at mindske denne kontamineringsrisiko betydeligt. Det skal prøvetageren være gjort bekendt med Amphiltratoren og delene i kittet inden selve prøvetagningen udføres.

Del II. Ekstraktion af eDNA fra det indsamlede vand

Ekstraktion af eDNA fra filtrerede vandprøver er baseret på DNeasy Blood & tissue kit (Qiagen), eftersom mange eDNA studier netop benytter dette ekstraktionskit (f.eks. Thomsen et al., 2012a,b; Takahara et al., 2013; Biggs et al., 2014; Tréguier et al., 2014; Sigsgaard et al., 2015). Amphi Consult og afdelingen for Evolutionary Genomics ved Københavns Universitet har sammenholdt DNeasy Blood & tissue kit (Qiagen) med NucleoSpin Soil (Macherey-Nagel). Umiddelbart var DNeasy Blood & tissue kit (Qiagen) en anelse bedre til at oprense eDNA end NucleoSpin Soil (Macherey-Nagel) for marine vandprøver. Men dette resultat er stadig under analyse. Deiner et al. (2015) fandt også DNeasy Blood & tissue kit (Qiagen) gav bedst resultat.

Ekstraktionsprotokollen herunder kan også benyttes for alkoholfældede vandprøver (se også Ficotela et al. (2008) og Thomsen et al. (2012a) for detaljer.

Som udgangspunkt for indsamling i 2017-2018, vil al bearbejdning af indsamlede filtrerede vandprøver blive udført af Eurofins Danmark - Eurofins Scientific, og en detaljeret protokol for ekstraktion er derfor ikke indarbejdet i denne tekniske anvisning.

Del III. In vivo detektering af eDNA ved kvantitativ PCR

Før kvantitativ detektion af eDNA kan indledes (*in vivo* test), er det strengt nødvendigt at grundige *in silico* og *in vitro* test er blevet udført og har sikret at primer- probe systemet ikke giver falske positive signaler pga. uønsket amplifikation af eDNA fra tætbeslægtede arter. Detaljeret *in silico* design kan ikke udelukke uspecifik uønsket amplifikation. Kun en detaljeret og grundig *in vitro* test kan sikre at fejlagtige konklusioner ikke drages på grundlag af falsk positiv amplifikation. Se også studierne af Taberlet et al. (2012), Wilcox et al. (2013) og Thomsen & Willerslev (2015).

Eftersom detektion af eDNA er baseret på et højt antal amplifikationscykler (>40 cykler) med 'annealing' og 'extension', kan primer og probe systemet detektere meget lave koncentrationer eDNA. Men ved >40 amplifikationscykler er der stor risiko for at få uønsket amplifikation fra tæt-beslægtede arter, der forekommer i samme habitat som den eftersøgte art (Wilcox et al., 2013). Vær opmærksom på at det ikke nødvendigvis er muligt at udlede fra et falsk positivt resultat fra qPCR, hvilken anden tætbeslægtet art, der har resulteret i uønsket amplifikation. Ønsket amplifikation kan desværre

ikke skelnes fra uønsket amplifikation. Ydermere, skal brugeren være opmærksom på om *in silico* designet af primer- og probe systemet er baseret på ufuldstændig sammenholdning af nukleotid-sekvens data fra 'the National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank. Arter der ikke var inkluderet i det indledende *in silico* design, kan heller ikke udelukkes som grundlag for mulig falsk positiv amplifikation, se også studiet af Wilcox et al. (2013).

En standard fortyndingsrække kan forberedes, hvis en kvantificering af eDNA i ekstraktionen fra filtervandprøven er ønsket (Ellison et al., 2006; Bustin et al., 2009; Turner et al., 2015). En standard fortyndingsrække kan tilberedes ved en indledende PCR på DNA ekstraheret fra den eftersøgte organisme og med de artsspecifikke primere der senere hen skal bruges for det efterfølgende qPCR setup. PCR-produktet kan derpå oprenses og koncentrationen på det oprensede PCR-produkt kan estimeres vha. spektrofotometri, Nanodrop, Qubit e.l. Eftersom nukleotid-sekvensen på PCR-produktet er kendt, kan molekylvægten beregnes, og antallet af PCR-produkter bestemmes som antal kopier per volumen. Dette oprensede PCR-produkt kan derpå fortyndes til en standard fortyndingsrække indledningsvis med 10^8 kopier per μL og i ti-fold fortyndinger (dvs. 10^7 kopier/ μL , 10^6 kopier/ μL osv. ned til 1 kopi/ μL).

Den findes mange forskellige typer preproducerede mastermix for real-time PCR. Alle qPCR set ups udført ved afdelingen for Evolutionary Genomics ved Statens Naturhistoriske Museum over perioden 2012-2016 er baseret på TaqMan Environmental Master Mix 2.0 (Life Technologies), som også er foretrukket i mange studier på eDNA (Thomsen et al., 2012a,b; Tréguier et al., 2014; Sigsgaard et al., 2015; Turner et al., 2015). Derfor er denne protokol også baseret på TaqMan Environmental Master Mix 2.0 (Life Technologies).

Krydskontamination mellem forskellige qPCR kan forebygges ved brug af dUTP i alle qPCR produkter og addering af uracil DNA glycosylase (UDGase) til qPCR mix, med et indledende opvarmningstrin i qPCR programmet der inaktiverer UDGase (se Sigma Aldrich hjemmeside for yderligere detaljer om uracil DNA glycosylase). TaqMan Environmental Master Mix 2.0 (Life Technologies) indeholder ikke UDGase, og må derfor tilsættes separat. Tilsættes UDGase skal mængden af ddH₂O per reaktion justeres tilsvarende så total volumen forbliver 25 μL per reaktion.

Reaktioner til qPCR forberedes i volumen mellem 25 μL til 100 μL . Her er 25 μL total volumen reaktioner anbefalet. Reaktionerne kan køres på en 'Stratagene Mx3005P quantitative PCR' maskine, eller på en tilsvarende 'real-

time' qPCR maskine, der er i stand til at detektere de fluorescerende prober, der benyttes – dvs. maskinen skal kunne detektere FAM og ROX farve.

Skal forekomsten af eDNA vurderes med 95% konfidens-niveau, vil det være påkrævet at analysere minimum 19 positive qPCR-replikater-prøver ud af 20 qPCR-replikater-prøver per filtreret vandprøve, da $19/20 \cdot 100\%$ er lig med 95%. Dette kan hurtigt resultere i uforholdsvist mæssigt mange replikat-prøver, hvorfor en 'presence/absence' detektering uden mulighed for fastsættelse af konfidens-niveau umiddelbart anbefales. Se også studiet af Takahara et al. (2013) for flere detaljer om eDNA-detektering af akvatiske invasive arter. Ønskes blot 'presence/absence' detektering, skal minimum fire qPCR-replikater analyseres per filter-vandprøve, men det anbefales kraftigt at analysere flere end blot fire qPCR-replikater-prøver per filtreret vandprøve.

Som udgangspunkt for indsamling i 2017-2018, vil al bearbejdning af indsamlede filtrerede vandprøver og efterbehandling af ekstraktioner blive udført af Eurofins Danmark - Eurofins Scientific, og en detaljeret protokol for qPCR-test på ekstraktioner fra filtre er derfor ikke indarbejdet i denne tekniske anvisning.

2.1 Tid, sted og periode

Del I – Indsamling af vandprøver:

For kystvande skal vandprøver indsamles fra midten af den opblandede vandsøjle, hvor fordelingen af eDNA antages som værende ensartet. Undgå vandindsamling nær bunden eller i sedimentet (Treguier et al., 2014; Turner et al., 2015). For lagdelte åbne farvande skal der indsamles vandprøver fra både over og under springlaget. For både kystvande og åbne farvande skal indsamlingen foregå på de stationer, der indgår i overvågningsprogrammet. Indsamlingerne skal ske to gange årligt, hhv. sent forår/tidlig sommer og sen sommer/tidlig efterår.

Indsamling af vandprøver skal reelt koordineres så de er sammenfaldende med de tidsperioder over året, hvor der kan forventes at forekomme de største bestande af de invasive arter, eller hvor der på anden facon kan forventes at eDNA koncentrationerne fra de eftersøgte invasive arter er højest, evt. fra gydninger eller migrationer.

Det er dog ikke muligt at lave enkeltvise indsamlinger, og særskilte indsamlinger for hver af de enkelte eftersøgte arter. Det vil derudover også betyde et betydeligt større antal vandprøvefiltater end hvad der umiddelbart er muligt indenfor rammerne af de allerede eksisterende indsamlinger.

I stedet skal al vandprøve-indsamling derfor ske i de tidsperioder, hvor der allerede er planlagt indsamling af andre prøver i hhv. sent forår/tidlig sommer og sen sommer/tidlig efterår.

Indsamles der også individer af de invasive arter, bør datoen for indsamling af vandprøve fastlægges så der er så lille et tidsrum mellem vandprøvetagning og indsamling af de invasive arter. Der må højst være en uge mellem disse indsamlingstidspunkter.

Ved transekter udgående fra kysten skal der indsamles fra den dybeste del af transektet. Dog må der ikke samles ind fra dybder der er mindre end 1 m fra bunden. Det betyder at er den dybeste del af et transekt under 1 m, skal der ikke samles vandprøve.

Indsamlingslokaliteter skal tilrettelægges så der er så lille afstand som muligt mellem lokaliteten hvor vandprøven er indsamlet, og lokaliteten hvor der er fisket efter de invasive arter.

Del II og del III: Analyse af vandprøver:

Selve analysen af vandprøverne og ekstraktion fra filtrene skal finde sted i særskilte laboratorier, og vil blive varetaget af Eurofins Danmark - Eurofins Scientific.

2.2 Udstyr

Følgende udstyr skal bruges i forbindelse med vandprøvetagningen (del I):

- - Vandhenter. F.eks. en spand eller en (eller flere) vandbeholder(e) i en Rosette vandhenter. Gennemskyldet med minimum 10 gange volumen vand som vandhenteren kan indeholde, med vand fra den lokalitet, der skal samles ind fra.
- - Sterile inerte filterenheder med effektiv porestørrelse på 0,2-0,5 µm. Et 'Sterivex'- benyttes for denne anvisning. Sterivex-filteret er vedlagt Amphiltrator filtreringskittet. Der skal påregnes minimum 3 filtre per indsamlingslokalitet.
- - Filterholder, som tillader læk-tæt samling med tryksat filtreringsenhed. For denne anvisning benyttes en Amphiltrator filtreringsenhed, med medfølgende en-gangsplastic. Se også instruktion og vejledning vedlagt Amphiltrator-kittet.
- - Termometer. Skal overskyldes med vand fra den pågældende indsamlingslokalitet, inden brug, for at forhindre krydskontamination mellem prøvetagningslokaliteter.
- - Notat-ark for optegnelser om prøvetagning, indsamlingslokalitet. Tabel 2 i denne tekniske anvisning kan benyttes for notater.
- - Blyant for at gøre notater.
- - 'MoBio Caps' til at lukke ender på 'Sterivex'-filter efter endt filtrering – er allerede vedlagt Amphiltrator indsamlingskittet. Beregn 2 caps per filter.

- - Zip-lock poser (100 mm * 150 mm) med hvide skrivefelter for efter-følgende opbevaring af 'Sterivex'-filter. Beregn minimum en pose per sterivex-filter
- - Vandfast tuschpen til at skrive på zip-lock plastic poser.
- - Engangsprøjte 60-100 mL. Én sprøjte per 'Sterivex'filter. For hvert Amphiltrator indsamlingskit er der en medfølgende engangsprøjte. Beregn en sprøjte per filter.
- - Engangs latex handsker, for brug ved håndtering af vandprøver. Der medfølger handsker til Amphiltrator kitte. Beregn et par handsker per vandprøve.
- - Mulighed for øjeblikkelig indfrysning (< -15°C) af indsamlet 'Sterivex'-filter. Enten ved opbevaring af 'Sterivex'-filter i en almindelige fryser. Ellers ved opbevaring i flamingokasse med tøris. Flamingokasse med tøris skal i så fald bestilles i forvejen- Tøris kan sagtens holde flere dage, så længe låget på kassen er tætsluttende.
- - Pumpe eller kompressor der kan kobles til Amphiltrator filtreringsenheden. Jvf. med Amphiltrator manualen. Beregn en pumpe og/eller en kompressor per Amphiltrator filtreringsenhed.
- - Mulighed for køling af den indsamlede vandprøve såfremt øjeblikkelig filtrering efter vand er indsamlet ikke er muligt, og der er risiko for at den indsamlede vandprøve vil blive opvarmet i det 1 times tidsrum, der maksimalt må gå fra vandet er indsamlet til prøven kan filtreres. Et almindeligt køleskab kan sagtens bruges til dette formål.
-

Nedenstående tabel (tabel 1), er en udstyrsliste, der kan printes og benyttes som tjekliste samtidig med andet feltudstyr klargøres inden feltarbejde.



UDKAST



UDKAST

Tabel 1	Udstyrsliste. Benyttes ved klargøring af udstyr for feltarbejde.
Kryds	Udstyr
-	Vandhenter. F.eks. en spand eller en (eller flere) vandbeholder(e) i en Rosette vandhenter. Gennemskyllet med minimum 10 gange volumen vand som vandhenteren kan indeholde, med vand fra den lokalitet, der skal samles ind fra.
-	Sterile inerte filterenheder med effektiv porestørrelse på 0,2-0,5 µm. Et 'Sterivex'-benyttes for denne anvisning. Sterivex-filteret er vedlagt Amphiltrator filtreringskittet. Der skal påregnes minimum 3 filtre per indsamlingslokalitet.
-	Filterholder, som tillader læk-tæt samling med tryksat filtreringsenhed. For denne anvisning benyttes en Amphiltrator filtreringsenhed, med medfølgende engangsplastic. Se også instruktion og vejledning vedlagt Amphiltrator-kittet.
-	Termometer. Skal overskylles med vand fra den pågældende indsamlingslokalitet, inden brug, for at forhindre krydskontamination mellem prøvetagningslokaliteter.
-	Notat-ark for optegnelser om prøvetagning, indsamlingslokalitet. Tabel 2 i denne tekniske anvisning kan benyttes for notater.
-	Blyant for at gøre notater.
-	'MoBio Caps' til at lukke ender på 'Sterivex'-filter efter endt filtrering – er allerede vedlagt Amphiltrator indsamlingskittet. Beregn 2 caps per filter.
-	Zip-lock poser (100 mm * 150 mm) med hvide skrivefelter for efterfølgende opbevaring af 'Sterivex'-filter. Beregn minimum en pose per sterivex-filter
-	Vandfast tuschpen til at skrive på zip-lock plastic poser.
-	Engangsprøjte 60-100 mL. Én sprøjte per 'Sterivex'filter. For hvert Amphiltrator indsamlingskit er der en medfølgende engangsprøjte. Beregn en sprøjte per filter.
-	Engangs latex handsker, for brug ved håndtering af vandprøver. Der medfølger handsker til Amphiltrator kitte. Beregn et par handsker per vandprøve.
-	Mulighed for øjeblikkelig indfrysning (< -15°C) af indsamlet 'Sterivex'-filter. Enten ved opbevaring af 'Sterivex'-filter i en almindelige fryser. Ellers ved opbevaring i flamingokasse med tøris. Flamingokasse med tøris kan bestilles i forvejen, og kan sagtens holde flere dage, så længe låget på kassen er tætsluttende.
-	Pumpe eller kompressor der kan kobles til Amphiltrator filtreringsenheden. Jvf. med Amphiltrator manualen. Beregn en pumpe og/eller en kompressor per Amphiltrator filtreringsenhed.

Mulighed for køling af den indsamlede vandprøve såfremt øjeblikkelig filtrering efter vand er indsamlet ikke er muligt, og der er risiko for at den indsamlede vandprøve vil blive opvarmet i det 1 times tidsrum, der maksimalt må gå fra vandet er indsamlet til prøven kan filtreres. Et almindeligt køleskab kan sagtens bruges til dette formål.

Følgende udstyr skal anvendes til ekstraktionen (del II):

- DNeasy Blood & tissue kit (Qiagen)
- ATL-buffer (komponent i Qiagen DNeasy Blood & tissue kit)
- Proteinkinase K (komponent i Qiagen DNeasy Blood & tissue kit)

Følgende udstyr skal anvendes til selve in vivo detektering af eDNA ved kvantitativ PCR (del III):

- Rotor eller mixer, der kan modstå opvarmning til mellem 50°-80° C i varmeskab.
- Varmeskab for inkubation ved temperaturer mellem 20°-80° C.
- Pipetter, i størrelser: P10, P20, P200 og P1000
- Sterile pipettespidser med filterbarriere. Spidserne skal matche størrelsesklasserne på pipetterne
- Spektrofotometer, Nanodrop, Qubit e.l. for mål af koncentration af DNA
- TaqMan Environmental Master Mix 2.0 (Life Technologies)
- dUTP (komponent i TaqMan Environmental Master Mix 2.0)
- Uracil DNA glycosylase (UDGasa)
- Stratagene Mx3005P quantitative PCR eller tilsvarende "real-time" qPCR-maskine, der kan detektere FAM og ROX-farve
- Bord-centrifuge, eller mini-centrifuge med maksimal hastighed på minimum 2000 rpm. Med plads til eppendorf-rør i 1,5-2,0 mL volumen
- Stor centrifuge med maksimal hastighed på minimum 14000 rpm. Med plads til eppendorf-rør i 1,5-2,0 mL volumen
- MX pro software for stratagene Mx3005P qPCR-maskine
- Plastrør for qPCR med plads til 100 uL reaktioner. Plastrør skal være i strips af otte.
- Klare plastlåg i strips af otte til plastrør. Plastlågen skal være flade, og tilpasset fluorescens detektering i qPCR.
- Dobbelt distilleret RNase og DNase frit vand
- Sterile, RNase og DNase fri eppendorf rør i volumen 1,5-2,0 mL

- Primere og prober som angivet for de pågældende systemer

2.3 Procedure

I de følgende tre afsnit gennemgås proceduren for indsamling og filtrering af vand, ekstraktion af eDNA fra filtreret vandprøve, samt detektering af eDNA via en qPCR maskine og bearbejdning og analyse af detekteret eDNA data. Bemærk at analyse af data forudsætter kendskab til både metoder i kvantitativ PCR, samt begrænsninger for detektering af eDNA som blandt andet er beskrevet af Wilcox et al. (2013).

Fremgangsmåde for indsamling af vand (del I):

Vand indhentes fra midten af vandsøjlen vha. en nukleinsyrefri (dvs. fri for rest af DNA) vandhenter eller en spand. En pumpe kan også bruges, men skal i såfald kunne renses for rester af nukleinsyrer fra tidligere indsamlingslokaliteter så krydskontamination mellem indsamlingslokaliteter udelukkes. Amphi Consult kan vejlede i indsamling af vand, og tiltag for minimering af krydskontamination (se mere på www.amphi-consult.dk).

Indsamlet vand filtreres derpå gennem en steril nukleinsyrefri filtreringsenhed. I denne tekniske anvisning benyttes et 'sterivex' filter som steril filtreringsenhed.

- 1) Benyt et sterilt filter med en effektiv porestørrelse på 0,2-0,5 μm som tillader filtration ved overtryk og stort filtreringsvolumen. Filtrér minimum 1,5 L vand. Mere end 1,5 L vand kan også filtreres så længe filteret ikke tilstoppes. Følg instruktionerne for den pågældende filterenhed. Man kan med fordel benytte udstyr, der integrerer både overtryk og filterenhed for at optimere filtrering i felten og laboratoriet (f.eks. en 'Amphiltrator', se mere på www.amphi-consult.dk).
- 2) Før vandprøven kan indsamles skal vandprøvehenteren være behørigt gennemskyllet med vand fra den forestående indsamlingslokalitet, for at fjerne evt. rester af eDNA fra tidligere indsamlingslokaliteter. Der skal gennemskyldes med minimum 10 gange det volumen vand som vandhenteren kan indeholde. Det er selv sagt den del af vandhenteren der vil være i kontakt med den nye vandprøve, der skal skylles. Nedsænkning af en vandhenter, f.eks. monteret i en Rosette vandhenter, vil automatisk bevirke at vandhenteren bliver skyllet tilstrækkeligt, inden vandprøven indsamles.
- 3) Efter behørig skylning, indsamles vandprøven fra midten af vandsøjlen, hvor fordelingen af eDNA antages som værende ensartet. Undgå vandindsamling nær bunden eller i sedimentet (Treguier et al.,

2014; Turner et al., 2015). Indsamling skal ske i en afstand af 1 m over bunden, eller højere oppe i vandsøjlen.

- 4) Notér temperatur på det indsamlede vand, samt dato for indsamling, og hvem der har indsamlet vandprøven. Notér også tidsrummet for hvornår vandprøven blev indsamlet. Skyl derefter termometeret med ferskvand.
- 5) Notér det filtrerede vandvolumen. Såfremt filteret blokkes og forhindrer at alle 1,5 L bliver filtreret, evt. pga. opslemmede partikler i vandprøven, indstilles filteringen, og det filtrerede volumen noteres. Opsamlingsbeholderen på siden af Amphiltratoren kan aflæses og det filtrerede vandvolumen noteres.
- 6) Tøm filterenheden for evt. rest af vand, så filterenheden er så tør som mulig. Benyt en engangssprøjte fyldt med luft for at tømme 'Sterivex'-filteret for resterende vand. Og luk enderne på 'Sterivex'-filteret med de 'caps', der følger med Amphiltrator filtreringskittet. Bemærk at ikke alt restvand kan presses ud med engangssprøjte. En rest af vand på ca. en tiendedel af sterivex-filterets volumen er forventeligt.
- 7) Mærk filterprøven med unik nummerkode, for senere korrekt identifikation.
- 8) Placér det tillukkede filter i en zip-lock pose, hvor det unikke indsamlingsnummer er noteret på forinden.
- 9) Indfrys zip-lock posen med filter, og notér tidspunktet for hvornår det endelige filtrat blev indfrosset ($<-15^{\circ}\text{C}$). Prøven skal forblive frossen. Når prøven er opbevaret ved -15°C kan prøven opbevares op til 2 uger ved -15°C . Inden der er gået 2 uger skal filterprøven overflyttes til -80°C fryser.
- 10) Overvej indsamling af flere replikater.
- 11) Efter al vandprøvetagning er afsluttet for dagens feltarbejde skal vandprøvehenteren (vandslange eller vandbeholder) skylles med ferskvand. Jf. med afsnit om vedligeholdelse af udstyr i sektion 2.5 af denne tekniske anvisning.

Fremgangsmåde for ekstraktion fra filtrerede vandprøver ved brug af DNeasy Blood & tissue kit (Qiagen) (del II):

- 12) Filteret skal åbnes under sterile forhold, evt. i et 'negative flow-hood'. Ubehandlede filterer kan bruges direkte i næste trin.
- 13) ATL buffer og proteinase K tilsættes et rør med det udtørrede filter, som anbefalet i protokollen for DNeasy Blood & tissue kit (Qiagen). Mængden af ATL og proteinase K kan evt. justeres jf. med Thomsen et al. (2012b). Filter med ATL og proteinase K inkuberes på rotor eller mixer i varmeskab ved 56°C for minimum 2 timer så filtratet lyses fuldstændigt.

- 14) Væsken med lyseret filtrat kan så overføres med pipette til 'spin columns' i DNeasy Blood & tissue kit (Qiagen), og oprensnes ved at følge protokollen for DNeasy Blood & tissue kit (Qiagen).
- 15) For at sikre relativt høje koncentrationer af eDNA bør den sidste eluering ske i maksimalt 200 µL elueringsbuffer.
- 16) For langvarig opbevaring bør koncentrationen på det oprensede eDNA måles vha. spektrofotometri, Nanodrop, Qubit e.l.
- 17) Ekstraheret eDNA opbevares koldt (under -15° C) til alle tider, bortset fra når det skal bruges i qPCR set ups.

Fremgangsmåde for detektering af artsspecifik eDNA vha. qPCR (del III):

- 18) Som minimum skal fire replikater per prøve for hver ekstraheret filtreret vandprøve analyseres for en 'presence/absence' detektering uden mulighed for fastsættelse af konfidens-niveau. Bemærk at det kræver minimum 19 positive replikater ud af 20 replikater for at sikre 95% konfidens-niveau for tilstedeværelse af det eftersøgte eDNA.
- 19) Individuelle reaktioner klargøres til 25 µL total volumen, der består af 10 µL of TaqMan, Environmental Master Mix 2.0 (Life Technologies), 9 µL ddH₂O, 3 µL ekstraheret DNA, 1 µL af hver primer (10 µM) og 1 µL probe (2.5 µM). Mere end 3µL ekstraheret DNA kan med fordel tilsættes for forøget chance for eDNA detektion, i så fald skal mængden af ddH₂O nedjusteres tilsvarende per reaktion. F.eks. hvis der i stedet benyttes 5µL ekstraheret DNA, skal der kun tilføres 7 µL of ddH₂O per reaktion. Som ved ordinær PCR set up, bør alle reagenser mixes og spindes efter optøning (omkring 5-10 s ved 1000 rpm) i en lille bord-centrifuge, for at sikre at alle reagenser der tilføres er i de tiltænkte koncentrationer.
- 20) Minimum fire reaktioner skal tilsidesættes for 'non-target control' (NTC) test, for at sikre at alle reagenser er fri for kontamination.
- 21) 'Positive target control' (PTC) skal inkluderes i to til fire reaktioner. Inkluderes en standard fortyndingsrække kan den samtidig tjene som PTC. Ellers kan en PTC forberedes ved at tilsætte en fortynding af DNA ekstraheret fra væv fra den eftersøgte organisme.
- 22) En standard fortyndingsrække forberedes i ti-fold fortyndinger – dvs. i 107 kopier/µL, 106 kopier/µL, 105 kopier/µL, osv. ned til 100 kopier/µL. Hver ti-fold fortynding skal testes i minimum tre replikater. Jf. også med manualen til MxPro softwaren for Stratagene Mx3005P qPCR maskinen for fremstilling af standard fortyndingsrækker. Bemærk at en standard fortyndingsrække betragtes som unik per qPCR set up, og ikke kan overføres til lignende eller andre qPCR set ups. Se også anbefalinger fremført af Bustin et al. (2009) og Turner et al. (2015).

- 23) Programmet for qPCR skal være: 5 minutter ved 50° C, 10 minutter ved 95° C, og derpå 50 cykler med 95° C i 30 s og 60° C for 1 minut. Med 'end-point collection' af fluorescerens data under 60° C trinnet.
- 24) Da prøberne er forsynet med BHQ1 og FAM-farve og TaqMan, Environmental Master Mix 2.0 (Life Technologies) indeholder ROX-farve sættes qPCR maskinen til at detektere FAM med ROX som reference.
- 25) Resultatet fra qPCR kørslen kvantificeres ved brug standard kurven udregnet fra standard fortyndingsrækken. Eftersom det oprindeligt filtrerede vandvolumen er kendt, og volumen af tilsat elueringsbuffer er kendt, og volumen ekstraheret eDNA i den efterfølgende qPCR er kendt, kan mængden af eftersøgt eDNA i den oprindelige vandprøve beregnes, og i sidste ende benyttes som et vejledende mål for den relative forekomst af den eftersøgte organisme på den pågældende lokalitet. At benytte forekomsten af eDNA i den filtrerede vandprøve som mål for forekomsten af den eftersøgte organisme, vil kræve at der er indsamlet bestandsstørrelsesvurderinger for den eftersøgte art med konventionelle metoder samtidig med filtervandprøve er blevet indsamlet, og at disse samtidige indsamlinger af filter og bestandsstørrelsesvurderinger er blevet gjort løbende igennem en længere årrække. Idet organismer må forventes at udskille eDNA med forskellig rate (se også Thomsen et al., 2012a,b), og få deres eDNA nedbrudt med forskellig rate med variation indenfor både arter, populationer, indsamlingstidspunkt og indsamlingslokalitet, er det ikke muligt at bestemme bestandsstørrelsen ud fra eDNA-mængden.
- 26) For kvantificering af kopier af det eftersøgte eDNA i den ekstraherede filtrerede vandprøve er det nødvendigt at skelne mellem 'limit of Detection' (LOD) og 'level of quantification' (LOQ). For at fastslå LOD og LOQ, må negative replikater i standard fortyndingsrækken først fjernes, da de ellers kan påvirke beregning af standardkurven. Dette kaldes også 'exclusion by sample' jf. studiet af Ellison et al. (2006). LOD er defineret som den laveste standard med positiv Ct-værdi (Cycle threshold) (se Bustin et al., 2009), hvor minimum én ud af flere qPCR replikater returnerer positiv amplifikation – dette er som regel omkring den laveste koncentration af standard fortyndingsrækken, med kun én kopi per reaktion. Prøver med Ct-værdier over LOD bør betragtes som værende negative.
- 27) LOQ er defineret som laveste reproducerbare standard med positiv Ct-værdi, dvs. der hvor hver qPCR-replikate for den samme reaktion resulterer i positiv amplifikation – dette er som regel omkring 5-10 kopier per reaktion. Prøver med Ct-værdier over LOQ kan betragtes som værende positive (dvs. indenfor LOD), men kun mulige at

kvantificere som mindre end den mindste reproducerbare standard (f.eks. < 5 eller 10 kopier per reaktion).

- 28) Efter LOD og LOQ er fastsat, kan mængden af eftersøgt eDNA per replikat i qPCR reaktionerne fra de ekstraherede filtrerede vandprøver kvantificeres forudsat Ct-værdierne er under LOQ.
- 29) Koncentration af eftersøgt eDNA i den oprindelige filtervandprøve kan derfor beregnes ved hjælp af følgende formel: $A_e = C_{qpcr} * F_e * V_{wf}$. Hvor A_e er antallet af eDNA-kopier per volumen filtreret vand, C_{qpcr} er koncentrationen af kopier af det eftersøgte eDNA i qPCR-reaktionen, F_e er brøkdelen af det eluerede ekstraherede filtrat benyttet i qPCR-reaktionen og V_{wf} er volumen af vand filtreret.

2.4 Tjekliste

Ved vandindsamling (del I):

- Vandhenter rengjort forinden, ved gennemskylning med vand fra den nye indsamlingslokalitet, med mere end 10 gange vandhenterens volumen.
- Udstyr for vandindsamling klargjort
- Minimum 1,5 L vand er filtreret, eller til filteret blokerer
- Notater omkring vandprøve er optegnet
- Filteret er tømt for rest vand med en engangssprøjte.
- Filteret er lukket med 'caps' og blevet lagt i zip-lock pose.
- Slut-filtrat er opbevaret ved < -15° C
- Hver zip-lock pose med filterprøve er mærket med unik nummerkode

Ved ekstraktion (del II):

- Ekstraktionskit er klargjort forinden ekstraktion påbegyndes
- Yderligere remedier for ekstraktion er klargjort inden ekstraktionerne påbegyndes
- Notater for detaljer om ekstraktionerne er optegnet
- Hver ekstraktion er mærket med unik nummerkode
- Ekstraheret filterprøve er opbevaret ved < -15° C.

Ved qPCR analyse (del III):

- Alle remedier og reagenser er klargjort
- Standardfortyndingsrække er klargjort forinden
- Primere og prober er fortyndet til de korrekt 'working solutions' inden qPCR reaktionen sættes op
- Tilfredsstillende in silico test og tilfredsstillende in vitro test er blevet gennemført inden test bliver forsøgt på filtrerede vandprøver. Således at der ikke er risiko for detektering af falske positive

- Notater er optegnet omkring indstillinger for qPCR opsætningen og for hvilke vandprøver der analyseres.
- qPCR analyse er kørt, og resulterende data-fil gemt under unikt filnavn.
- Ved 'presence/absence' studier er tilstedeværelse/fravær af den eftersøgt organisme noteret, og ved eDNA koncentrationskvantificerings-forsøg er eDNA koncentrationer målt for hvert replikat i qPCR analysen for hver filterenhed.

2.5 Vedligehold af instrumenter

De fleste komponenter såsom plasticrør, Qiagen ekstraktionkit, filtre, pipettespidser m.v. er engangsbrug. Benyttes en 'Amphitrator' (www.amphi-consult.dk) for vandindsamling bør denne vedligeholdes som specificeret i manual og protokol. Pipetter bør vedligeholdes, kalibreres og renses i hht. til vejledninger for disse.

For vandhenteren anbefales det at skylle den del af vandbeholderen der er i kontakt med vandprøven behørigt med ferskvand, når al prøvetagning er overstået for dagens feltarbejde.

Da denne tekniske anvisning går på indsamling af marine vandprøver er det klogt at skylle rester af marint vand bort, så salt ikke aflejres.

Er det en vandhenter eller vandbeholder, skal den indvendige side (der er i kontakt med vandprøven) skylles med ferskvand tilsvarende minimum 10 gange det volumen vand der kan være i vandhenteren. Er det en vandslange, skal vandslangens indvendige del skylles med minimum 10 gange det volumne vand vandslangen kan indeholde, jf. i fht beregning af rumfanget af en cylinder for at vurdere hvor stort volumen vand vandslangen kan rumme.

For gennemskylning med havvand fra den nye indsamlingslokalitet før vandprøven indsamles henvises der til sektion 2 del I om metoden og sektion 2.3.

For vedligeholdelse af qPCR maskinen henvises også til manualen og softwaren for dette apparat.

Primere og prober, samt ekstraktioner fra filtre og forberedte fortyndingsrækker bør opbevares ved temperaturer under -15°C , for at sikre lang holdbarhed.

For brug og opbevaring af TaqMan EM Master Mix 2.0 henvises til vejledningen for dette produkt.

2.6 Særlige forholdsregler - faldgruber

For at kunne reproducere resultater og sammenholde mål for eDNA er det yderst vigtigt at både indsamling, opbevaring, ekstraktion og qPCR kvantificering fastsættes fra start. Afvigelser eller ændringer i protokollen kan influere mængden af eDNA kraftigt, og gøre sammenligninger umulige.

For sikker detektering er det påkrævet at have et stærkt kendskab til litteraturen omkring sporing vha. eDNA, og til taxonomien for den eftersøgte organisme såfremt *in silico* designet ikke er baseret alle tæt-beslægtede arter til den eftersøgte art. Derudover forudsættes det også at brugeren har en god forståelse for både det forudgående *in silico* design, og *in vitro* test, og et kendskab til hvordan en real-time PCR maskine fungerer og aflæses korrekt.

Falske positive signaler kan ikke umiddelbart skelnes fra sande positive. Der gives derfor ingen umiddelbar hurtig protokol for sikker eDNA-detektering af arter, men i stedet en række af vejledende retningslinjer der sammen med grundige overvejelser kan sikre korrekt detektering af eDNA.

3 Databehandling

Beskrivelse af dataflow herunder opmærksomhedspunkter.

3.1 Beregninger

Angivelse af hvordan beregninger med de indsamlede data skal foregå. Det drejer sig ikke om, de beregninger, hvor data skal indgå, men fx beregning af indekssværdi til breddevariationen og hvilken dybde blandingsprøverne til søkemi skal tages i.

Beregning og håndtering af data er delt i to, der knytter sig til hhv. del I og del III i denne protokol.

For del I er der ingen umiddelbar beregning, men data der er indsamlet i forbindelse med hver filterprøve skal indføres i et excel regneark. Det er yderst vigtigt for senere data beregning, og håndtering af data i del III, at der er gjort så gode optegnelser og notater under del I, som muligt. Jævnfør med tabel 2 herunder.

For del III skal det opgøres hvor stor en andel af de tekniske qPCR replikater, der returnerer positiv amplifikation per filter. Inkorporeres en standard fortyndingsrække i qPCR setuppet er det endvidere muligt at kvantificere koncentrationen af eDNA-target-kopier (i kopier per L vand) som udtryk for tæthed og distribution af arten.

Selve beregningerne knyttet til del III er mere tekniske, og bør nok udføres i samråd med forskere ved Københavns Universitet, der til daglig beskæftiger sig med eDNA.

Som udgangspunkt vil hvert qPCR setup i en MxPro maskine generere en tekst-rapport, der let kan eksporteres til excel-regne-ark. For at facilitere den efterfølgende data-bearbejdning og beregning af eDNA koncentrationer, skal hvert qPCR setup indeholde de nødvendige detaljer om unik prøve nummer, og primer-probe system benyttet, som er specificeret under sektion 3.3 omkring qPCR setup.

3.2 Data og koder

Liste over de data, der skal indlæses i database og angivelse af hvilken database.

For indsamling af vandprøve i hht. til protokol beskrevet i del I i denne tekniske anvisning, skal der for hvert filter noteres følgende detaljer. Forkortelseskoder for disse detaljer er angivet i parentes:

Indsamlingslokalitet, breddegrad og længdegrad (lok_pos):

- Temperatur på vandprøve inden filtrering (Temp_Inds)
- Dato for indsamling (Dato_inds)
- Navn på hvem der har indsamlet prøven (Navn_Inds)
- Dybdestrata for den indsamlede prøve (Dyb_Str)
- Volumen vand filtreret (Vwf)
- Unikt nummer for den pågældende prøve, for at sikre at replikatprøver kan skelnes fra hinanden (U_Pr_Nr)

For at lettere gøre indsamling og notering af disse informationer kan tabellen herunder (tabel 2) bruges som rekvisitionsskema, eller prøvetagningskema, der udfyldes for hvert enkelt filter.

Skemaet (tabel 2) på næste side kan printes ud separat, og kopieres, og benyttes i felten og vedlægges filterprøven. i zip-lock posen.

Optegnelser og notater gøres med blyant, da blæk og tusch let kan forsvinde ved opbevaring i fryser og på køl.

Tabel 2	
Prøvetagnings_skema for TA_X01	Notat
Vandprøvenummer (unikt nummer) (U_Pr_Nr)	
Ansvarlig prøvetager, navn (Navn_Inds)	
Skib (skib)	
Institution (Inst)	
Dato (Dato_inds)	
lokaltet, navn/område (Lok_omr)	
position, længde- og breddegrad (lok_pos)	
Max vanddybde på lokalitet (max_Dyb)	
Dybde hvor vandprøve er indhentet fra (Dyb_Str)	
Volumen vand filtreret (Vwf)	
Er vandsøjlen lagdelt, (ja/nej)	
Dybde for lagdelingen (Dyb_lagd)	
Udgør denne prøve en delprøve pga. Lagdeling i vandsøjlen (ja/nej)- hvis ja, så noter numer på de andre vandprøver	
tidspunkt hvor vandprøve er indsamlet (tdspkt_inds)	
tidspunkt hvor vandprøve er filtreret (tdspkt_filt)	
tidspunkt hvor vandprøve er indfrosset (<-15°C) (tdspkt_indfr)	
dato hvor vandprøve er overført fra -15°C til -80°C (dato_80C)	
Temperatur på vandprøve ved indsamling (Temp_Inds)	
Er vandhenter behørigt 25killet inden vandprøven blev indsamlet (ja/nej)	
Er pose og filter udskiftet i Amphiltrator inden prøven er ble-	

vet filtreret (ja/nej)	
Vandprøven blev indsamlet samtidigt med (bundfauna/makroalge/zooplankton/fytoplankton /fiskeri)	
Restvand er presset ud af filteret inden indfrysning (ja/nej)	
Zip-lock pose med filter er markeret med dato, unikt nummer og lokalitet (ja/nej)	
Andre noter	

For hver ekstraktion af filtrer skal følgende noteres. Forkortelses-koder for disse detaljer er angivet i parentes:

- Unikt nummer for den pågældende prøve, skal være identisk med nummeret tildelt under filtrering (U_Pr_Nr)
- Dato for ekstraktion (Dato_eks)
- Ekstraktionskit benyttet (Eks_Kit)
- Volumen elueringsbuffer benyttet under ekstraktionen (Vol_EB)
- Temperatur hvorunder det ekstraherede filtrat opbevares (Temp_Ex_Opb)
- Målt koncentration på det ekstraherede eDNA (Cex_eDNA)

For hver kvantitativ PCR setup skal følgende data noteres. Forkortelses-koder for disse detaljer er angivet i parentes:

- Unikt fortløbende nummer tildelt pladen med alle qPCR reaktioner (Q_Nr)
- Filnavn tildelt pladen med qPCR reaktionerne. Et unikt nummer der også skal indeholde det unikke fortløbende nummer tildelt pladen qPCR-reaktionerne (QPI_No).
- Dato for qPCR (Dato_qpcr)
- Volumen på qPCR reaktioner (vol_qpcr_rxn)
- Eftersøgt art (Eft_art)
- Primer og probe system benyttet (prim_prob_sys)
- Antallet af reaktioner (Nr_rxn)
- Antallet af NTC reaktioner (NTC_rxn)
- Antallet af replikater for hver filtrat-ekstraktion (Repl_unk_rxn)

- Antallet af replikater for hver standard-fortyndingsrække (Repl_SD_rxn)
- Hvilke ekstraktioner af hvilke filtrater der er forsøgt analyseret i den pågældende qPCR, dvs. hvilke 'U_Pr_Nr' der er testet.
- Volumen af filtrat fra hver 'U_Pr_Nr'-ekstraktion der er forsøgt testet per reaktionsrør (Vol_EksFil)
- Hvilken type real-time kvantitativ PCR maskine der er benyttet (Type_qpcr_mask)
- Hvem der har foretaget qPCR analysen (Resp_qPCR)

Eventuelt en liste med koder, der skal anvendes herunder hvilke standatko-
der, der skal anvendes.

Hvis denne beskrivelse er den samme i mere end én TA, bliver dette be-
skrevet i en særskilt "databehandlings-TA". Afsnittet skal altid være i TA'en,
men evt. kun med henvisninger til den "databehandlings-TA", der beskriver,
hvordan data skal behandles.

4 Kvalitetssikring

4.1 Kvalitetssikring af metode

Beskrivelse af hvordan metoden kvalitetssikres.

4.2 Kvalitetssikring af data og dataaflevering

Beskrivelse af hvordan data kvalitetssikres.

5 Referencer

- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* 55, 611-622.
- Deiner, K., Walser, J.-C., Mächler, E., Altermatt, F., 2015. Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA. *Biol. Conserv.* 183, 53-63.
- Ellison, S.L.R., English, C.A., Burns, M.J., Keer, J.T., 2006. Routes to improving the reliability of low level DNA analysis using real-time PCR. *BMC Biotechnol.* 6, 33.

- Ficetola, G.F., Miaud, C., Pompanon, F., Taberlet, P., 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biol. Lett.* 4, 423–425.
- Goldberg, C.S., Pilliod, D.S., Arkle, R.S., Waits, L.P., 2011. Molecular detection of vertebrates in stream water: a demonstration using Rocky Mountain Tailed Frogs and Idaho Giant Salamanders. *PLoS ONE* 6, e22746.
- Goldberg, C.S., Sepulveda, A., Ray, A., Baumgardt, J., Waits, L.P., 2013. Environmental DNA as a new method for early detection of New Zealand mudsnails (*Potamopyrgus antipodarum*). *Freshwater Sci.* 32, 792–800.
- Longmire, J.L., Maltbie, M., Baker, R.J., 1997. Use of 'lysis buffer' in DNA isolation and its implications for museum collections. *Museum of Texas Tech University* 163, 1–3.
- Pedersen, M.W., Overballe-Petersen, S., Ermini, L., Sarkissian, C. Der, Haile, J., Hellstrom, M., Spens, J., Thomsen, P.F., Bohmann, K., Cappellini, E., Schnell, I.B., Wales, N.A., Carøe, C., Campos, P.F., Schmidt, A.M.Z., Gilbert, M.T.P., Hansen, A.J., Orlando, L., Willerslev, E., 2015. Ancient and modern environmental DNA. *Phil. Trans. R. Soc. B* 370: 20130383.
- Sigsgaard, E.E., Carl, H., Møller, P.R., Thomsen, P.F., 2015. Monitoring the near-extinct European weather loach in Denmark based on environmental DNA from water samples, *Biological Conservation* 183, 46-52.
- Sigsgaard, E.E., Nielsen, I.B., Bach, S.S., Lorenzen, E.D., Robinson, D.P., Knudsen, S.W., Pedersen, M.W., Jaidah, M.A., Orlando, L., Willerslev, E., Møller, P.R., Thomsen, P.F., 2016. Population characteristics of a large whale shark aggregation inferred from seawater environmental DNA. *Nature Ecology & Evolution* 1, 0004
- Spens, J., Evans, A.R., Halfmaerten, D., Knudsen, S.W., Sengupta, M.E, Mak, S.S.T., Sigsgaard, E.E., Hellström, M., 2016. Comparison of capture and storage methods for aqueous microbial eDNA using an optimized extraction protocol: advantage of enclosed filter. *Methods in Ecology and Evolution* 2016 doi: 10.1111/2041-210X.12683
- Strickler, K.M., Fremier, A.K., Goldberg, C.S., 2015. Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. *Biol Conserv.* 183, 85–92.
- Takahara, T., Minamoto, T., Doi, H., 2013. Using environmental DNA to estimate the distribution of an invasive fish species in ponds. *PLoS ONE* 8, e56584.
- Takahara, T., Minamoto, T., Doi, H., 2014. Effects of sample processing on the detection rate of environmental DNA from the Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Biol. Conserv.*
- Takahara, T., Minamoto, T., Yamanaka, H., Doi, H., Kawabata, Z., 2012. Estimation of fish biomass using environmental DNA. *PLoS ONE* 7, e35868.

- Thomsen, P.F., Willerslev, E., 2015. Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biol. Cons.* 183, 4–18. <http://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.019>.
- Thomsen, P., Kielgast, J., Iversen, L.L., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, M.T.P., Orlando, L., Willerslev, E., 2012a. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Mol. Ecol.* 21, 2565–2573.
- Thomsen, P.F., Kielgast, J., Iversen, L.L., Møller, P.R., Rasmussen, M. & Willerslev, E., 2012b. Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. *PLoS One*, 7, e41732.
- Thomsen, P.F., Møller, P.R., Sigsgaard, E.E., Knudsen, S.W., Jørgensen, O.A., Willerslev, E., 2016. Environmental DNA from seawater samples correlate with trawl catches of subarctic, deepwater fishes. *PLoS ONE* 11, e0165252. doi:10.1371/journal.pone.0165252
- Treguier, A., Paillisson, J.-M., Dejean, T., Valentini, A., Schlaepfer, M., Roussel, J.-M., 2014. Environmental DNA surveillance for invertebrate species: advantages and technical limitations to detect invasive crayfish *Procambarus clarkii* in freshwater ponds. *J. Appl. Ecol.* 51, 871–879.
- Tsuji, S., Ushio, M., Sakurai, S., Minamoto, T., Yamanaka, H., 2017. Water temperature-dependent degradation of environmental DNA and its relation to bacterial abundance. *PLoS ONE* 12, e0176608
- Wilcox, T.M., McKelvey, K.S., Young, M.K., Jane, S.F., Lowe, W.H., Whiteley, A.R., Schwartz, M.K., 2013. Robust detection of rare species using environmental DNA: the importance of primer specificity. *PLoS ONE* 8, e59520.
- Willerslev, E., Hansen, A.J., Binladen, J., Brand, T.B., Gilbert, M.T.P., Shapiro, B., Bunce, M., Wiuf, C., Gilichinsky, D.A., Cooper, A., 2003. Diverse plant and animal genetic records from holocene and pleistocene sediments. *Science* 300, 791–795. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1084114>.

6 Oversigt over versionsændringer

Version	Dato	Emne:	Ændring:
2.2	2011		Første version som anvendes til alle foregående TA'er
2.3	01.03.2012	Ændring	Ændret sidehoved og sidefod. DCE eller GEUS Logo i sidehovedet. Side-nummer i sidehoved.

UDKAST