

DNA identificatie van keutels



Colofon

Titel	DNA identificatie van keutels
Tekst, foto's en samenstelling	K. van Bochove en J. Rook
In opdracht van	Econsultancy
Naam opdrachtgever	C. van Tuijl
Projectnummer extern	NA
Rapportnummer	RA2019177
Datum oplevering rapport	23 januari 2020
Aantal pagina's	7
Wijze van citeren	van Bochove K. 2020. DNA identificatie van keutels. Rapport RA2019177, Datura, Wageningen.
Laboratorium analist	J. Rook



Datura Molecular Solutions BV

Gevestigd te:

Agro Business Park 10
6708 PW, Wageningen
Nederland

jitske.rook@datura.nl
0031(0)628022473
www.datura.nl

Inhoudsopgave

1.	Doelstelling.....	4
2.	Methode.....	4
2.1	Sampling	4
2.2	Laboratorium analyse	4
2.3	Kwaliteitswaarborging	5
2.3.1	Hoe vals positieve waarnemingen voorkomen worden	5
3.	Resultaten	6

1. Doelstelling

Identificatie van roofdierkeutels in opdracht van Econsultancy.

2. Methode

2.1 Sampling

De bemonstering is uitgevoerd door een medewerker van Econsultancy.

2.2 Laboratorium analyse

De keutels zijn geanalyseerd op de aanwezigheid van DNA van roofdieren. Het analyseren van een DNA sample vindt plaats in vier stappen. Eerst wordt het DNA geëxtraheerd met behulp van de Powerfecal kit van Qiagen®. Vervolgens wordt het DNA geamplificeerd met specifieke markers. Tenslotte wordt het DNA gesequenced. Hiervoor wordt Sanger sequencing gebruikt en worden de gegenereerde sequenties vergeleken met bestaande sequenties.

1. Het DNA is geëxtraheerd met behulp van de PowerFecal kit van Qiagen®. Gedurende de extractie wordt het DNA gezuiverd en geconcentreerd.
2. Het vermeerderen van DNA vindt plaats door middel van een Polymerase Chain Reaction (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. De prooidieren die door vleermuizen gegeten worden zullen dus niet geamplificeerd worden. De PCR vermeerdering wordt uitgevoerd met de TaqMan® Environmental Mastermix 2.0 (Life Technologies®). Naast het DNA sample worden PCR reacties uitgevoerd waaraan geen sample is toegevoegd. Deze moeten negatief zijn. Zodoende kan bevestigd worden dat de analyse schoon is uitgevoerd en er geen contaminatie optreedt. Tenslotte worden ook enkele reacties geanalyseerd waaraan een bekende concentratie DNA is toegevoegd. Deze reacties moeten positief zijn. Dit bevestigt dat de analyse juist is uitgevoerd.
3. De geamplificeerde fragmenten (PCR producten) zijn uitgelezen met behulp van Sanger Sequencing. Sanger Sequencing leest het DNA uit van de soort waarvan het meeste DNA in het PCR product aanwezig is. Als er DNA van twee soorten aanwezig is dan resulteert dit in dubbel signaal. In dat geval kan het DNA niet uitgelezen worden.
4. De uitgelezen fragmenten zijn vergeleken met een referentiedatabase van Datura. Deze is opgebouwd uit door Datura gevalideerd materiaal en aangevuld met sequenties verkregen uit vrij toegankelijke databases. Een identificatie wordt altijd gecontroleerd door de verkregen sequenties te blasten tegen de GenBank database van de NCBI.

2.3 Kwaliteitswaarborging

2.3.1 Hoe vals positieve waarnemingen voorkomen worden

Het optreden van zowel vals positieve als vals negatieve waarnemingen wordt tot het minimum beperkt. Vals positieve waarnemingen kunnen op drie manieren ontstaan:

- Er vindt contaminatie plaats in het laboratorium;
- Er vindt contaminatie plaats in het veld.

Hieronder wordt aangegeven hoe vals positieve waarnemingen voorkomen worden. Omdat de kans op vals positieve waarnemingen zeer klein is, kunnen we niet exact kwantificeren hoe groot de kans daadwerkelijk is. Datura kan daarom niet 100 % zeker garanderen dat vals positieve waarnemingen nooit optreden. In de praktijk (middels validatie studies) nemen we echter geen vals positieve waarnemingen waar. Het is daarom aannemelijk dat vals positieve waarnemingen niet optreden.

Om vals positieve waarnemingen te voorkomen werkt Datura in een specifiek voor (e)DNA ingerichte laboratorium omgeving en worden strikte procedures gevolgd:

1. Verschillende onderdelen van de analyse workflow worden uitgevoerd in fysiek gescheiden laboratorium ruimtes. Het samenstellen van de eDNA sample kits en het voorbereiden van de (q)PCR reagentia vindt plaats in een **DNA clean room**. Dit is een ruimte waarin geen DNA samples aanwezig zijn. In deze ruimte is sprake van overdruk welke gecreëerd wordt door middel van HEPA-gefilterde lucht. Zodoende kunnen we garanderen dat er geen DNA aanwezig is in de eDNA sample kits en de reagentia (zoals de primers en probes) die later gebruikt worden in de (e)DNA analyses. De keutels zijn geëxtraheerd in een **DNA laboratorium** waarin sprake is van onderdruk om eventuele vervuilingen in de lucht direct af te voeren. In het DNA laboratorium worden samples met hogere concentraties DNA verwerkt zoals keutels en weefsels. Tenslotte wordt de (q)PCR uitgevoerd in een **post-PCR laboratorium**. In dit laboratorium wordt het eDNA vermeerderd en hier zijn dus hoge concentraties DNA aanwezig. In dit laboratorium is ook onderdruk aanwezig waardoor DNA uit de lucht direct wordt afgevoerd naar buiten.
2. Er wordt een **unidirectionele workflow** gehanteerd om contaminatie van de DNA clean room en het eDNA laboratorium te voorkomen. Dit houdt in dat materialen die eenmaal in het post-PCR laboratorium geweest zijn niet meer terug mogen naar de DNA clean room en het eDNA laboratorium. Ook mogen medewerkers van Datura niet dezelfde dag van een post-PCR laboratorium terug naar de DNA clean room en het eDNA laboratorium.
3. In iedere analyse worden **controle analyses** uitgevoerd. Zo worden er samples geëxtraheerd waaraan geen slotwater wordt toegevoegd (zogenaamde extractie controles). In de qPCR worden naast de extractie controles ook negatieve PCR controles meegenomen. Zodoende kan heel nauwkeurig gemonitord worden of er inderdaad geen contaminatie optreed.

3. Resultaten

Beide samples hadden 100% match resultaten. In sample 5011 werd Vos aangetoond en in sample 5014 wezel (tabel 1.)

Er was geen sprake van dubbel signaal. Waarschijnlijk bestaan de monsters dus zuiver uit de aangetoonde soorten. Hiervoor kunnen wij echter geen 100% zekerheid geven op basis van deze analyse. Voor een zekere identificatie van meerdere diersoorten in één monster is een complexe analyse nodig waarbij gebruik gemaakt wordt van Next Generation Sequencing.

Tabel 1, Resultaten keutel DNA analyses.

Sample nummer	Identificatie	Match percentage
5011	Vos (<i>Vulpus vulpus</i>)	100%
5014	Wezel (<i>Mustela nivalis</i>)	100%