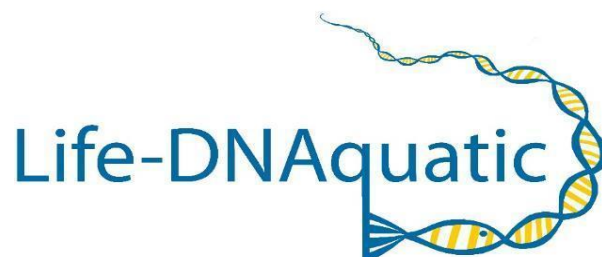


# Riktlinjer för hantering av akvatiskt eDNA som verktyg inom svensk miljöanalys

Del II: LaboratoriekraV och eDNA-extraktioner



Micaela Hellström, Martin Andersson-Li, Rein Brys, David Halfmarten,  
Bernd Hänfling, Johan Näslund, Jessica Sjöstedt, Johan Spens, Cuong Tang,  
Marcus C Öhman, Kat Bruce

AquaBiota Report 2021:10

STOCKHOLM, JULI, 2021

**Beställare:**

Rapporten är utförd av samarbetspartners inom LifeDNAquatic-projektet för Naturvårdsverket.

**Kontaktinformation:**

AquaBiota Water Research  
Adress: Sveavägen 159, 11346 Stockholm  
Tel: +46 8 522 302 40  
Mail: [info@aquabiota.se](mailto:info@aquabiota.se)  
Web: [www.aquabiota.se](http://www.aquabiota.se)

**Kvalitetsgranskad av:**

Henrik Appelgren, Gunilla Ejdung

**Internetversion:**

Nedladdningsbar hos [www.aquabiota.se](http://www.aquabiota.se)

**Citera som:**

Hellström M, Andersson-Li M, Brys R, Halfmarten D, Hänfling B, Näslund J, Sjöstedt J, Spens J, Tang C, Öhman MC, Bruce K (2021) Riktlinjer för hantering av akvatiskt eDNA som verktyg inom svensk miljöanalys, del II: LaboratoriekraV och eDNA-extraktioner. *AquaBiota Report* 2021:10

AquaBiota Report 2021:10  
Projektnummer: 2020001  
ISBN: 978-91-89085-34-3  
ISSN: 1654-7225

© AquaBiota Water Research 2021



## Innehåll

1. Bakgrund .....	4
2. Laborarieutrymmen.....	5
2.1 Krav för eDNA laboratorier .....	5
3. eDNA-extraktioner .....	7
3.1 Positiva och negativa kontroller i eDNA-extraktioner .....	7
3.1.1. Kontroller för att utesluta falska positiva och negativa prov. ....	8
3.2 eDNA-extraktion från filter .....	10
3.3 eDNA-kvantifiering och mätning av eDNA-koncentration.....	11
3.4 eDNA-inhiberingskontroll .....	12
4. Rapportering av extraktionsdata .....	12
5. Referenser .....	13
6. Projektöversikt och författaraffiliering .....	15
6.1 Om projektet.....	15
7. Tack .....	15

# 1. Bakgrund

Vid inventeringar av växter och djur i naturen finns det ett antal olika undersökningsmetoder att tillgå. Konventionella metoder för att inventera vattenlevande organismer har sina begränsningar. Det kan dels handla om hur representativa data är, dvs hur väl de fångar biologiska data, dels hur metoden i sig påverkar studieobjektet. eDNA (environmental DNA) som verktyg i miljöövervakningen ger en möjlighet att identifiera akvatiska arter över stora geografiska områden på kort tid med stor precision utan att orsaka skador på de organismer som studeras.

Tillämpligheten av eDNA baserar sig på det faktum att alla levande organismer kontinuerligt avger genetiska fotavtryck i miljön i form av slem, avföring, respiration, svett och döda celler vilka kan fångas upp ur vattensolumnen som cellulärt eller sub-cellulärt material (Turner m.fl. 2014; Wilcox m.fl. 2015; Moushomi m.fl. 2019). Intresset för eDNA har under de senaste åren ökat rejält inte minst givet metodens stora potential som ett effektivt verktyg inom miljöövervakningen.

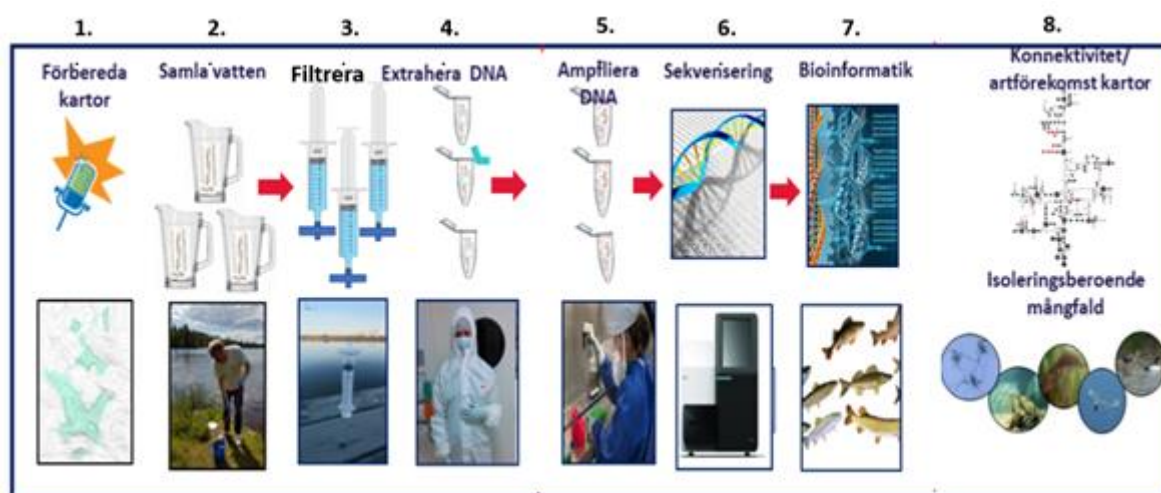
eDNA har visat sig ha särskilt stor potential som verktyg för inventering av vattenorganismer (Bohmann m.fl. 2014; Leese m.fl. 2016; Leese m.fl. 2018; Olds m.fl. 2016; Deiner m.fl. 2017). Som jämförelse har flera studier visat att eDNA i sjöar och rinnande vatten detekterar fler fiskarter än provfiske (Hänfling m.fl. 2016; Hellström & Spens 2017 a, b; Hellström m.fl. 2018), vilket även har konstaterats för musslor och groddjur (Näslund m.fl. 2019).

Eftersom eDNA förekommer i mycket små mängder och metoden är känslig är det viktigt att ta hänsyn till möjliga kontamineringskällor både i fält och i laboratorium där eDNA analyseras (Goldberg m.fl. 2016; Piggott 2016; Thalinger m.fl. 2020; Hellström m.fl. 2020). Goda och pålitliga resultat förutsätter att noggranna riktlinjer följs för både insamling och laboratorieanalyser.

Denna tekniska rapport sammanfattar riktlinjer inom EU-konsortiet DNAquaNet för laboratriekrav och extraktionsmetoder för eDNA-analyser och är anpassad till svenska förhållanden. Rapporten har finansierats av projektet LifeDNAquatic (Naturvårdsverkets utlysning i september 2018 för användning av eDNA-metoder i svensk miljöövervakning). Rapporten behandlar laboratriekrav samt riktlinjer för eDNA-extraktioner och är en uppföljning till Del I: Insamling i fält, filtrering och konservering version 1.0 (Hellström m.fl. 2021). Figur 1 sammanfattar de olika faserna för eDNA analys från planering till färdigt fleranalysdata. Steg 1–4 är identiska för en- och flerartsanalyser. Steg 1, 2 och 3 behandlas i del I i denna rapportserie och del II (denna rapport) ger en översikt av eDNA, hur eDNA utvinns och vad som är viktigt att tänka på vid eDNA-extraktioner.

## 2. Laborieutrymmen

Typiskt för ett eDNA-prov är att koncentrationen av DNA oftast är mycket låg och proverna bör behandlas som degraderade prover att jämföras med forensisk DNA eller antikt DNA. Detta gör att eDNA-prover lätt påverkas av föroreningar från annat DNA, både från insamlaren och från den omgivande miljön. På grund av denna egenskap är det av stor vikt att vidta försiktighetsåtgärder för att undvika kontamineringar (Goldberg m.fl. 2016). ISO-standarder för eDNA laborier kommer att utarbetas inom de närmaste åren, fram till dess är det viktigt att det molekylära arbetet utförs enligt praxis för molekylära metoder samt att eDNA-prover analyseras med försiktighet.



**Figur 1.** Flödesschema för eDNA-provtagning från förberedelser till resultat. Rapport Del I i denna serie behandlar fas 1–3, och denna rapport behandlar utvinning eller extraktioner av DNA – fas 4.

### 2.1 Krav för eDNA laborier

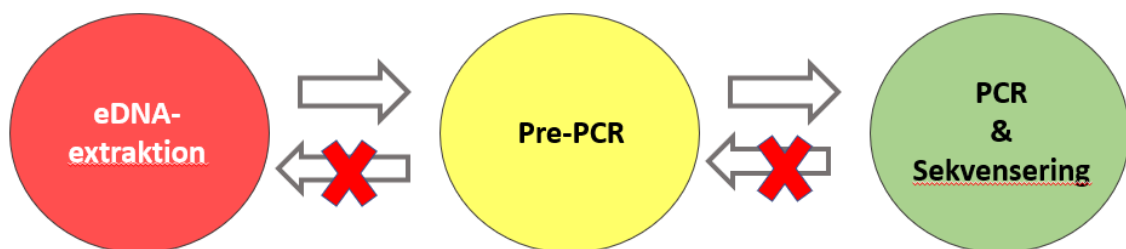
Alla sorters laborieundersökningar kan leda till felmarginaler om inte nödvändiga åtgärder vidtas.

- När eDNA proverna anländer till laboriet är det viktigt att proven rengörs på utsidan innan de flyttas in till laboriet
- Extraktionerna bör ske i utrymmen enbart avsedda för eDNA-extraktioner och inte i utrymmen där vävnadsprover extraheras (Taberlet m.fl. 2018; Goldberg m.fl. 2016; Thalinger m.fl. 2020).
- Extraktionsutrymmet bör vara fysiskt åtskilt från prepareringslaboriet för PCR - som i sin tur bör vara separerat från PCR- och sekvenseringslaboriet.

- All utrustning så som pipetter och annan laboratorieutrustning ska inte lämna laboratoriet. Lådor med provrör, kits och andra engångsprodukter skall avkontamineras (se nedan) innan de förs in i laboratoriet.
- Extraktionsrummet ska rengöras med DNA-dödande medel. Notera att autoklavering inte är effektivt för att avlägsna DNA från ytor (Unnithan m.fl. 2014). DNA-dödande ämnen, som inte innehåller klorin, kan med fördel användas. Exempel på alternativa produkter för detta ändamål är LabClean, PCRClean från Minerva laboratories. Det vanligaste medlet för att avlägsna eDNA-spår i laboratorier är hypoklorit (50% klorin industriell grad), och därefter 70% alkohol. Hypoklorit dödar DNA men kloreten kan reagera med saltet guanidinium thiocyanat som finns i extraktionsbuffertarna i extraktionskiten vilket gör att vätecyanidgas kan bildas, därför är avtorkning av ytorna med etanol efter rengöring med klorinpreparat viktig.
- Extraktionerna bör ske under en laminär flödeskåpa som har rengjorts och sedan behandlats med UV-ljus före extraktionen.
- UV-ljus bör finnas i flödeskåpan.
- Positivt tryck, HEPA-filtrer för inflöden samt UV-ljus rekommenderas för hela laboratoriet.
- Enbart personal som utbildats både praktiskt och teoretiskt i eDNA-extraktioner ska vistas i laboratoriet och utföra arbetet. Personalen bör även ha genomgått utbildning i molekylär laboratorieanvändning och säkerhet, vilket innefattar förståelse för reagenser och första hjälp.
- Skyddskläder såsom skoskydd, munskydd, hårskydd och laboratorierock (gäller även engångslaboratoriedräkt) och engångslaboratoriehandskar är nödvändiga. Laborierkläder för extraktioner kan inte användas i andra laboratorier. Varje enskilt laboratorieutrymme behöver en egen uppsättning av laborierkläder som är avsedda enbart för det designerade utrymmet.
- Dubbla handskar ska användas. Torka av handskarna med avkontamineringsmedel och byt yttre lagret av handskar ofta under processens gång. Med dubbla handskar exponeras aldrig nakna händer som annars kan avge DNA i laboratoriet.
- Utrustningen i eDNA-laboratoriet bör inte lämna extraktionsrummet och tas in igen, vilket inkluderar pennor och anteckningsblock. Om t.ex. ett anteckningsblock tas ut ur rummet ska det inte föras tillbaka till extraktionsutrymmet.
- Laborariearbete med eDNA kräver en noggrann planering med tanke på kontamineringsrisken mellan de olika laboratorierna. För att förhindra kontaminering mellan de olika stegen i DNA-analyserna ska teknikerna som utför extraktionerna inte besöka extraktionslaboratoriet om de vistas i pre-PCR-, PCR- eller post-PCR- utrymmen under samma dag. Flera laboratorier använder trafikljus från rött till grönt som en guide över hur man kan röra sig mellan laboratorierna (figur 2). Om personalen behöver gå från laboratorierna för vidare analys i extraktionslaboratorierna behöver de avkontamineras genom att duscha, byta kläder och klä sig i laborierockar, engångsdräkter, munskydd, fotskydd och handskar som är avsedda för extraktionslaboratoriet.

- Det är viktigt att laboratoriepersonalen bekantar sig med anvisningarna för användningen av rengöringsprodukterna före användning. Efter användning av extraktionslaboratoriet ska alla arbetsbänkar, pipetter, centrifuger, kylskåpshandtag, värmeblock, golvmattor rengöras med DNA-dödande ämnen.
- Efter varje användning blötläggs provrörsställningar i avkontamineringsmedel enligt tillverkarens föreskrifter.
- Extraherat eDNA bör bevaras i för eDNA avsedda utrymmen (-20°C eller -80°C beroende på vilken elueringsvätska som används).

### Flödesschema för vistelse i olika analyslaboratorier under en dag



**Figur 2.** Vistelschema för teknisk personal i de olika laboratorierna under en dag. Denna rapport behandlar enbart eDNA-extraktion.

## 3. eDNA-extraktioner

eDNA-extraktioner innebär att DNA utvinns från ett prov genom olika steg av sönderdelnings- och reningsprocesser som resulterar i ett prov med rent DNA, fritt från andra cellkomponenter. Det filtrerade provet som ankommer i laboratoriet behöver rengöras på utsidan från kontamineringar innan provet förs in i laboratoriet. DNA-dödande medel som 50% hypoklorit eller DNAway rekommenderas för att rengöra filterkapslar och provrör från DNA-kontamineringar på utsidan.

DNA-extraktioner innefattar olika steg i laboratoriet från att filtren anländer till att utvunnet eDNA bevaras i ett provrör. De olika utvinningsstegen delas in i, sönderdelningsfas (lysering), bindningsfas (eDNA binds till ett substrat), tvättningsfas (de celldelar som inte är DNA tvättas bort) och elueringsfas (eDNA fälls ut i en konserveringsvätska).

### 3.1. Positiva och negativa kontroller i eDNA-extraktioner

Att inom miljöövervakning dra slutsatser baserat på artförekomst från eDNA-studier kräver data som med säkerhet kan indikera artens närvaro eller frånvaro vid en given lokal. Data som baseras på enarts- eller flerartsanalyser av eDNA som ska fungera som underlag för åtgärder,

artskydd, tillståndsprövningar eller olagliga utsättning ska kunna säkerställas genom att använda kontroller under hela provtagnings- och analysprocessen. Varje utövare av genetiska analyser behöver känna till och ha erfarenhet av molekylära laboratorieprocesser och praxis. Detta gäller grundläggande genetiska analyser (Griffiths m. fl. 2015), kriminaltekniska protokoll (Board 2000; Brandhagen m. fl. 2020) och medicinska användningsområden (Precone m. fl. 2018). eDNA-undersökningar (Goldberg m. fl. 2016) kräver förutom kunskap och erfarenheter av molekylärbiologisk praxis även ytterligare rutiner för att säkra resultatens tillförlitlighet vilket betyder att varje steg under provtagning och analyser behöver kvalitetskontroller.

### **3.1.1. Kontroller för att utesluta falska positiva och negativa prov.**

Negativa och positiva kontroller är viktiga för att avgöra om proverna är rena från föroreningar och för att vara säkra på att de olika stegen inom analysen lyckats.

#### *Negativt kontrollprov och falska positiva prover*

Ett negativt kontrollprov förväntas inte ge utslag för DNA för de arter som undersöks och nollhypotesen är att alla prover innehåller mål-DNA. Om ett negativt kontrollprov är negativt förkastas nollhypotesen. Om provet är positivt godtas nollhypotesen och slutsatsen blir att den negativa kontrollen innehåller DNA. Detta kan liknas vid pojken som slog larm om att vargen kommer fast det inte fanns någon varg, ibland även kallat falsk positiv kontroll.

Notera att falska positiva utslag kan uppkomma i fältprover vid eDNA-analyser och artens DNA detekteras fast den inte är närvarande. Exempel på detta är fåglar, uter och mink som äter fisk i en sjö och förorenar nästa fiskfria sjö med avföring och därmed sprider DNA signaler. Närhet till avloppsrör, restauranger och bebyggelse kan ge falska positiva utslag. Eftersom eDNA lätt förorenas från omgivningen och även provtagarna är det viktigt att ta hänsyn till alla situationer som kan ge upphov till falska positiva utslag.

#### *Positiva kontrollprov och falska negativa prover*

Ett positivt kontrollprov innehåller en eller flera sekvenser av målarter (s.k. "mock communities" eller DNA från vävnadsprov) och förväntas ge positiva utslag. Ett positivt prov som inte ger en eDNA-signal fast en art är närvarande kallas för falsk negativ och kan uppkomma om proverna inte är insamlade inom rätt område (Hellström m.fl. 2020), om det är för få prover, eller om proverna är inhiberade (se avsnitt 3.4). Tabell 1 summerar positiva och negativa kontroller som rekommenderas vid eDNA-analyser för kvalitetssäkring.

Negativ filterkontroll innebär att ett filter behandlas precis på samma sätt som proverna som innehåller DNA men istället för vatten från akvatiska miljöer används DNA-fritt vatten som filtreras. Om proverna konserveras med lyseringsbuffert (se nedan) ska även en så kallad IPC (Internal Positive Control), eller exogen intern positiv kontroll, adderas till bufferten. IPC kan köpas kommersiellt och innehåller artificiellt DNA som inte finns i naturen. För prover som bevaras i andra medier än lyseringsbuffert tillförs IPC med lyseringsbuffert i laboratoriet. IPC tillförs lyseringsbufferten (se nedan) i en känd koncentration för att avgöra om extraktionen



lyckats. Den interna kontrollen testas med qPCR eller ddPCR i laboratorieprocedurerna som används efter DNA extraktion. IPC ger ett mått på hur väl extraktionen lyckats. I laboratoriet tillförs även en extraktionskontroll där ett laboriefilter filtreras med rent vatten och tillförs sedan lyseringsbuffert som innehåller en IPC och extraheras tillsammans med de andra proverna. Negativa kontroller är viktiga för att försäkra sig om att proverna inte har förorenats av DNA från föroreningskällor i fält eller laboratorium.

**Tabell1:** Positiva och negativa kontroller som extraheras

Skede i flödesschema	Positiv kontroll	Negativ kontroll	
<b>Planering</b>	Identifiera lokal i fält där målarterna inte förekommer	Identifiera lokal i fält där målarterna förekommer	Om möjligt
<b>Fältkontroll</b>	Provta i lokal i fält där målarterna inte förekommer	Provta i lokal i fält där målarterna förekommer	Om möjligt
<b>Filterkontroll</b>		Filtrera en negativ kontroll samtidigt som fältproverna filtreras. Destillerat vatten, DNA-fritt vatten eller mineralvatten kan användas.	Mycket viktigt
<b>Extraktionskontroll</b>	Tillsätt ICP (se text) i lyseringsbufferten (LB). Om provet fixeras i LB redan i fält kontrollera att ICP tillförs. Provet kvantifieras för ICP med qPCR eller ddPCR.	Kontroller filtreras med DNA fritt vatten i laboratoriet. Tillsätt ICP i lyseringsbufferten. Extrahera kontrollerna tillsammans med proverna.	Mycket viktigt
<b>eDNA inhiberingskontroll</b>	Kontrollera om proverna är inhiberade för att undvika typ II fel. Analysera målarternas DNA med qPCR, med spädning eller kontrollera att förhållandet 230/260 finns inom rimliga värden med hjälp av Nanodrop.		Mycket viktigt

## 3.2 eDNA-extraktion från filter

Extraktionsprotokoll för att utvinna eDNA baseras på modifieringar av kommersiella DNA-extraktionskit (t.ex. Qiagen DNeasy, MoBio Power Water or Power Soil kits), kolumnbaserade (Sellers et al. 2018) eller vätskefasmetoder (Deiner m. fl. 2018; Renshaw m. fl. 2015). eDNA-resultat och data som används för rutinmiljöövervakning med slutanvändare som myndigheter eller industrin behöver vara jämförbara. Därför rekommenderas kommersiella kit eller modifieringar av dessa eftersom reagenserna i kiten är standardiserade och certifierade för att vara fria från biologisk kontaminering. Protokoll för vätskefasmetoder med fenolkloroformisoamyl är effektiva och producerar DNA med höga koncentrationer (Deiner m.fl. 2015). Samtidigt är fenol och kloroform olämpliga ur miljö- och hälsosynpunkt vilket gör att metoden undviks av kommersiella laboratorier.

DNA-extraktioner som baseras på kommersiella kit med eller utan avvikelser från grundprotokollet har fördelen att reagenserna är certifierade och varierar inte mellan kit och olika tillverkningsomgångar. I kiten medföljer protokoll, och även säkerhetsföreskrifter, som bör följas både med tanke på utförarens säkerhet och det slutgiltiga resultatet. Flera kommersiella extraktionskit innehåller guanidium thiocyanat eller guanidium hydroklorid vilka som nämnts tidigare, kan reagera med klorin och bilda farliga gaser, bl.a. vätecyanidgas.

De initiala stegen för DNA-extraktioner bör vara anpassade efter filtertyp och konserverings-typ av filtren (Spens m.fl. 2017; Hellström m.fl. 2020). Typen av lysering (sönderdelningsfas av celler) beror på vilka taxa som skall analyseras. Vattenprover som filtreras för eDNA-analyser innehåller enskilda celler från vertebrater och evertebrater och kan lätt delas sönder kemiskt med hjälp av en lyseringsbuffert. Kiselalger kräver mekanisk sönderdelning för att cellväggarna skall brytas ner. För analys av kiselalger från filter rekommenderas öppna filter. Om slutna filter används bör filtret avlägsnas för mekanisk sönderdelning där cellväggarna spräcks genom att använda små glaskulor eller sonikering (proverna utsätts för ultraljud för att sönderdela cellerna).

Enzymet proteinas-K tillförs för att bryta ner enzymer såsom DNas I (Deoxiribonukleas I) som annars bryter ner DNA i det extraherade provet över tid. Prover som extraheras utan proteinas K kan hålla länge om de bevaras på ett riktigt sätt, men sönderfall är oundvikligt om proverna bevaras under en längre tid utan proteinas K. Den sista fasen av DNA extraktioner är den så kallade elueringsfasen då DNA som finns i pelletform eller är bundet i ett filter (beroende på extraktionsmetod) blir upplöst i DNA-konserveringsvätska. De kommersiella kiten innehåller en buffert som mest består av vatten. Vätskan kan med fördel bytas ut till molekylär grad buffert TE pH 8 vilket gör att DNA-integriteten bevaras och proverna kan fraktas mellan olika laboratorier i rumstemperatur. I elueringsfasen rekommenderas att vätskan värms upp till 70°C för att uppnå högre DNA-koncentrationer.

### 3.3 eDNA–kvantifiering och mätning av eDNA–koncentration

De mest använda eDNA-kvantifieringssystemen som används för extraherat DNA är Qubit fluorometer (Invitrogen, Carlsbad CA) och Nanodrop spektrofotometer (Thermo Scientific, Waltham MA).

Nanodrops totala DNA-koncentration är baserad på förhållandet 260/280 nm våglängd. Nanodrops DNA koncentration ger ofta för höga mätvärden och kan ge ett högre total-läsningvärde än Qubit. Nanodrop visar en kurva på en skärm som ger en indikation på DNA-kvalitet. Förhållandet 260/280 ska ligga mellan 1.8 och 2.0 för högkvalitativt DNA, och andra värden ger en indikation på RNA och protein-föroreningar i provet. En nanodropläsning på förhållandet 260/230 nm bör ligga över 1.8., ett lägre värde ger en indikation på att det finns föroreningar i form av fenol, salt, protein eller polysackarid i provet (Olson och Morrow 2012). Nanodrop kan mäta ett stort antal DNA-prov på kort tid. Två µl DNA överförs i små tuber eller plattor och pipetteras på en fluorescensmätare. Mätningen kräver få förberedelser. Data från mätningarna sparas i en Excel-fil och noteras. Nanodrop är dyrare än Qubit, men generellt betalar det sig genom att ingen dyr kemi krävs för att använda instrumentet.

Qubit baseras på att ett färgämne interkaleras i dubbelsträngat DNA. Qubit kan mäta DNA vid mycket låga koncentrationer. Den omgivande temperaturen påverkar läsningvärdet. Användning av Qubit kräver mer förberedelser i laboratoriet och metoden är även kritisk då det gäller tid. Qubit-protokollet innefattar en blandning av reagenser precis före mätningen och kvaliteten av prover bibehålls under ca 10 minuter. Läsningarna kan göras både för höga koncentrationer (>20 ng/µl) eller låga koncentrationer (<20 ng/µL). Eftersom koncentration av total DNA varierar mycket i eDNA-prover behövs ibland de prover som visar en koncentration på >20 ng/µl spädas ut och sedan omräknas koncentrationen. Innan arbetet påbörjas ska användaren besluta om hög- eller lågkoncentrationsspektrumet ska användas eftersom de olika läsningregionerna använder olika reagenser. I laboratorier där båda instrumenten är tillgängliga används Qubit för koncentrationsmätningar och Nanodrop för att mäta DNA-kvalitet.

Nanodrop och Qubit mäter total DNA i provet vilket betyder att även annat DNA än målarternas DNA mäts. Ett prov rikt på bakterier kan innehålla stora mängder bakterie-DNA och små mängder DNA av den eller de arter som analyseras. DNA som används för enarts-analyser genom qPCR eller ddPCR ger en uppfattning om hur mycket DNA från målarten som finns i provet. Om proverna ska analyseras med flerartsanalyser genom metabarkodning rekommenderas att proverna testas med qPCR eller ddPCR där metabarkodningsprimer används för att ge en uppfattning av målarternas koncentration i provet. qPCR i spädningsserier används även för att avgöra om provet är inhiberat (se avsnitt 3.4)

### 3.4 eDNA–inhiberingskontroll

DNA frigörs inte alltid som det ska under eDNA-extraktionen. Detta kallas DNA-inhibering. DNA kan vara bundet till partiklar i provet från t.ex. lera. Organiska ämnen som finns i vattnet, exempelvis tanniner från nedbrutna löv kan påverka extraktionerna. Andra inhiberingskällor är avföring från nötkreatur som hamnat i vattnet vilket påverkar extraktionerna negativt (Wilson 1997; Rapp 2010). Inhibering av DNA är vanligt i prover som tagits i grumligt vatten. Extraktionskit för avföringsprover, vatten eller jordprover innehåller komponenter som motverkar inhibition. Extraktionsprotokoll som innehåller trisodiumfosfat motverkar inhibering (Ogram m.fl. 1987; Sellers m. fl. 2018). Så är inte fallet med extraktionskit som är ämnade för vävnads- eller blodprover. Eftersom dessa extraktionskit ofta används för vattenprover behöver proverna kontrolleras för inhibering som vid behov avlägsnas med antiinhiberingskit för att DNA ska kunna användas i vidare analyser.

Extraktionseffektivitet och inhibition kan mätas med interna positiva kontroller (se avsnitt 3.1.1.) och spädningsserier som analyseras med qPCR. Spädning av eDNA gör att inhiberingen minskar, samtidigt finns det en risk att DNA-koncentrationen blir för låg, vilket kan leda till falska negativa resultat. Om spädningsserier används i en analys är det viktigt att öka antalet PCR-replikat i vidare analyser samt att öka volymen extraherat DNA i varje prov.

## 4. Rapportering av extraktionsdata

Det är viktigt att eDNA-resultat mellan olika laboratorier kan jämföras. Extraktionerna skall rapporteras enligt praxis för molekylärbiologiska laboratorier och innefattar följande:

- Extraktion av öppna eller slutna filter.
- Typ av kit samt tillverkare.
- Modifieringar av protokoll som avviker från kit (ändrade volymer av reagenser eller avvikande lyserings- och inkubationstid).
- Om kit inte används ange eller citera extraktionsprotokoll.
- Typ av elueringsvätska.
- Elueringsvolym.
- Total DNA-koncentration alternativt målartskoncentration samt tillverkare av mätinstrument.
- Inhibitionstest samt typ av inhiberingstest.
- Antiinhiberingskit och avvikelser från protokoll.

## 5. Referenser

- Board, D. A. 2000. Quality assurance standards for forensic DNA testing laboratories. *Forensic Sci. Commun.* 2.
- Bohmann, K. A, Evans, M. T. P., Gilbert, G. R., Carvalho, S., Creer, M., Knapp, D. W, Yu, D. W., de Bruyn M. 2014. Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in Ecology & Evolution* 29:358 – 367.
- Brandhagen, M. D., Just, R. S., Irwin, J. A. 2020. Validation of NGS for mitochondrial DNA casework at the FBI Laboratory. *Forensic Science International: Genetics* 44: 102151.
- Deiner, K., Bik, H. M., Maschler, E., Seymour, M., Lacoursiere-Roussel, A., Altermatt, F., Creer, S., m. fl. 2017. Environmental DNA metabarcoding: transforming how we survey animal and plant communities." *Molecular Ecology* 26: 5872–95.
- Deiner, K., Lopez, J., Bourne, S., Holman, L., Seymour, M., Grey, E. K., ... Rius, M. 2018. Optimising the detection of marine taxonomic richness using environmental DNA metabarcoding: the effects of filter material, pore size and extraction method. *Metabarcoding and Metagenomics* 2: e28963.
- Deiner, K., Walser, J. C., Mächler, E., Altermatt, F. 2015. Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA. *Biological Conservation* 183: 53-63.
- Goldberg, C. S., Turner, C. R., Deiner, K., Klymus, K. E., Thomsen, P. F., Murphy, M. A., ... Laramie, M. B. (2016). Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods in Ecology and Evolution* 7: 1299-1307.
- Griffiths, J. F., Griffiths, A. J., Wessler, S. R., Lewontin, R. C., Gelbart, W. M., Suzuki, D. T., Miller, J. H. 2005. An introduction to genetic analysis. *Macmillan*.
- Hellström, M., Spens, J. 2017 a. eDNA - Fiskförekomst i 10 kustmynnande vattendrag, Norrbottens län *AquaBiota Rapport* 2017:10. 30 sid. ISBN: 978-91-85975-67-9
- Hellström, M., Spens, J. 2017 b. eDNA - Fiskinventering vid Spjutmo kraftverk. *AquaBiota Rapport* 2017:12. 29 sid. ISBN: 978-91-85975-69-3
- Hellström, M., Wijkmark, N., Spens, J. 2018. Fiskinventering med hjälp eDNA i Ore Älv, Dalarnas län. *AquaBiota Rapport* 2018:11
- Hellström, M., Andersson-Li, M., Brys, R., Halfmarten, D., Hänfling, B., Näslund, J., Sjöstedt, J., Spens, J., Tang, C., Öhman, M. C., Bruce, K. 2021. Riktlinjer för hantering av akvatiskt eDNA som verktyg inom svensk miljöanalys. Del I: Insamling i fält, filtrering och konservering. *AquaBiota Report* 2021: 09
- Hänfling, B., Handley, L. L., Read, D. S., Hahn, C., Li, J., Nichols, P., Blackman, R. C., Oliver, A., Winfield, I. J. 2016. Environmental DNA metabarcoding of lake fish communities reflects long-term data from established survey methods. *Molecular Ecology* 25: 3101–19.
- Leese, F., Altermatt, F., Hellström, M. + 103 författare, Stenke D. 2016. DNAqua-Net: Developing new genetic tools for bioassessment and monitoring of aquatic ecosystems in Europe. *Research Ideas and Outcomes* (Rio), 2, e11321
- Leese, F., Bouchez, A., Abarenkov, K., Altermatt, F., Borja, Á., Bruce, K., Ekrem, T. m.fl.. 2018. Why We Need Sustainable Networks Bridging Countries, Disciplines, Cultures and Generations for Aquatic Biomonitoring 2.0: A Perspective Derived From the DNAqua-Net COST Action. *Next Generation Biomonitoring: Part 1*. <https://doi.org/10.1016/bs.aecr.2018.01.001>.
- Longmire, J. L., Maltbie, M., Baker, R. J. 1997. Use of "lysis buffert" in DNA isolation and its implication for museum collections. *Museum of Texas Tech University*.
- Moushomi, R., Wilgar, G., Carvalho, G., Creer, S., Mathew Seymour, M. 2019. Environmental DNA size sorting and degradation experiment indicates the state of *Daphnia magna*, mitochondrial and nuclear eDNA is subcellular. *Scientific Reports* 9: 12500.
- Näslund, J., Didrikas, T., Hellström, P., Hellström, M. 2019. Inventering av fiskfaunan i Gåsefjärden, Karlskrona Skärgård, med nätprovfiske och eDNA. *Länsstyrelsen Blekinge län, Rapport* 2019:21

ISSN: 1651-8527

- Ogram, A., Saylor, G. S., Barkay, T. 1987. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of Microbiological Methods* 7: 57-66.
- Olson, N. D., Morrow, J. B. 2012. DNA extract characterization process for microbial detection methods development and validation. *BMC Research Notes* 5(1), 668.
- Renshaw, M. A., Olds, B. P., Jerde, C. L., McVeigh, M. M., Lodge, D. M. 2015. The room temperature preservation of filtered environmental DNA samples and assimilation into a phenol–chloroform–isoamyl alcohol DNA extraction. *Molecular Ecology Resources*, 15: 168-176.
- Rapp, D. 2010. “DNA Extraction from Bovine Faeces: Current Status and Future Trends.” *Journal of Applied Microbiology* 108: 1485–93.
- Salis, R., Beermann, A., Macher, J., Matthaei, C., Piggott, J., Weigand, A., ... Leese, F. 2018. Let me see your iD: Impacts of Environmental Stressors on Aquatic Ecosystems Assessed by (e) DNA Metabarcoding. *Biodiversity Information Science and Standards*.
- Sellers, G. S., Di Muri, C., Gómez, A., Hänfling, B. 2018. Mu-DNA: a modular universal DNA extraction method adaptable for a wide range of sample types. *Metabarcoding and Metagenomics* 2: e24556.
- Spens, J., Evans, A. R., Halfmaerten, D., Knudsen, S. W., Sengupta, M. E., Mak, S. S., ... Hellström, M. 2017. Comparison of capture and storage methods for aqueous microbial eDNA using an optimized extraction protocol: advantage of enclosed filter. *Methods in Ecology and Evolution* 8: 635-645.
- Taberlet, P., Bonin, A., Coissac, E., & Zinger, L. 2018. Environmental DNA: For biodiversity research and monitoring. *Oxford University Press*.
- Thalinger, B., Deiner, K., Harper, L. R., Rees, H. C., Blackman, R. C., Sint, D., ... Bruce, K. 2020. A validation scale to determine the readiness of environmental DNA assays for routine species monitoring. *BioRxiv*.
- Turner, C. R., Barnes, M. A., Xu, C. C.Y., Jones, S. E., Jerde, C. L., Lodge, D. M. 2014. Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA. *Methods in Ecology and Evolution* 2014 5: 676–84.
- Unnithan, V. V., Unc, A., Joe, V., Smith, G. B. (2014). Short RNA indicator sequences are not completely degraded by autoclaving. *Scientific reports* 4: 4070.
- Wilcox, T. M., McKelvey, K. S., Young, M. K., Lowe, W. H., Schwartz, M. K. 2015. Environmental DNA particle size distribution from Brook Trout (*Salvelinus fontinalis*). *Conservation Genetics Resources* 7: 639-641.
- Griffiths, A. J. F., Wessler, S. R., Carroll, S. B., Doebley, J. 2015. An Introduction to Genetic Analysis. *W. H. Freeman*.
- Wilson, I. G. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3741.

## 6. Projektöversikt och författaraffiliering

### 6.1 Om projektet

Naturvårdsverkets och Havs och Vattenmyndighetens satsning ”forskningsmedel för DNA-metoder inom miljöövervakning”. Projektet LifeDNAquatic (Dnr 802-0183-18). Författarna svarar själv för innehållet och anges vid referens till forskningen 2019 - 2021.

#### *Projektledare*

- Marcus C Öhman

#### *Vetenskaplig projektledare*

- Micaela Hellström

#### *Deltagande forskare i LifeDNAquatic*

- Marcus C Öhman, AquaBiota Water Research, Sverige
- Micaela Hellström, MIX Research, Sverige
- Martin Andersson-Li, AquaBiota Water Research, Sverige
- Jessica Sjöstedt, MoRe Research, Sverige
- Johan Näslund, Naturvårdsverket (tidigare AquaBiota Water Research), Sverige
- Johan Spens, SLU/Limnordic, Sverige
- Rein Brys, Research Institute Nature and Forest (INBO), Belgien
- David Halfmarten, Research Institute Nature and Forest (INBO), Belgien
- Kat Bruce, NatureMetrics, Storbritannien
- Cuong Tang, NatureMetrics, Storbritannien
- Bernd Hänfling, University of Hull, Storbritannien

Innehållet i denna rapport baseras delvis på en rapport inom EU konsortiet COST DNAquaNet inom arbetsgrupp WG3 där Kat Bruce, Rosetta Blackmann, Sarah Bourlet, Micaela Hellström och Kristy Deiner är huvudförfattare.

## 7. Tack

Tack till Ylva Jondelius för kommentarer och konstruktiva eDNA-diskussioner. Tack till Henrik Appelgren och Gunilla Ejdung som granskade rapporten.