



## *Standaard methode laboratorium analyse*



Keutel samples  
2019

**Datura Molecular Solutions BV**  
Agro Business Park 10  
6708 PW, Wageningen

[www.datura.nl](http://www.datura.nl)  
[info@datura.nl](mailto:info@datura.nl)

**Contactspersoon vanuit Datura:**

Jitske Rook  
+31 (0)628022473  
[Jitske.rook@datura.nl](mailto:Jitske.rook@datura.nl)

## Laboratorium analyse

De keutels worden geanalyseerd op de aanwezigheid van DNA van (vleer)muizen. 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 twee specifieke markers (12S vertebraten en COI vleermuizen). 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. De PCR is uitgevoerd met 2 primer-sets:
  - a. COI (vooral vleermuizen, en enkele andere zoogdieren)
  - b. 12S (vertebraten algemeen)
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.

## Kwaliteitswaarborging

### 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 ingericht 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 DNA sample kits en het voorbereiden van de PCR reagentia vindt plaats in een **DNA clean room**. Dit is een ruimte waarin geen DNA samples aanwezig zijn. Zodoende kunnen we garanderen dat er geen DNA aanwezig is in de DNA sample kits en de reagentia (zoals de primers en mastermix) die later gebruikt worden in de DNA analyses. Het extraheren van de DNA samples gebeurt in een **pre-PCR laboratorium**. Dit is een ruimte waarin uitsluitend lage concentraties DNA aanwezig zijn. Vervolgens worden hier de DNA samples samen met de PCR reagentia in een 96-well plaat gepipetteerd. Deze plaat wordt luchtdicht afgesloten. Tenslotte wordt de PCR uitgevoerd in een **post-PCR laboratorium**. In dit laboratorium wordt het DNA vermeerderd en hier zijn dus hoge concentraties DNA aanwezig.
2. Er wordt een **unidirectionele workflow** gehanteerd om contaminatie van de DNA clean room en het pre-PCR 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 pre-PCR laboratorium. Ook mogen medewerkers van Datura niet dezelfde dag van een post-PCR laboratorium terug naar de DNA clean room en het pre-PCR laboratorium.
3. In iedere analyse worden **controle analyses** uitgevoerd. Zo worden er samples geëxtraheerd waaraan geen sample wordt toegevoegd (zogenaamde extractie controles). In de PCR worden naast de extractie controles ook negatieve PCR controles meegenomen. Zodoende kan heel nauwkeurig gemonitord worden of er inderdaad geen contaminatie optreedt.