

## eDNA filter samplingprotocol

**Let op:** sampling kit pas in het veld open maken i.v.m. contaminatierisico!

### De sample kit bevat:

- 2 paar handschoenen
- 1 blauwe bemonsteringsschep
- 1 steriele Whirl-Pak bag
- 2 2mL buisjes met conserverende buffer
- 1 wegwerpincet

### Locatie van bemonstering

- Submonsters worden genomen langs een traject van 50-100 meter;

### Verzamelen van subsamples

1. Trek een set handschoenen aan (denk aan contaminatie!).
2. Open de Whirl-Pak bag.
3. Verzamel 28 subsamples met behulp van de blauwe bemonsteringsschep. Mix het water voorzichtig door de schep heen en weer te bewegen. Zorg ervoor dat de bodem niet verstoord wordt. De bodem bevat mogelijk historisch DNA. Vul de schep tot de rand en leeg deze in de Whirl-Pak bag.
4. Sluit de Whirl-Pak bag en schudt om de subsamples te vermengen.
5. Haal de filterhouder uit de verpakking en draai deze op de fles.
6. Sluit de filterhouder aan op de pomp.
7. Giet het water uit de Whirl-pak bag voorzichtig op het filter.
8. Zet de pomp aan. Bij plassen, sloten en boezemwateren kan tot **maximaal** 1 liter water gefiltreerd worden. Dit duurt ongeveer 2 minuten. Bij troebel water kan filter echter al eerder verstopt raken. Het is dus niet erg als het niet lukt om 1 liter water te filteren. **Giet het water daarom stukje bij beetje op het filter en filtreer altijd het gehele toegevoegde volume.** Noteer aub de hoeveelheid water die gefilterd kon worden.
9. Zet de pomp uit.

### Conserveer de samples

10. Trek het tweede paar schone handschoenen aan om contaminatie te voorkomen.
11. Als het water gefiltreerd is, gebruik dan de plastic pincet om het filter voorzichtig in de buisjes met conserverende vloeistof te duwen. (Bij lage temperaturen zal er precipitatie (neerslag) te vinden zijn in de buffer. Door deze even in de hand op te warmen wordt de buffer weer vloeibaar.) Het is belangrijk om te voorkomen dat er vloeistof gemorst wordt! Verdeel het filter over de twee buisjes. Het filter moet daarbij doorgescheurd worden. Het is dus niet erg als het filter in meerdere stukjes in de buisjes overgebracht wordt. **Zorg dat het filter geheel onder de buffer staat zodat het eDNA niet kan afbreken.** Door slechts één pootje van de pincet te gebruiken kan het filter eenvoudig naar beneden gedrukt worden.
12. Sla de buisjes in het opslagdoosje. Probeer het doosje zoveel mogelijk horizontaal te bewaren zodat er altijd een laagje buffer boven het filter blijft staan.
13. Bewaar de samples bij kamertemperatuur.
14. Stuur de samples zo spoedig mogelijk op naar Datura met een volledig ingevuld sample formulier (uitgeprint of digitaal). Langdurig bewaren van het sample kan leiden tot degradatie van het DNA.

De opvangfles, pomp en het opslagbakje met buisjes met filters ontvangen wij graag terug. De overige materialen mogen weggegooid worden.

**NB: plastic scheiden is beter voor het milieu**

**Tips en trucs:**

- De concentratie van eDNA in het water is laag. Daarom worden zeer gevoelige detectie technieken gebruikt. Dat maakt de methode echter gevoelig voor contaminatie. Voorkom aanraking van de buitenkant van de handschoenen. Verder is het belangrijk om met de handschoenen alleen de materialen die aanwezig zijn in de kit aan te raken.
- Van de meeste watertype kan maximaal 1 liter water gefilterd worden. Het filtreren van een groter volume water verhoogt weliswaar de concentratie eDNA in het sample, maar verhoogd ook de concentratie PCR inhiberende stoffen. PCR inhiberende stoffen hebben een negatief effect op de detectie gevoeligheid. Het filtreren van een groter volume dan 1 liter heeft daarom vaak negatief effect op de detectie. In troebele wateren kan het filter soms na 500 mL water al verstopt raken. In vennen waarin veel zwevend organisch materiaal aanwezig is, verstopt het filter al na 200 mL. Het heeft dan geen zin om minutenlang te wachten om nog extra water te kunnen filtreren. Over het algemeen resulteert dit juist in een te hoog percentage inhiberende stoffen. Voeg dus niet meer water toe dan in ~2 minuten gefiltreerd kan worden. Alleen in grote heldere (vaak stromende) watersystemen, zoals de grote rivieren en sommige boezemwateren, kan een groter volume water (1-4 liter) bemonsterd worden.
- De concentratie van eDNA in watersamples is laag. Daarom worden zeer gevoelige technieken gebruikt om eDNA toch te kunnen detecteren. Kleine hoeveelheid DNA van de doelsoort (bijvoorbeeld aanwezig op schepnetten) kan al leiden tot vals positief resultaat. Het is daarom zeer belangrijk om de samples zo schoon mogelijk te houden, om zodoende contaminatie te voorkomen;
- DNA verspreid zich slechts in beperkte mate door het water. Daarom is het belangrijk om 26 subsamples te verzamelen. Daardoor neemt de detectiekans af. Als de verwachting is dat de dichtheid van de doelsoort laag is, dan is het verstandig om de subsamples langs een traject van maximaal 100 meter te verzamelen. Als veel subsamples geen eDNA van de doelsoort bevatten dan wordt de eDNA concentratie in het sample laag. In de meeste gevallen is het daarom aan te raden om het verzamelen van de subsamples te beperken tot één waterlichaam. Zodoende kan worden voorkomen dat eDNA uit een sloot waarin de doelsoort aanwezig is te veel verdunt wordt met water waarin geen eDNA aanwezig is;
- Aan waterplanten kunnen allerlei (sediment)deeltjes gekleefd zitten. Bij beroering van het water kunnen deze deeltjes in het sample terecht komen. Probeer dit zoveel mogelijk te vermijden omdat dit eDNA detectie kan inhiberen. Dit kan door voorzichtig tussen de waterplanten te scheppen of door openingen in de watervegetatie te zoeken;
- In sommige watersystemen kan het water na (hevige) regenbuien sneller stromen dan normaal. Het kan daarom verstandig zijn om eDNA sampling na regenval te vermijden.

Heeft u nog vragen?

Neem gerust contact op met Datura

**Datura Molecular Solutions BV**

[www.datura.nl](http://www.datura.nl)

[info@datura.nl](mailto:info@datura.nl)

0628022473

Samples kunnen opgestuurd naar:

**Datura**

Agro Business Park 10

6708 PW Wageningen

The Netherlands