

# 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

<b>Innehåll.....</b>	<b>2</b>
<b>Allmänt.....</b>	<b>3</b>
<b>Utrustningslista .....</b>	<b>3</b>
<b>Ta med i fält.....</b>	<b>5</b>
<b>Provtagning med peristaltisk pump .....</b>	<b>5</b>
<b>Provtagning med spruta.....</b>	<b>8</b>
<b>Uppkomna frågor.....</b>	<b>9</b>
Hur gör man för att tvätta bort all DNA?.....	9
Kranvatten steril?.....	9
Ont om slang? .....	9
Att tänka på för bra resultat.....	9
Leverans .....	10
<b>Bilaga 1. Fältprotokoll .....</b>	<b>11</b>

## 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 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](mailto: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 <http://unoson.se>.

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) – <b>bokningsbar</b>	Unoson
Batteriladdare – <b>ingår i bokning av pump</b>	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	CGI
Filterkorkar	CGI
Buffert	CGI
Buntband	
Avbitartång	
Märkpenna	
Etiketter	
Klorin (blandas 1 + 9)	
Hink med bra lock	
Soppåsar	



Filter till vänster och orangefärgade filterkorkar till höger

## Ta med i fält

Fältblanketter	
Pump med laddat batteri	
Sterila plastflaskor	
Ev provrör för sedimentprov	
Termometer	
Slangar (hård och mjuk) färdigklippta Nya eller rengjorda med klorin 10% + kranvatten	
Sax	
Filter + filterkorkar	
Buntband och avbitartång	
Spruthylsa	
Märkpenna, etiketter och plastpåsar	
Ev 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 + ev. provtagningsutrustning som håv eller liknande nedströms provpunkten, alternativt 10 m bort. Tas provet från båt, skölj på lovartsidan. 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 + buntband för att det inte ska läcka mellan mjuk slang och filter (där metallspänne sitter på bilden nedan)



5. Sätt på pumpen. Kontrollera att den går åt rätt håll. Stäng av
6. Stoppa hårdare slangen i provet (ej i botten på flaskan), 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.



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 håll ut provvattnet som är kvar och skölj provflaskan och slangarna i klorinlösningen (hinken)
15. Skicka filtren för analys
16. Sammanställ fältprotokollen, bilder, typ av analys osv och skicka till den aktör som ansvarar för analysen.

## Provtagning med spruta

NB! 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. Tas provet från båt, skölj på lovartsidan. 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. Ta fram 50-ml sprutan och sterivex-filter. Dra ut sprutkolven från spruthylsan. Skruva på filtret. Fyll sprutan med provvatten och tryck i sprutkolven. Filtrera hela provmängden. Skruva av filtret och fyll på nytt sprutan med provvatten. Skruva på filtret igen och filtrera hela provmängden. Upprepa tills vattnet är slut eller tills det inte går att filtrera mer vatten. Notera vilken volym som filterats.



5. Fyll sprutan med luft, skruva på filter och pressa ut så mycket vatten som möjligt från filtret.
6. Ta fram 3-ml spruta. 3-ml sprutan är fylld med 1 ml buffert. Skruva av den orangea korken på och skruva på sprutan på filtret. Fyll filtret med ca 1 ml buffert. Skruva av sprutan och skruva på två orangea 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.
9. Skicka in provet.

## 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.

### Kranvatten steril?

**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.

### 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 det släpper könsceller då det annars kan vara för

små mängder DNA spår från dessa i vattnet. För grodor, paddor och salamandrar är det störst chans till detektion under de perioder då djuren är aktiva.

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.

### **Leverans**

Prover kan lämnas eller skickas till:

Naturhistoriska riksmuseet  
Centrum för Genetisk Identifiering  
Niclas Gyllenstrand, Thomas Källman  
Svante Arrhenius väg 3  
114 18 STOCKHOLM

Det är viktigt att kontakt med [cgi@nrm.se](mailto:cgi@nrm.se) sökes innan det skickas för att säkerställa att någon finns på plats att ta emot prover.

# Bilaga 1. Fältprotokoll

## FÄLTBLANKETT eDNA

Lokal:

Datum:

Vattentemp och vädernotering:

Provtagare:

Prov nr	Ev namn provtagningspunkt	Koordinat N (SWEREF 99)	Koordinat E (SWEREF 99)	Typ av analys, ev flera

Övriga kommentarer: