



Iceland
Liechtenstein
Norway grants



KESKKONNAMINISTEERIUM



Keskkonna DNA (eDNA) metoodika põhimõtted võõrvähkide tuvastamisel

Lilian Pukk, PhD



Veterinærinstituttet
Norwegian Veterinary Institute

18. mai, 2022

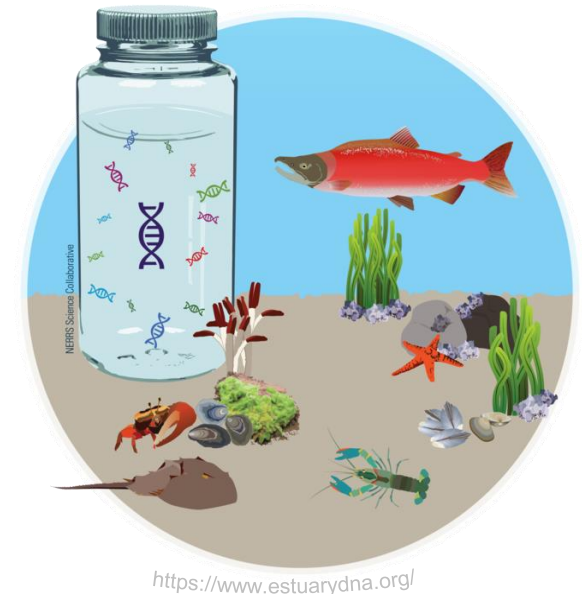
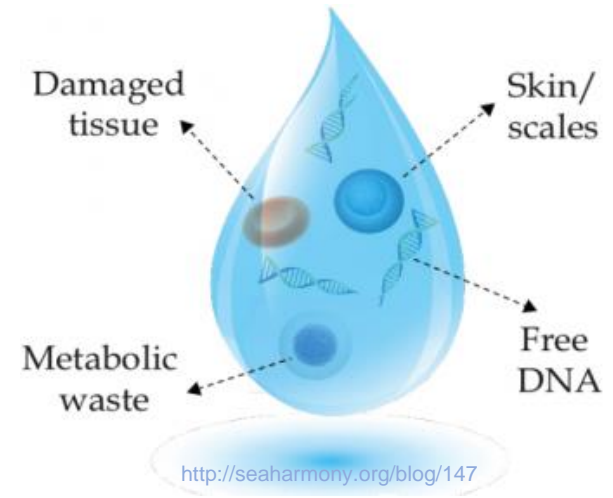
Tartu



Eesti Maaülikool
Estonian University of Life Sciences

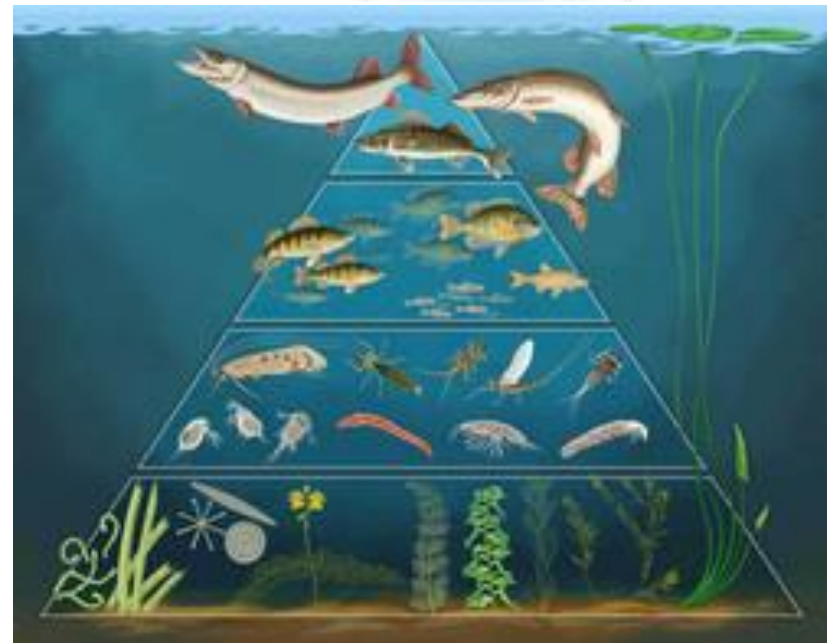
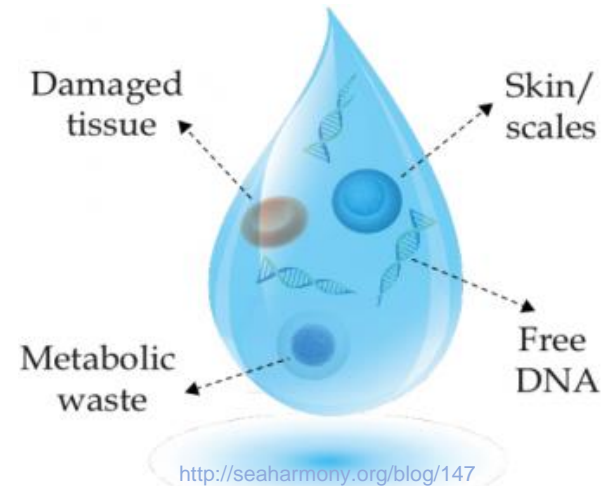
Mis on eDNA?

- Kõik elus organismid jätavad oma elutegevuse käigus maha DNAd
- See DNA võib pärineda:
 - süljest
 - sugurakkudest
 - väljaheidetest
 - naharakkudest
 - karvadest
 - sulgedest
 - organismi ümbritsevast kaitsvast limast
- Seda DNAd on võimalik koguda näiteks
 - veest
 - lumest/jääst
 - pinnasest
 - setetest
 - tolmust/õhust



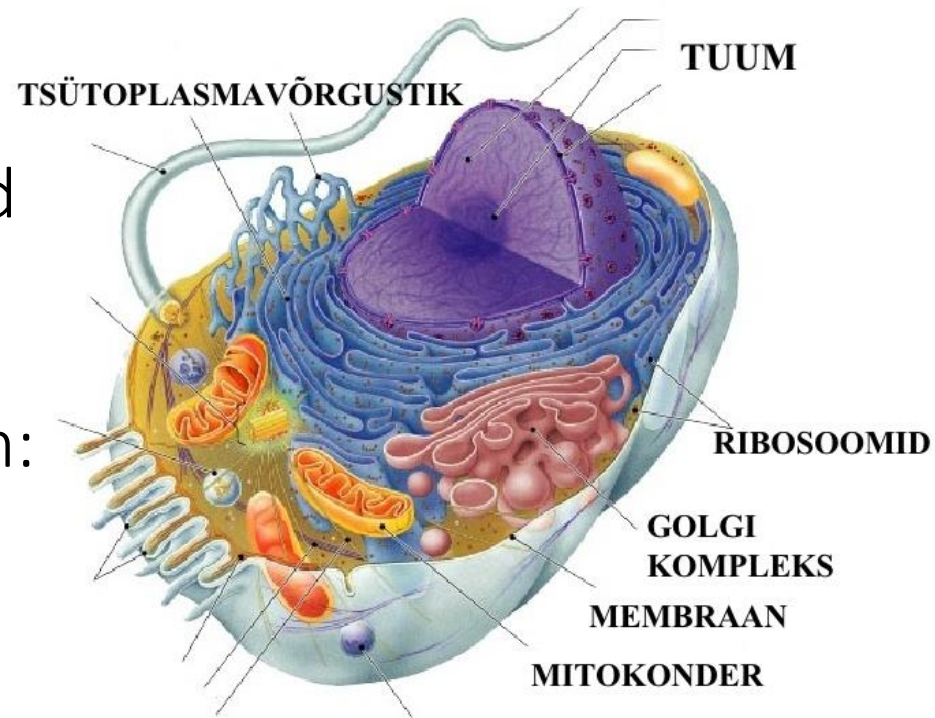
Mis on eDNA?

- Olenevalt keskkonnast on seda DNAd võimalik koguda pikka aega pärast organismi lahkumist
 - Veekeskkonnas tavaliselt paar päeva kuni paar nädalat
 - Setetes sadu, isegi tuhandeid aastaid
- Tegemist on väga efektiivse mitteinvasiivse meetodiga
- Ühe veeprooviga on võimalik saada infot kogu liigilise koosseisu kohta – kaladest veetaimedeni



Mis on eDNA?

- Uuringuteks saab kasutada nii tuuma- kui ka mitokondriaalset DNAd
- Mitokondriaalne DNA on aga peamine, kuna see on:
 - keskkonnas palju stabiilsem
 - esineb mitme koopiana
 - lühike, mis tähendab, et DNA järjestused on olemas paljude organismide kohta



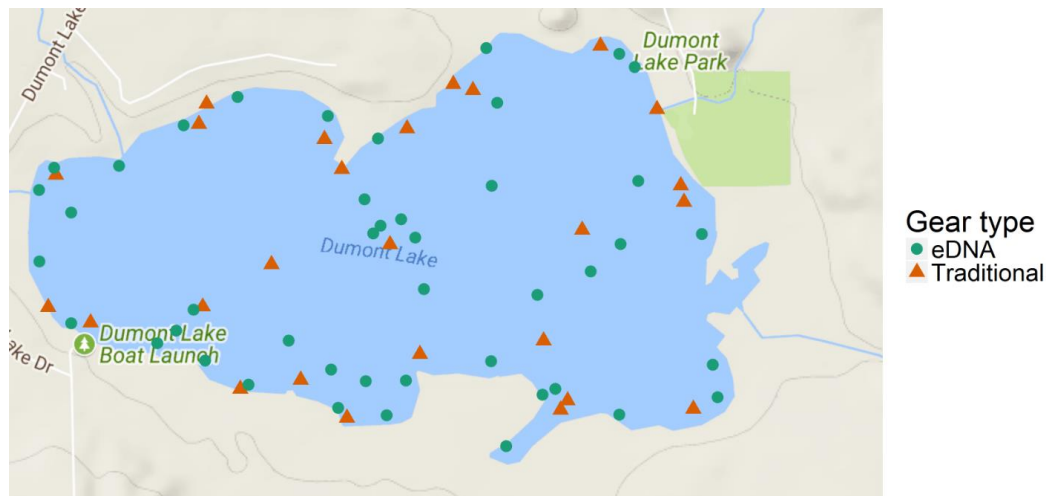
Loomarakk

eDNA metoodika põhietapid veekeskkonnas

- Veeproovide kogumine
- Proovide filtreerimine
- eDNA eraldamine
- eDNA analüüsimine qPCRi meetodil
- Andmete analüüsimine

Veeproovide kogumine

- Proovivõtustrateegia on äärmiselt oluline
- Arvestama peab:
 - uuritava liigi ja tema elukeskkonna eripäraga
 - kui kaugemale eDNA uuritavast organismist kanduda võib
 - eDNA ruumilise paiknemisega (kui segunenud see on)
 - kas tegemist on jõe või järvega



Veeproovide kogumine

- Pumba valik – kas peristaltiline või vaakum
- Filtreeritava vee kogus sõltub:
 - mis liigi DNAd tahetakse kätte saada
 - kui palju uuritavat liiki veekogus on (vähkide puhul vähemalt 5 L)

Alexis²® 12 Volt
Peristaltic Pump



Smith-Root eDNA
Sampler Backpack





Välitööd Äsis (Norras) koos Norra projektpartneri David Strandiga

Proovide filtreerimine

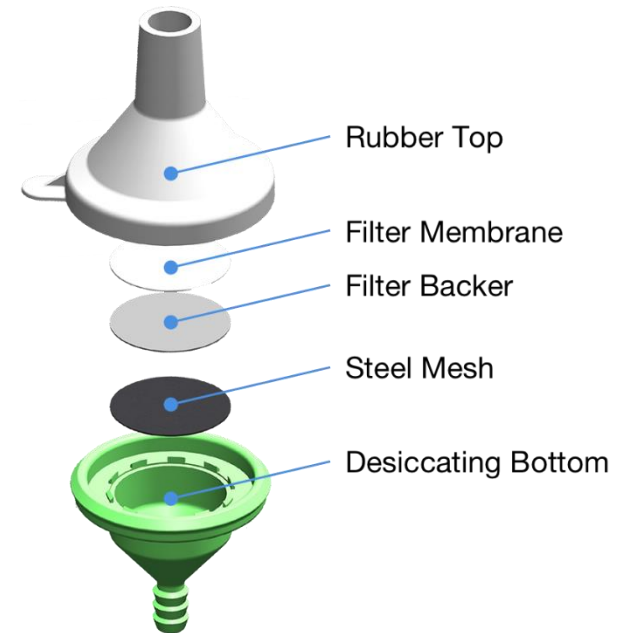
- Erinev filtrite materjal ja poori suurus –
 - klaaskiud, tselluloosnitraat, polüetersulfaan, polükarbonaat jne.
 - avatud filtrid (korduvkasutatavad filtrihoidjad)





Proovide filtreerimine

- Erinev filtrite materjal ja poori suurus –
 - klaaskiud, tselluloosnitraat, polüetersulfaan, polükarbonaat jne.
 - avatud filtrid (korduvkasutatavad filtrihooldjad)
 - poolsuletud filtrid (avad vaid filtri eemaldamiseks)



Smith-Root filter

Proovide filtreerimine

- Erinev filtrite materjal ja poori suurus –
 - klaaskiud, tselluloosnitraat, polüetersulfaan, polükarbonaat jne.
 - avatud filtrid (korduvkasutatavad filtrihooldjad)
 - poolsuletud filtrid (avad vaid filtri eemaldamiseks)
 - suletud filtersüsteem (kõige väiksem kontaminatsiooni oht)
- omad plussid ja miinused on kõigil

Sterivex



Proovide filtreerimine

- Väga oluline on valida õige proovide säilitamise meetod
 - Kui kaua on vaja säilitada?
 - Kas proovi on võimalik jahedas hoida või mitte?
- Kõige levinumad meetodid on:
 - Külmutamine
 - Kuivatamine
 - Säilituslahustes hoidmine (etanool, erinevad puhvrid)



Välitööd Äsis (Norras) koos Norra projektpartneri David Strandiga

eDNA eraldamine

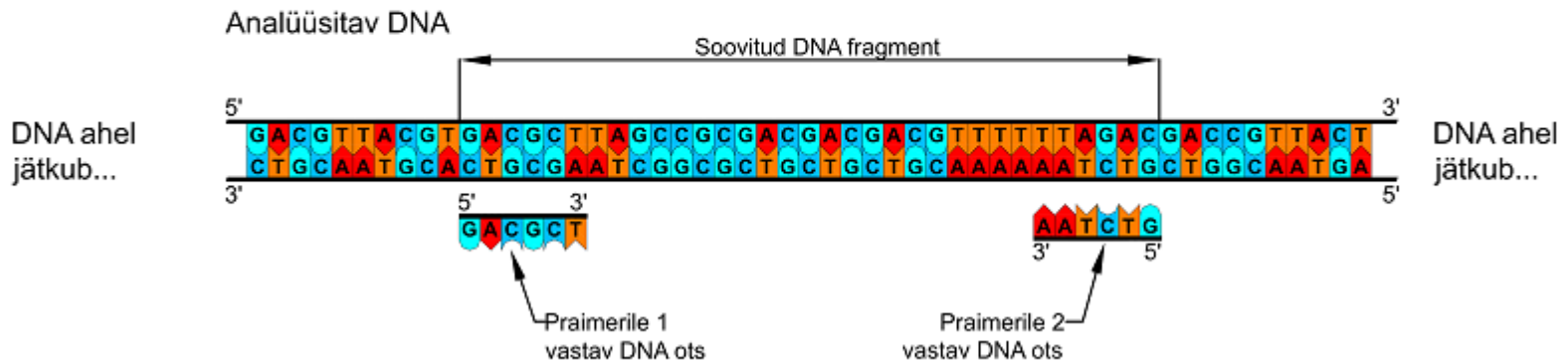
- eDNA eraldamine peaks toimuma laboris, kus ei tegeleta sama liigi koeproovide ega genoomse DNA analüüsimisega
- Kõik tööpinnad tuleb hoida steriilsed (töödelda valgendi lahusega ja UV-ga)
- eDNA eraldamiseks kasutatakse peamiselt kommertslikult kättesaadavaid eralduskitte, kus kõik vajalik on olemas
- Iga eralduskorraga tuleb teha ka negatiivseid eralduskontrolle

eDNA analüüsimine qPCRi meetodil

- Vähekide puhul kasutatakse liigipõhist reaalaaja polümeraasi ahelreaktsiooni (qPCR) meetodikat

5' **GACGCT** 3' Praimer 1 - määrab paljundatava DNA fragmendi alguse.

3' **AATCTG** 5' Praimer 2 - määrab paljundatava DNA fragmendi lõpu.



eDNA analüüsimine qPCRi meetodil

- Vähkide puhul kasutatakse liigipõhist reaalaaja polümeraasi ahelreaktsiooni (qPCR) meetodikat
- qPCR reaktsiooni ajal fluorestseeruv sond laguneb ning tekitab signaali, mida mõõdetakse optiliste kanalite kaudu
- Iga PCRi tsükliga fluorestsentsi intensiivsus kasvab proportsionaalselt sünteesitud DNA kogusega

Experiment Menu

Experiment: eDNA_PKD_PKX_LOD & LOQ experiment_22Apr22

Type: Standard Curve

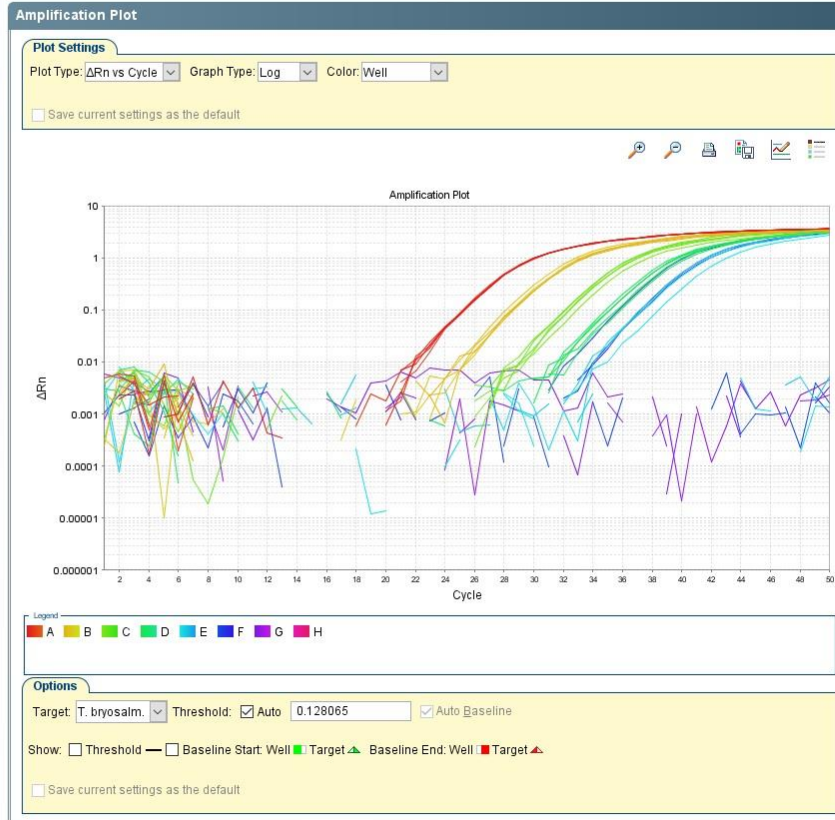
Reagents: TaqMan® Reagents

Reanalyse

Analysis Settings



- Setup
- Run
- Analysis
- Amplification Plot
- Standard Curve
- Multicomponent Plot
- Raw Data Plot
- QC Summary
- Multiple Plots View



View Plate Layout

Select Wells With: - Select Item - - Select Item -

Show in Wells View Legend

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PKX9 T. bryo. 1E5 Ct: 36.67	PKX9 T. bryo. 1E5 Ct: 36.64	PKX9 T. bryo. 1E5 Ct: 36.67	PKX9 T. bryo. 1E5 Ct: 36.64	PKX9 T. bryo. 1E5 Ct: 36.6	PKX9 T. bryo. 1E5 Ct: 36.76	PKX9 T. bryo. 1E5 Ct: 34.09	PKX9 T. bryo. 1E5 Ct: 36.22	PKX9 T. bryo. 1E5 Ct: 36.22	PKX9 T. bryo. 1E5 Ct: 36.04	PKX9 T. bryo. 1E5 Ct: 36.66	PKX9 T. bryo. 1E5 Ct: 36.09
B	PKX10 T. bryo. 1E4 Ct: 39.04	PKX10 T. bryo. 1E4 Ct: 39.09	PKX10 T. bryo. 1E4 Ct: 39.04	PKX10 T. bryo. 1E4 Ct: 39.04	PKX10 T. bryo. 1E4 Ct: 39.06	PKX10 T. bryo. 1E4 Ct: 39.04	PKX10 T. bryo. 1E4 Ct: 39.04	PKX10 T. bryo. 1E4 Ct: 39.30	PKX10 T. bryo. 1E4 Ct: 39.68	PKX10 T. bryo. 1E4 Ct: 39.07	PKX10 T. bryo. 1E4 Ct: 39.06	PKX10 T. bryo. 1E4 Ct: 39.06
C	PKX11 T. bryo. 1E3 Ct: 33.90	PKX11 T. bryo. 1E3 Ct: 33.72	PKX11 T. bryo. 1E3 Ct: 33.6	PKX11 T. bryo. 1E3 Ct: 33.70	PKX11 T. bryo. 1E3 Ct: 33.65	PKX11 T. bryo. 1E3 Ct: 33.02	PKX11 T. bryo. 1E3 Ct: 36.72	PKX11 T. bryo. 1E3 Ct: 33.00	PKX11 T. bryo. 1E3 Ct: 33.43	PKX11 T. bryo. 1E3 Ct: 33.44	PKX11 T. bryo. 1E3 Ct: 33.01	PKX11 T. bryo. 1E3 Ct: 33.47
D	PKX12 T. bryo. 125 Ct: 36.22	PKX12 T. bryo. 125 Ct: 36.64	PKX12 T. bryo. 125 Ct: 36.6	PKX12 T. bryo. 125 Ct: 36.04	PKX12 T. bryo. 125 Ct: 36.22	PKX12 T. bryo. 125 Ct: 36.49	PKX12 T. bryo. 125 Ct: 37.02	PKX12 T. bryo. 125 Ct: 37.6	PKX12 T. bryo. 125 Ct: 36.16	PKX12 T. bryo. 125 Ct: 36.64	PKX12 T. bryo. 125 Ct: 36.30	PKX12 T. bryo. 125 Ct: 36.06
E	PKX13 T. bryo. 25 Ct: 39.03	PKX13 T. bryo. 25 Ct: Undata	PKX13 T. bryo. 25 Ct: 37.76	PKX13 T. bryo. 25 Ct: 37.69	PKX13 T. bryo. 25 Ct: Undata	PKX13 T. bryo. 25 Ct: 39.36	PKX13 T. bryo. 25 Ct: 40.02	PKX13 T. bryo. 25 Ct: 39.04	PKX13 T. bryo. 25 Ct: Undata	PKX13 T. bryo. 25 Ct: Undata	PKX13 T. bryo. 25 Ct: 39.3	PKX13 T. bryo. 25 Ct: Undata
F	PKX13 T. bryo. 25 Ct: Undata	PKX13 T. bryo. 25 Ct: Undata	PKX13 T. bryo. 25 Ct: 37.76	PKX13 T. bryo. 25 Ct: 38.4	PKX13 T. bryo. 25 Ct: 37.67	PKX13 T. bryo. 25 Ct: Undata	PKX13 T. bryo. 25 Ct: Undata	PKX13 T. bryo. 25 Ct: 37.72	PKX13 T. bryo. 25 Ct: 46.43	PKX13 T. bryo. 25 Ct: 39.43	PKX13 T. bryo. 25 Ct: Undata	NTC T. bryo. CT: Undata
G	PKX14 T. bryo. 5 Ct: Undata	PKX14 T. bryo. 5 Ct: Undata	PKX14 T. bryo. 5 Ct: Undata	PKX14 T. bryo. 5 Ct: Undata	PKX14 T. bryo. 5 Ct: Undata	PKX14 T. bryo. 5 Ct: Undata	PKX14 T. bryo. 5 Ct: Undata	PKX14 T. bryo. 5 Ct: Undata	PKX14 T. bryo. 5 Ct: Undata	PKX14 T. bryo. 5 Ct: 36.49	PKX14 T. bryo. 5 Ct: 39.21	PKX14 T. bryo. 5 Ct: Undata
H	PKX14 T. bryo. 5 Ct: Undata	PKX14 T. bryo. 5 Ct: Undata	PKX14 T. bryo. 5 Ct: Undata	PKX14 T. bryo. 5 Ct: 46.04	PKX14 T. bryo. 5 Ct: Undata	PKX14 T. bryo. 5 Ct: Undata	PKX14 T. bryo. 5 Ct: Undata	PKX14 T. bryo. 5 Ct: Undata	PKX14 T. bryo. 5 Ct: 43.76	PKX14 T. bryo. 5 Ct: 37.92	PKX14 T. bryo. 5 Ct: Undata	NTC T. bryo. CT: Undata

Wells: 0 Unknown 94 Standard 2 Negative Control 0 Empty

Analysis Summary: Total Wells in Plate: 96 | Wells Set Up: 96 | Wells Omitted Manually: 0 | Wells Flagged: 94 | Wells Omitted by Analysis: 0 | Samples Used: 7 | Targets Used: 1

Andmete analüüsimine

- qPCRi järgselt tekib tabel tsüklite arvudega, kus amplifitseerumine toimus
- Vähi võõrliikide tuvastamisel väljendatakse qPCRi tulemused peamiselt - olemasolu/puudumisena
- Positiivseks loetakse proovi, mille puhul jääb 2/3 korduste tsüklite arv alla 40

Proovi nimi	Tsüklite arv (Ct)	Keskmine Ct
PKX9	25.67	26.6
PKX9	25.64	26.6
PKX9	25.67	26.6
PKX10	28.94	29.5
PKX10	28.98	29.5
PKX10	28.99	29.5
PKX11	33.29	33.3
PKX11	32.72	33.3
PKX11	32.50	33.3
PKX12	36.22	36.1
PKX12	35.51	36.1
PKX12	35.50	36.1
PKX13	38.83	38.7
PKX13	Undetermined	38.7
PKX13	37.8	38.7
NTC	Undetermined	
NTC	Undetermined	

Millega peab eDNA metoodika kasutamisel arvestama...

- Jõgedes kannab vool eDNA-d kaasa ning on raske hinnata kust piirkonnast see täpselt pärineb

eDNA püsimist veekogus mõjutavad:

veekogu suurus
sügavus
kihistumine (jõgede puhul voolukiirus)
avatus päikesele, UV kiirgus
veetemperatuur
aastaaeg
vee-keemia
pH
mikroorganismid
veekogu põhja substraat jne

eDNA analüüsimist mõjutavad:

Erinevad inhibeerivad ained vees

- humiin- ja fulvohapped
- tanniin (lagunenud orgaaniline aine pinnases, turbas jne)

Humiinained vees ei lahustu

Selleks tuleb eDNA proove enne analüüsimist spetsiaalsete puhastuskittidega töödelda

Millega peab eDNA metoodika kasutamisel arvestama...

- Negatiivne proov ei kinnita, et huvipakkuvat liiki keskkonnas ei ole (see kehtib kõigi seiremetoodikate puhul)
- eDNA abil ei ole võimalik eristada surnud ja elus isendeid
- eDNA abil ei saa otseselt määrata isendi vanust, pikkust ega kaalu



Simultaneous detection of native and invasive crayfish and *Aphanomyces astaci* from environmental DNA samples in a wide range of habitats in Central Europe

Johannes C. Rusch^{1,2}, Michaela Mojžišová³, David A. Strand¹, Jitka Svobodová⁴,
Trude Vrålstad¹, Adam Petrusek³

1 Norwegian Veterinary Institute, P.O. Box 750, Sentrum, NO-0106 Oslo, Norway **2** Department of Biosciences, University of Oslo, P.O. Box 1066, Blindern, NO-0316 Oslo, Norway **3** Department of Ecology, Faculty of Science, Charles University, Viničná 7, Prague 2, CZ-12844, Czech Republic **4** T. G. Masaryk Water Research Institute, Podbabská 30, Prague 6, CZ-16000, Czech Republic

Christophe Mauvisseau , Michael J. Sweet  

¹Norwegia

²Norwegian Veterinary

³Department of Biosciences, University of Oslo

... ..

... .. T. G. Masaryk Water Research Institute, Faculty of Science

Iceland
Liechtenstein
Norway grants



KESKKONNAMINISTEERIUM



Täna kuulamast!



Veterinærinstituttet
Norwegian Veterinary Institute



Eesti Maaülikool
Estonian University of Life Sciences