

eDNA

Provtagning och filtrering med peristaltisk pump eller med spruta

Modifierad av Niclas Gyllenstrand och Thomas Källman från manual skriven
av Andreas Furustam och Karin Hante på enheten för naturförvaltning på
länsstyrelsen i Västra Götaland.



Innehåll

eDNA Provtagning och filtrering med peristaltisk pump eller med spruta	1
Allmänt.....	3
Utrustningslista	3
Utrustning att ta med i fält	5
Provtagning med peristaltisk pump.....	5
Provtagning med spruta	8
Att tänka på för bra resultat	10
Uppkomna frågor.....	10
Hur gör man för att tvätta bort all DNA?	10
Är kranvatten sterilt?	10
Ont om slang?	10
Leverans av prover (ej rekommenderat brev).....	11
Fältprotokoll eDNA	12

Allmänt

Analyser med hjälp av eDNA (environmental DNA, miljödDNA) är DNA-spår som organismer lämnar efter sig i miljön. Spåren kommer från bland annat hudceller, spillning, urin, svett, könsceller och saliv. Detektion av dessa spår kan användas för att inventera arter i olika miljöer. DNA-spår hittas både i jord, luft och vatten. På centrum för genetisk identifiering (CGI) vid Naturhistoriska riksmuseet genomför vi eDNA analyser på uppdrag av svenska myndigheter och miljöorganisationer.

Vi har stor erfarenhet från att arbeta med olika typer av material för DNA analys och kan både analysera hela artgrupper med så kallad streckkodsanalys och leta efter specifika arter som ofta kallas enartsanalys. I miljöövervakningen idag är det vanligast att jobba med vattenprover och den enklaste och mest effektiva metoden för insamling av prover är att samla in och filtrera vatten i fält. Denna manual beskriver hur provtagning av vattenprover för eDNA kan gå till och innehåller också information om vilken utrustning som krävs.

Utrustningslista

Det mesta av utrustningen som behövs för provtagning och filtrering är standardutrustning för vattenprovtagning. Specialmaterial förutom pump och slang som listas i tabellen nedan kan erhållas från CGI (cgi@nrm.se).

En bra och effektiv pump för användning i fält är ”Eijkelkamp peristaltic pump 12 vdc standard” som finns att köpa eller hyra hos bland annat [Unoson](#).

Notera att både kommuner och länsstyrelser ibland äger en dylik pump som ofta används vid grundvattenprovtagning, så det kan vara värt att kolla runt bland kollegor.

Om det inte går att filtrera i fält kan vattenprover filtreras på CGIs laboratorium. Det är då viktigt att proverna så snabbt som möjligt transporteras dit. DNA bryts ned snabbare vid höga temperaturer och starkt ljus så förvara proverna svalt och mörkt under transport. Proverna kan också frysas om de inte filtreras inom 30 timmar från provtagning. Vi förordar dock att man filtrerar i fält då det enligt vår erfarenhet ger både bättre och stabilare resultat.

Utrustning	Finns var
Peristaltisk pump (märke Unoson) – bokningsbar	Unoson
Batteriladdare – ingår i bokning av pump	Unoson (ingår i hyra)
Sterila plastflaskor (0,5 - 1,0 liter)	CGI
Stora provrör med kork för sedimentprov	CGI
Termometer	
Sterila handskar	CGI
Slang hård	Unoson eller den som äger pump
Slang mjuk	Unoson eller den som äger pump
Spruthylsor, dvs sprutor "utan nål"	CGI
Sax	
Filter (Bild 1)	CGI
Filterkorkar (Bild 2)	CGI
Buffert	CGI
Buntband	
Avbitartång	
Märkpenna	
Etiketter	
Klorin (blandas 1 + 9)	
Hink med bra lock	
Soppåsar	



Bild 1. Filter.



Bild 2. Organgefärgade filterkorkar

Utrustning att ta med i fält

- Fältblanketter
- Pump med laddat batteri
- Sterila plastflaskor
- Eventuellt provrör för sedimentprov
- Termometer
- Slangar (hård och mjuk) färdigklippta. Nya eller rengjorda med klorin 10% och kranvatten
- Sax
- Filter + filterkorkar
- Buntband och avbitartång
- Spruthylsa
- Märkpenna, etiketter och plastpåsar
- Eventuellt klorinlösning och hink, om flera prover så att rening krävs i fält
- GPS eller mobil med möjlighet att ta koordinater och bilder

Provtagning med peristaltisk pump

1. Ta koordinater, vattentemperatur + foto på platsen. Fyll i fältprotokollet
2. Ta på engångshandskar och skölj den rena provtagningsflaskan och eventuell provtagningsutrustning som håv eller liknande nedströms provpunkten, alternativt 10 m bort från punkten. Tas provet från båt, skölj på lovartsidan (vindsidan). Skölj även slangen. Notera att all utrustning som varit i kontakt med annat vatten eller motsvarande skall rengöras med 10% klorinlösning innan den sköljs av i vattnet som skall provtas.



3. Ta provet uppströms eller vid båtprovtagning på vindsidan, undvik botten. Tänk dessutom på att inte kliva ner med "smutsiga" skor nära provets insamlingsplats.
 - a. Om man vill ta ett samlingsprov från ett område kan man ta 0,5 liter från flera olika punkter och sedan blanda dessa innan filtrering.
 - b. Om det är grumligt vatten är det bra att låta flaskan stå och sedimentera ett tag innan filtreringen.



4. Klipp av 30 cm från både mjuk och hård slang, alternativt montera rengjorda färdigklippta slangar. Använd helst handskar i hanteringen nedan, så att mängden mänskligt DNA minimeras.

- i. Mjuk slang till filtret.
- ii. Var försiktig med hårda slangen så att den inte kontamineras, eftersom den ska ner i provet.
- iii. Sätt på filter och buntband för att det inte ska läcka mellan mjuk slang och filter (där metallspänne sitter på bild 5).



Bild 5.

5. Sätt på pumpen. Kontrollera att den går åt rätt håll. Stäng av.

6. Stoppa ner den hårda slangen i provet, ej i botten på flaskan (bild 6). Sätt på pump och låt filtrera minst 0,5 liter vatten, alternativt tills det tar stopp eller läcker väldigt mycket (fullt filter). Stäng av pumpen.



Bild 6.

7. Ta bort filter, klipp av buntbandet med avbitartång.
8. Skruva på spruthylsan och pressa ut så mycket vatten som möjligt (normalt 2 - 3 ggr), så att filtret blir "torrt".
9. Ta fram sprutan med buffert, ta av korken och skruva på sprutan på filtret.
10. Fyll filtret med buffert, ca 1 ml buffert.
11. Sätt på korkarna (två korkar för varje filter, återanvänd korken från lilla sprutan och ytterligare en kork som medföljer). Märk filter med datum och plats. Lägg i plastpåse och märk även denna.
12. Filtrera ett kontrollprov med kommunalt kranvatten. Detta för att aktören/företaget som analyserar filtren ska kunna se att eventuella resultat eller kontamineringar inte berott på felaktig hantering vid filtrering.
13. Skicka till aktör/företag för analys så snart som möjligt (samma dag) om det är kylt. Alternativt kyl/frys filter och skicka senare.
14. Om provvattnet ska sparas för framtiden; märk och frys detta. Annars häll ut provvattnet som är kvar och skölj provflaskan och slangarna i klorinlösningen (hinken).
15. Skicka filtren för analys.
16. Sammanställ fältprotokollen (bilaga 1), bilder, typ av analys osv och skicka till den aktör som ansvarar för analysen.

Provtagning med spruta

OBS! Återanvänd inga sprutor, flaskor eller annan provtagningsutrustning mellan prover.

1. Ta koordinater, vattentemperatur + foto på platsen. Fyll i fältprotokollet.
2. Ta på engångshandskar och skölj den rena provtagningsflaskan + ev. provtagningsutrustning som håv eller liknande nedströms provpunkten, alternativt 10 m bort. Notera att all utrustning som varit i kontakt med annat vatten eller motsvarande skall rengöras med 10% klorinlösning innan den sköljs av i vattnet som skall provtas.
3. Ta provet uppströms eller från båt. Vid provtagning från båt, ta provet på lovartsidan (sidan viden kommer ifrån), undvik botten. Tänk dessutom på att inte kliva ner med "smutsiga" skor nära provets insamlingsplats.
 - a. Om man vill ta ett samlingsprov från ett område kan man ta prover från flera olika punkter och sedan blanda dessa innan filtrering.
 - b. Om det är grumligt vatten är det bra att låta flaskan stå och sedimentera ett tag innan filtreringen.
4. Ta fram 50-ml sprutan och sylphium-filter med ventil. Skruva på sprutan på filtret (se bild 7). NB! Notera att filtret har en riktning markerat med en pil på filtret. Vattnet ska filtreras i pilens riktning (filtret doppas ner i vattnet, pilen ska peka uppåt). Filtrera hela provet genom att pumpa med sprutan, i regel ca 0,5-1 l men för mindre lokaler som diken och dammar kan mindre volymer filtreras. Notera vilken volym som filtrerats. I sällsynta fall kan en luftbubbla vid inloppet blockera vatten från att sugas in i filtret. Det räcker i så fall att 'knäppa' bort bubblan med en lätt knackning på filtret.



Bild 7. 50-ml spruta fäst vid filtret.

5. Avsluta med att lyfta upp filtret ut vattnet och så att man pumpar luft istället och på så sätt tömmer filtret på vatten.
6. Lossa och ta bort ventilen, inklusive den korta slanganslutningen från filtret. Ta fram 3-ml sprutan. 3-ml sprutan är fylld med buffert. Skruva av korken och skruva på sprutan på filtret. NB! Bufferten ska tillsättas i pilens riktning. Fyll filtret med hela buffertvolymen. Skruva av sprutan och skruva på två korkar på filtret.

7. Lägg det buffertfyllda filtret i en zip-lock påse och märk påsen med provnamn. Även filtret kan märkas.
8. Provet kan bevaras i kyl, frys eller rumstemperatur men kyl är att föredra. I kyl/frys är provet stabilt i flera veckor, i rumstemperatur upp till 2 veckor.
9. Skicka in provet, adress nedan.

Att tänka på för bra resultat

Vissa arter är enklare att jobba med än andra. För musslor ökar man chanserna till detektion om man tar prover när de är aktiva (sen vår, sommar och tidig höst typiskt) annars kan vara för små mängder DNA spår från dessa i vattnet. För groddjur är det störst chans till detektion under de perioder då djuren är aktiva. Grodrom släpper inget eller mycket lite DNA. Som med alla typer av undersökningar skall man vara försiktig med att dra slutsatser från endast en tidpunkt och/eller ett insamlingstillfälle. Detta är kanske ännu viktigare med eDNA då det är en indirekt detektion, och man inte vet ursprunget till den DNA som detekteras. Till exempel kommer organismer från avrinningsområdet ofta detekteras i ett vatten eftersom DNA-spår kan transporteras i rinnande vatten.

Som med alla typer av undersökningar skall man vara försiktig med att dra slutsatser från endast en tidpunkt och/eller ett insamlingstillfälle. Detta är kanske ännu viktigare med eDNA då det är en indirekt detektion, och man inte vet ursprunget till den DNA som detekteras. Till exempel kommer organismer från avrinningsområdet ofta detekteras i ett vatten eftersom DNA rester kan transporteras i rinnande vatten.

Uppkomna frågor

Hur gör man för att tvätta bort all DNA?

Utrustning som slangar och flaskor renas från DNA-spår med lösning bestående av 1 del klorin och 9 delar vatten. Viktigt att skölja rent efteråt, annars tar klorinet bort DNA vid nästa provtagning. Lägg gärna utrustningen i kranvatten över natten för få bort klorinet.

Är kranvatten sterilt?

När man renat en sak, t ex slang, i klorinlösning (1 del klorin 9 delar vatten) så måste klorinet sköljas bort. Kan vi då använda kranvatten?

Svar ja.

Kranvattnet är i Sverige oftast renat med UV-ljus så det är ingen större fara att skölja med det vattnet och direkt filtrera ett vattenprov på kontoret. Däremot ska man göra en filtrering med kranvattnet och skicka med det filtret (blankprov) för analys.

Gör man en filtrering i fält kan man skölja både slang och flaskor ordentligt ca 10 meter från provpunkten/nedströms eller med provtagningsvatten – så försvinner även rester av kranvattnet.

Ont om slang?

Smidigt att ta med så många slangar som det behövs vid provtagningen i fält och sedan lägga dessa i klorinlösning några minuter. Sedan kan man lägga dem i kranvatten över natten.

Leverans av prover (ej rekommenderat brev)

Prover kan lämnas eller skickas till:

Naturhistoriska riksmuseet
Centrum för Genetisk Identifiering
Svante Arrhenius väg 3
114 18 STOCKHOLM

Det är viktigt att kontakt med cgi@nrm.se sökes innan proverna skickas för att säkerställa att någon finns på plats att ta emot prover.

Bilaga 1.

Fältprotokoll eDNA

Lokal:

Datum:

Vattentemp och vädernotering:

Provtagare:

Provrnr.	Namn på provtagningspunkt	Koordinat N (SWEREF 99)	Koordinat E (SWEREF 99)	Typ av analys, eventuellt flera

Övriga kommentarer: