



UNIVERSITETET I AGDER

HSN Høgskolen
i Sørøst-Norge

Mastergradsavhandling i Akvatisk økologi
2016

Analysering av Miljø-DNA for Kartlegging av Marin Fiskefauna

Beate Malene Funk

Veileder

Audun Slettan

Universitetet i Agder
Fakultet for teknologi og realfag
Institutt for naturvitenskapelige fag

Høgskolen i Sørøst-Norge
Fakultet for allmennvitenskapelige fag
Institutt for natur-, helse- og miljøvern fag

© Beate Malene Funk 1016

Masteroppgave i Akvatisk økologi, retning marin økologi, 2016.

Innlevert som oppgave i emnet BIO500 Masteroppgave.

Akvatisk økologi er et felles masterprogram mellom Universitetet i Agder (UiA) og Høgskolen i Sørøst-Norge (HSN), med spesialisering innenfor marin økologi (ved UiA).

Alle rettigheter reservert. Ingen deler av denne oppgaven kan kopieres uten tillatelse fra forfatteren.

Masteroppgaven er gjennomført og godkjent som et ledd i utdanningen ved UiA og HSN, og er godkjent som en del av utdanningen. Denne godkjenningen innebærer ikke at universitet/høgskolen inntår for de metoder som er anvendt og de konklusjoner som er trukket.

Universitetet i Agder
Fakultet for teknologi og realfag
Institutt for naturvitenskapelige fag
Gimlemoen
4604 Kristiansand

<http://www.uia.no>

© 2016 Beate Malene Funk

Denne avhandlingen representerer 60 studiepoeng

Sammendrag

Marine økosystemer over hele verden er i dag truet på grunn av overfiske og annen menneskelig påvirkning. For å overvåke marin fisk, som representerer en hovedkomponent i nåtidens overvåkning av marine økosystemhelse, er man hovedsakelig avhengig av invaderende og selektive metoder. Metodene er også avhengig av fysisk identifisering av arter, som i flere tilfeller kan være vanskelig eller, i noen tilfeller, umulig. Slike begrensninger av tradisjonelle overvåkningsmetoder har skapt et krav etter alternative metoder. Et slikt alternativ er miljø-DNA-metoden, dvs. analysering av genetisk materiale fra en prøve hentet i omgivelsene.

I denne oppgaven utforsker jeg mulighetene for å bruke miljø-DNA, hentet direkte fra marine vannprøver, for å påvise utvalgte marine fiskearter. Miljø-DNA-prøver fra åtte ulike stasjoner ble samlet inn langs kysten av Sør-Norge og analysert med artsspesifikke og universelle primere. Med artsspesifikke primere kunne jeg påvise at torsk (*Gadus morhua*) og svartkutling (*Gobius niger*) var tilstede i alle åtte lokaliteter. For å studere effektiviteten til miljø-DNA-metoden ble resultatene sammenlignet med fiskeartene observert i de samme områdene med en tradisjonell metode, strandnottrekk (utført av Havforskningsinstituttet i Agder, Flødevigen). Strandnot-metoden klarte kun å detektere disse artene i syv av åtte lokaliteter. Dette bekrefter tidligere funn som viser at miljø-DNA-metoden har en høyere deteksjonsmulighet enn tradisjonelle metoder. Med universelle primere kunne jeg ikke frembringe en full liste med fiskearter tilstede i lokalitetene, da de ikke fungerte som forventet. Jeg viser med dette at miljø-DNA fra marine vannprøver kan brukes til artsdeteksjon, men at kunnskap om faktorer som påvirker miljø-DNA i marine økosystemer er nødvendig for gode estimater av tilstedeværelse og kvantitet av arter. Likevel viser metoden stort potensiale til å bli en pålitelig overvåkningsmetode for marin fauna i fremtiden.

Abstract

Marine ecosystems worldwide are currently threatened due to overfishing and other human impacts. To monitor marine fish, which represents a main component in present monitoring of marine ecosystem health, one is mainly depending on invasive and selective methods. These methods are also dependent on physical identification of species, which in many cases can be difficult, or in some cases, impossible. Such limitations of traditional surveillance methods have created a demand for alternative methods. One such alternative is the environment-DNA method, i.e. analysis of genetic material from a sample collected in the environment.

In this paper I explore the possibilities of using environmental-DNA (eDNA) extracted directly from marine water samples, to detect selected marine fish species. eDNA samples from eight different stations were collected along the coast of Southern Norway, and analyzed with species-specific and universal primers. With species-specific primers I could prove that cod (*Gadus morhua*) and black goby (*Gobius niger*) were present in all eight localities. To study the effectiveness of eDNA the results were compared to fish species observed in a beach seine survey in the same areas (conducted by the Institute of Marine Research in Agder, Flødevigen). The beach seine survey could only detect these species in seven of eight localities. This confirms earlier findings that shows that the eDNA method has a higher possibility of detection than conventional methods. With universal primers I could not provide a complete list of species present in the different localities, as the primers did not work as expected. In this paper I conclude that it is possible to use eDNA for species detection in marine water samples, although more information regarding factors affecting eDNA in marine ecosystems is required for good estimates of presence and quantity of species. Nevertheless, the method shows huge potential to become a reliable monitoring method for marine fauna in the future.

Innholdsfortegnelse

Sammendrag	1
Abstract	3
Innholdsfortegnelse	5
Forord.....	7
1 Innledning.....	9
1.1 Strandnotttrekk.....	10
1.2 Miljø-DNA	11
1.3 Artsspesifikk deteksjon	21
1.3.1 Verifisering av artsspesifikke primere og prober	22
1.3.2 Kontroll av PCR-produktet ved kloning og sekvensering	25
1.4 Multi-arts deteksjon (miljø-DNA metabarkoding)	27
1.4.1 Kontroll av universalprimere med gel-elektroforese	29
1.4.2 Illumina sekvensering	29
2 Problemstilling	33
3 Metoder.....	35
3.1 Strandnotttrekk.....	35
3.2 Innsamling av miljø-DNA	35
3.3 Filtrering av vannprøver (miljø-DNA)	36
3.4 DNA-isolering.....	37
3.4.1 DNA- isolering av miljø-DNA-prøver	37
3.4.2 DNA-isolering av genomisk fiske-DNA.	39
3.5 Primer og probe design	40
3.5.1 Artsspesifikke primere og prober	40
3.5.2 Universalprimere.....	40
3.6 Artsspesifikk deteksjon	41
3.6.1 Utprøving av artsspesifikke primere og prober.....	41
3.6.2 Kloning	42
3.6.3 Forbehandling av PCR-produkt for sangersekvensering:	45
3.6.4 Sanger sekvensering	45

3.7 Multi-art deteksjon	46
3.7.1 Utprøving av universalprimere	46
3.7.2 Utprøving av universalprimere med adaptere og indekser for Illumina-sekvensering.....	47
4 Resultater	49
4.1 Strandnottrekk.....	49
4.2 DNA-isolering.....	50
4.3 Artsspesifikk deteksjon	51
4.3.1 Utprøving av artsspesifikke primere og prober	52
4.3.2 Kloning	57
4.3.3 Sanger sekvensering	58
4.4 Multi-art deteksjon	59
4.4.1 Utprøving av universalprimere	60
4.4.2 Utprøving av universalprimere med adaptere og indekser for Illumina-sekvensering.....	62
5 Diskusjon	65
5.1 Artsspesifikk deteksjon	65
5.1.1 Artsidentifisering.....	65
5.1.2 Metodens sensitivitet	66
5.1.3 Biomasseestimer	68
5.1.4 Tid- og kostnadseffektivitet	69
5.1.5 Fordeler med miljø-DNA-metoden	70
5.1.6 Ulemper med miljø-DNA-metoden	70
5.1.7 Potensielle feilkilder	71
5.2 Multi-art deteksjon	73
5.3 Miljø-DNA i fremtiden	76
6 Konklusjon	79
Referanser	81
Oversikt over tabeller	87
Vedlegg	91

Forord

Denne oppgaven er utført som et avsluttende prosjekt i mastergradstudiet i marin biologi ved Universitetet i Agder (UIA). Materialet til oppgaven ble samlet inn av Havforskningsinstituttet i Flødevigen og det laboratoriske arbeidet ble utført på UIA.

Prosessen har vært lang og til tider tøff, men til gjengjeld veldig lærerik. Jeg vil først og fremst takke min veileder Audun Slettan for god veiledning. Takk for god hjelp, tålmodighet og stor entusiasme. Takk for muligheten til å jobbe med en interessant oppgave og for alt jeg har lært.

Jeg vil også takke Havforskningsinstituttet i Flødevigen for at jeg fikk bruke deres resultater fra strandnottoktet. Spesielt vil jeg takke Esben Olsen Moland som tok seg tid til å samle inn miljø-DNA-prøver.

Til slutt vil jeg takke mine foreldre, min søster og min samboer. Takk for enorm støtte og oppmuntrende ord.

Kristiansand, 16.05.16

Beate Malene Funk

1 Innledning

Havet har lenge vært gjenkjent som en av menneskets viktigste naturlige ressurs (Costanza, 1999). Det representerer en betydelig verdi i form av biodiversitet og økonomi gjennom fiskerier og andre produkter hentet fra havet (Thomsen et al., 2012b). Forandringer i marin biodiversitet er direkte forårsaket av forurensning, utnyttning og habitatødeleggelser, og indirekte av klimaendringer og relaterte forstyrrelser av havets bio-geokjemi. Til tross for at det er få marine utryddelser på en global skala, ser man at regionale økosystemer som elvemunninger, korallrev, kystsoner og oseaniske fiskesamfunn raskt mister populasjoner, arter eller hele funksjonelle grupper (Worm et al., 2006). Flere fiskepopulasjoner over hele verden er i dag truet på grunn av overfiske (Thomsen et al., 2012a) og i 2014 var over 5900 akvatiske arter registrert som truet (Rees et al., 2014).

I respons til økende menneskelig påvirkning i havet har lovgivning blitt gjennomført over hele verden for å beskytte, bevare eller forbedre marine økosystemer (Bourlat et al., 2013). I 1982 ble forente nasjoners havrettskonvensjon (UNCLOS) opprettet, som er det internasjonale rettslige rammeverket som regulerer bruken av hav og sjø. Konvensjonen skal blant annet sikre internasjonal forpliktelse til å beskytte og utnytte marine ressurser på en bærekraftig måte (Bourlat et al., 2013). All bevaringsinnsats er hovedsakelig avhengig av biologisk overvåkning for å få tak i presis data om artsdistribusjon og populasjonsstørrelse (Willerslev & Thomsen, 2015). Overvåkning av økologisk status i akvatiske økosystemer er viktig for å kunne vurdere langtids trender, være med på å forstå effektene av antropogene aktiviteter, oppdage introduksjon av fremmed-arter og for å sikre helsen til marine økosystemer (Wood et al., 2013).

Fisk, som er den mest artsrike gruppen av vertebrater, representerer en hovedkomponent i nåtidens overvåkning av marine økosystemhelse (Thomsen et al., 2012a). For å overvåke marin fiskebiodiversitet, er man i dag hovedsakelig avhengig av invaderende og selektive metoder som bunntål, strandnotttrekk og rotenonforgiftning, som kun kan utføres i visse områder (Willerslev & Thomsen, 2015). Tradisjonell overvåkning er også avhengig av fysisk identifisering av arter ved hjelp av distinkte morfologiske karakterer. På grunn av fenotypisk plastisitet og nært beslektede arter, med veldig likt utseende i juvenile stadier, kan dette være vanskelig. Morfologisk identifisering er også avhengig av taksonomisk ekspertise, som ofte mangles eller er i rask nedgang (Willerslev & Thomsen, 2015). Feil-identifisering kan føre til mangler og feil i databaser (Thomsen et al., 2012a), som igjen kan føre til under- eller

overestimering av arter og påvirke konserveringsinnsats. Slike begrensninger av tradisjonelle overvåkningsmetoder har skapt et krav etter alternative metoder (Willerslev & Thomsen, 2015).

En alternativ måte for å overvåke marine fisk er miljø-DNA-metoden, dvs. uthenting og analysering av genetisk materiale fra en prøve hentet i omgivelsene (Thomsen et al., 2012a). Metoden er en relativt ny fremgangsmåte for å overvåke distribusjonen av arter og metoden gjør det mulig å detektere arter uten å faktisk se eller fange dem. Metoden bruker DNA-basert identifikasjon, også kalt metabarkoding, for å detektere arter fra ekstracellulær-DNA som organismer legger fra seg i omgivelsene (Herder et al., 2014). Dette gjør metoden mere objektiv enn visuell identifisering av arter (Thomsen et al., 2012a) og flere mener at metoden har potensialet til å være mindre kostbar og tidkrevende og mer sensitiv enn tradisjonelle overvåkningsmetoder (Rees et al., 2014).

1.1 Strandnottrekk

Havforskningsinstituttet har siden 1919 hatt årlige strandnottrekk på Skagerrakkysten i september-oktober (Rogers, Olsen, Knutsen, & Stenseth, 2014). Gunder M. Dannevig startet denne undersøkelsen for å se om rekrutteringen av torsk langs kysten ble påvirket ved utsetting av torskelarver (Stenseth et al., 1999). Hovedmålet ble senere endret til å studere rekrutteringen av torsk og andre fiskearter i strandsonen (Espeland & Knutsen, 2014). Undersøkelsen hadde i utgangspunktet 66 prøvetakningsstasjoner mellom den sørlige delen av Norge og Kragerø, men har siden 1936 utvidet seg nordover til Oslofjorden og østover til svenskegrensen (Rogers et al., 2014). I dag finnes det tilnærmet 100 faste stasjoner langs kysten, som er delt inn i 21 områder, fra Søgne til svenskegrensen (

Figur 1) (Espeland & Knutsen, 2014). Stasjonene varierer mellom lukkede lokaliteter inne i fjordene til utsatte områder på den åpne Skagerak-kysten (Rogers et al., 2014). En detaljert beskrivelse om hvordan nota skal plasseres foreligger for hver enkelt stasjon, som betyr at undersøkelsen blir gjennomført tilnærmet identisk fra år til år. På denne måten er det samme bunnarealet som blir dekket, og resultatene blir sammenlignbare. Fisk og andre marine organismer blir identifisert, telt og lengde-målt før de blir sluppet fri. Det blir også tatt målinger av temperatur, saltholdighet og oksygeninnhold i vannet på noen stasjoner (Espeland & Knutsen, 2014).



Figur 1 Oversikt over de 21 områdene for strandnottrekk (Hentet fra: Espeland and Knutsen (2014))

1.2 Miljø-DNA

Miljø-DNA er DNA som har blitt frigjort fra organismer til omgivelsene via hud, spytt, egg, urin, avføring, blod og lignende (Bohmann et al., 2014), og som kan bli ekstrahert fra en miljøprøve som jord, sedimenter og vann (Rees et al., 2014). Miljø-DNA består av intracellulært DNA fra levende celler eller organismer, og ekstracellulært DNA som resultat av naturlig celledød og påfølgende ødeleggelse av cellestrukturen (Taberlet, Coissac, Hajibabaei, & Rieseberg, 2012). Analysering av miljø-DNA i vann inkluderer innsamling av en vannprøve, uthenting av miljø-DNA og PCR for å oppformere mål-artens DNA (Rees et al., 2014). På den måten kan arter bli påvist uten at den må isoleres (Ficetola, Miaud, Pompanon, & Taberlet, 2008).

Den første referansen til miljø-DNA kom i 1987 og omhandler en metode for å ekstrahere mikrobielt-DNA fra sedimenter. Det var like vel først på 2000-tallet at begrepet fikk mer omslutning, spesielt i mikrobiologi-samfunn (Taberlet et al., 2012). Metoden har siden den gang blitt suksessfullt anvendt på en rekke arter, fra ulike taksonomiske grupper, og i flere

ulike miljøer (Herder et al., 2014). For makro-organismer ble metoden først anvendt på sedimenter, hvor det ble vist at DNA fra nålevende og utdødde pattedyr og fugler kunne detekteres (Hansen et al., 2003). Senere har metoden blant annet blitt anvendt på iskjerner (Cappellini et al., 2007), jord (Andersen et al., 2012) og akvatiske systemer (Willerslev & Thomsen, 2015). I ferskvann har metoden vist seg effektiv på vanninnsjekter, krepsdyr, amfibier, pattedyr og fisk (Ficetola et al., 2008; Jerde et al., 2013; Thomsen et al., 2012b). Thomsen et al. (2012b) viste at deteksjonsfrekvensen med miljø-DNA var 100 % for fisk, 100 % for reker og 91-100 % for amfibier i dammer med kjent forekomst av mål-arter. I saltvann er det gjort færre undersøkelser med miljø-DNA, men det er likevel noen publikasjoner som viser at metoden er effektiv også her (Foote et al., 2012; Kelly, Port, Yamahara, & Crowder, 2014; Thomsen et al., 2012a). Kelly et al. (2014) viste blant annet at metoden kunne detektere 4 av 5 benfisk i et forsøk med saltvanns-mesokosmer, og Foote et al. (2012) viste at Nise (*Phocoena phocoena*) kunne bli detektert i kontrollerte marine omgivelser.

Det har blitt utviklet to ulike fremgangsmåter for artsidentifisering fra miljø-DNA. Den første er arts-spesifikk deteksjon med PCR (polymerase kjedereaksjon) eller qPCR (kvantitativ PCR), hvor en eller noen få arter blir detektert. Den andre er multi-arts deteksjon med PCR og NGS (Next generation sequencing), hvor et større antall arter kan bli detektert (Willerslev & Thomsen, 2015). Ved artsspesifikk deteksjon bruker man artsspesifikke primere og kun hvis mål-artens DNA er til stedet vil DNA bli amplifisert i PCR (Herder et al., 2014). Ved multi-arts deteksjon kan man enten bruke flere artsspesifikke primere eller man kan bruke universalprimere. Fremgangsmåten med universalprimere, miljø-DNA metabarkoding, brukere primere som hybridiserer til flere arter. Primerne kan passe til en gruppe av arter, som for eksempel alle fiskene eller alle amfibiene i et miljø (Herder et al., 2014). På denne måten kan hele faunaer bli identifisert (Rees et al., 2014).

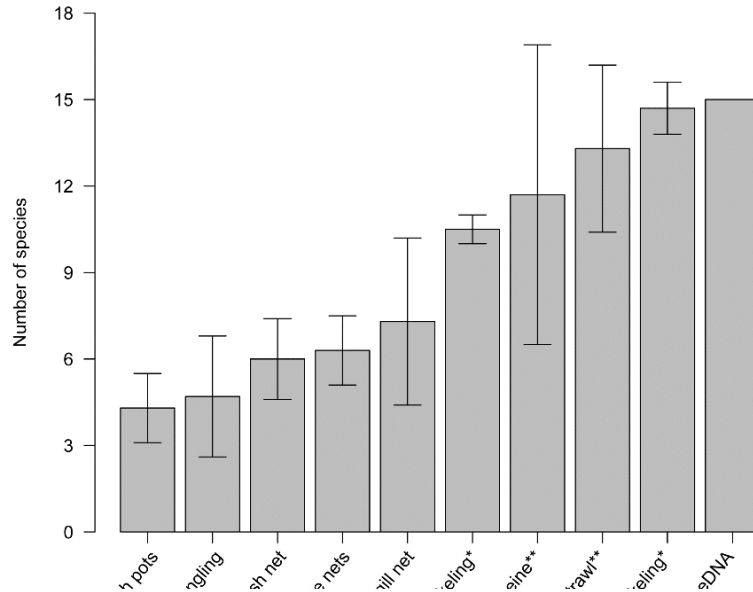
Miljø-DNA-metoden tilbyr en rekke fordeler ovenfor tradisjonelle metoder for overvåkning av biodiversitet. For det første er metoden ikke-invaderende, den påfører verken habitatet eller artene som studeres for skade eller stress (Willerslev & Thomsen, 2015). På grunn av dette er det heller ikke nødvendig med spesielle autorisasjoner for å håndtere (beskyttede) arter (Herder et al., 2014). Miljø-DNA-metoden kan også, i motsetning til tradisjonelle metoder, bli utført i nærmest alle marine habitater. For eksempel kan en vannprøve bli samlet inn stort sett over alt, mens bunntål, som ofte blir brukt i marin overvåkning, ikke kan brukes i grunne vann eller i områder med mye stein, korallrev, tang eller andre hindre på havbunnen.

(Thomsen et al., 2012a). Metoden kan også bli utført når som helst på døgnet og er ikke begrenset til spesifikke perioder, slik som flere tradisjonelle metoder (Willerslev & Thomsen, 2015). Blant annet kan metoden detektere nattaktive dyr uten å måtte observere den på nattetid, og dyr kan bli identifisert utenom høysesongen da det kun trengs små mengder DNA, fra for eksempel egg eller larver (Herder et al., 2014). Metoden er også mindre avhengig av værforhold. Der hvor tøffe værforhold kan gjøre det vanskelig for tradisjonelt utstyr, vil miljø-DNA-innsamling ikke bli påvirket (Willerslev & Thomsen, 2015). Med miljø-DNA er det også mindre risiko for spredning av invaderende arter og sykdommer, da materialene brukt til innhenting av miljø-DNA er sterile og frie for DNA. Tradisjonelt utstyr, som garn og teiner, blir gjerne ikke bli desinfisert mellom bruk i ulike områder, og kan på den måten bringe med seg arter og sykdommer til nye miljøer (Herder et al., 2014).

Overvåkning av akvatiske arter har tradisjonelt vært avhengig av å telle individer i feltet, og visuelle undersøkelser ved hjelp av distinkte morfologiske karakterer. Slik identifisering kan, som tidligere nevnt, være vanskelig eller i noen tilfeller umulig på grunn av fenotypisk plastisitet og veldig likt utseende på nært beslektede arter (Willerslev & Thomsen, 2015). DNA-basert identifikasjon kan derimot gi en høyere taksonomisk oppløsning enn tradisjonelle metoder (Herder et al., 2014). Slik identifiseringen er også mer objektiv og krever ingen ekspertise i artsidentifisering (Thomsen et al., 2012a). For eks. våren 2010 ble det under mikroskopiske analyser av kultiverte østers, importert fra Danmark til Nederland, oppdaget egg-kapsler som var morfologisk like den invasive arten Japansk Østers-boresnegl (*Ocenebrellus inornatus*). Da det ikke var mulig å skille disse egg-kapslene med en tradisjonell metode ble DNA-analysering brukt, og det ble bekreftet at det var den invasive østersen. Forsendelsen ble satt i karantene og mulig spredning av arten ble hindret (Darling & Mahon, 2011). Det er likevel viktig å nevne at identifisering av DNA-sekvenser hentet fra miljø-prøver er avhengig av pålitelige DNA-sekvensdatabaser. Disse er i dag ikke like fullstendige hos alle taksonomiske grupper, men globale initiativer har blitt iverksatt og flere databaser vokser raskt (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) (Willerslev & Thomsen, 2015). I 2005 ble det satt i gang et prosjekt for å kartlegge DNA-sekvenser for alle fiskearter i verden og i 2012 var mer enn en tredjedel av alle beskrevne arter dekket (www.fishbol.org) (Thomsen et al., 2012a).

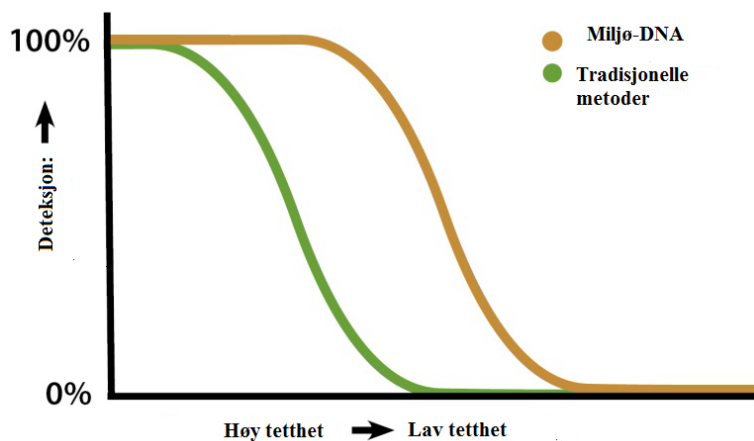
Miljø-DNA er løselig i vann, og kan spre seg over store områder fra sin opprinnelige kilde. Dette øker sjansen for å oppta miljø-DNA i en vannprøve og gjør det mulig å detektere dyr i

enn større omkrets enn direkte ved DNAets opphav (Rees et al., 2014). Det finnes likevel flere utfordringer med å bruke miljø-DNA-metoden i akvatiske miljøer, spesielt i marine vann. Hav og innsjøer har vist seg å være de vanskeligste økosystemene for å anvende miljø-DNA-metoden, og det er kun utført noen få studier på makro-organismer i disse miljøene. Dette kan komme av det store vannarealet, effektene av havstrømmer og bølger på spredning og fortykning av miljø-DNA, og virkningen av salinitet på bevaring og ekstraksjon av DNA (Thomsen et al., 2012a). Foote et al (2012), som viste at nise kunne bli detektert i kontrollerte omgivelser, klarte ikke gjenskape den samme suksessen i naturlig marine miljøer. Kun i et par tilfeller ble Nise detektert her, til tross for at ekkolokalisering viste at arten var tilstede. Det finnes likevel noen publikasjoner som viser at miljø-DNA-metoden fungerer i marine miljøer. Thomsen et al. (2012a) testet multi-arts deteksjonsmetoden langs kysten av Danmark, og sammenlignet resultatene med 9 tradisjonelle metoder brukt til marine fiskeundersøkelser (Figur 2). Miljø-DNA-metoden detekterte 15 ulike fiskearter, som tilsvarte flere eller likt antallet arter detektert med de andre metodene. Fisketeiner viste seg å være den minst suksessfulle metoden, med gjennomsnittlig 4 arter, mens strandnot-metoden kom på en fjerdeplass, med gjennomsnittlig 12 registrerte arter.



Figur 2 Antall fiske arter registrert med 9 tradisjonelle overvåkningsmetoder og miljø-DNA. Stolpene viser gjennomsnittlig antall arter fanget i 2009, 2010 og 2011. Miljø-DNA stolpen (eDNA) viser totalt antall fiskearter registrert i 2011 med denne metoden. (*-avhengig av kompetente eksperter i fiskeidentifisering) (**-bare mulig der tilstanden til havbunnen tillater det). Standardavvik er markert. (Hentet fra: Thomsen et al. (2012a))

Den høye deteksjonsmuligheten med miljø-DNA, sammenlignet med tradisjonelle metoder, som er vist av Thomsen et al. (2012a), har også blitt demonstrert i andre forsøk. Thomsen et al. (2012b) viste blant annet at metoden kunne detektere løkfrosk (*Pelobates fuscus*) i fem av åtte dammer, hvor arten tidligere hadde blitt registrert, mens den ikke ble observert i noen av lokalitetene med en tradisjonell metode. Dette indikerer at metoden er, i noen tilfeller, mer sensitiv. Denne tendensen er spesielt fremtredende i undersøkelser av arter som er sjeldne eller unnvikende, eller der arten generelt har lav tetthet (Dejean et al., 2012; Jerde, Mahon, Chadderton, & Lodge, 2011). Figur 3 illustrerer fordelene med denne høye deteksjonsmuligheten til miljø-DNA-metoden, sammenlignet med tradisjonelle metoder. Den viser at det er høyere sannsynlighet for å detektere en art med miljø-DNA-metoden ved lav tetthet, enn det er med tradisjonelle.



Figur 3 Illustrasjon av fordelingen med høyere deteksjonssannsynlighet med miljø-DNA, sammenlignet med tradisjonelle metoder. (Tegning etter: Herder et al. (2014))

Når DNA blir frigjort til omgivelsene vil det enten bli transformert, bevart i organiske eller uorganiske partikler, eller brutt ned av biotiske og abiotiske faktorer (Herder et al., 2014). Akvarieeksperimenter har demonstrert at arter frigjør DNA til omgivelsene så fort de er plassert i en beholder, og kun etter 3-5 timer vil denne nedbrytningen begynne (Pilliod, Goldberg, Arkle, & Waits, 2014). Faktorer som påvirker nedbrytning av DNA, og dermed sannsynligheten for å detektere en art med miljø-DNA-metoden, er vann (DNA hydrolysis), endonuklease, UV-stråling, bakterier og sopp (Herder et al., 2014). I vannprøver er det vist at miljø-DNA blir brutt ned til ikke-detekterbare nivåer relativt raskt, fra et par dager til en måned (Herder et al., 2014). I ferskvanns-mesokosmer viste Thomsen et al. (2012b) at det tok to uker, etter at artene var fjernet, og i marine-mesokosmer viste Thomsen et al. (2012a) at det kun tok et par dager (mellom 0.9-6.7 dg) før DNAet til trepigget stingsild (*Gasterosteus aculeatus*) og skrubbe (*Platichthys flesus*) ikke lenger kunne detekteres. Dette indikerer at deteksjon av en arts DNA i en vannprøve, bekrefter artens tilstedeværelse i nærmeste fortid (Willerslev & Thomsen, 2015). I andre omgivelser, som jord og sedimenter, kan DNA eksistere mye lengre, og under rette betingelser så lenge som opptil hundre tusen år. I disse miljøene kan det derfor være vanskeligere å bekrefte med miljø-DNA om en art nylig har vært tilstede i et område (Herder et al., 2014). Til gjengjeld kan DNA i disse omgivelsene blant annet bli benyttet for å lage et bilde over tidligere biologisk mangfold, for eksempel forandringer i arktisk vegetasjon over de siste 50 årene (Davison et al., 2014). DNA-

metabarkoding har blant annet blitt brukt på innsjøsedimenter for å rekonstruere plantedekket og husdyrholdshistorie tilbake til yngre steinalder (Giguet-Covex et al., 2014).

En annen fordel med metoden er at den kan standardiseres. F. eks. kan innhenting av miljø-DNA kan bli utført på veldig standardiserte måter, på tvers av lokaliteter i en spesifikk type habitat. Med tradisjonelle metoder er dette vanskeligere da resultatene generelt avhenger av taksonomisk kunnskap og ekspertisen til personellet som utfører undersøkelsen (Willerslev & Thomsen, 2015). En slik standardisering er likevel ikke blitt utført enda. Ulike publikasjoner viser ulike teknikker både for innsamling, filtrering, lagring og analysing av miljø-DNA (Herder et al., 2014). F.eks. varierer prøvestørrelsen fra 15 ml til 10 L akvatiske miljøer, med normalt 1-2 L fra bekker, laguner og sjøvann. Flere kit for DNA-ekstraksjon har også blitt brukt, som DNeasy Tissue and Blood DNA extraction kit (Qiagen, Inc., Valencia, California, USA); QIAamp DNA Micro extraction kit (Qiagen, Inc., Valencia, California, USA); MoBio Power Water DNA extraction kit (MoBio Laboratories, Inc., Carlsbad, California, USA); og Quick-gDNA spin-column kit (Zymo Research Corporation, Irvine, California, USA) (Rees et al., 2014).

Biomasseestimerer spiller en viktig rolle i konserveringsarbeid, men det kan ofte være vanskelig å oppnå nøyaktige estimerer med tradisjonelle metoder, spesielt for akvatiske organismer som fisk (Takahara, Minamoto, Yamanaka, Doi, & Kawabata, 2012). Forholdet mellom tettheten av arter og mengde miljø-DNA frigjort til omgivelsene har blitt undersøkt av flere (Biggs et al., 2015; Kelly et al., 2014; Thomsen et al., 2012b), og i akvarium og mesokosmer er det vist et signifikant forhold mellom disse elementene. For eks. utførte Takahara et al. (2012) kvantitative PCR eksperimenter på vannprøver hentet fra akvarier og eksperimentelle dammer med karpe (*Cyprinus carpio L*), og viste at antall miljø-DNA kopier var positivt korrelert med kjent karpe-biomasse per liter. De konkluderte med at artsbiomasse i naturlige miljøer kan bli estimert enklere og raskere med denne metoden, enn tradisjonelle. Forsøk i naturlige miljøer viser likevel mer varierende resultater, fra svak positiv korrelasjon til ingen. Dette kommer trolig av de mange faktorene som påvirker DNA her, som spredning, fortykning og nedbrytning (Herder et al., 2014). Det er også usikkerheter knyttet til mengde DNA ulike arter frigjør til omgivelsene (Wilcox et al., 2016). Innsamlingsstrategien kan også påvirke mengde miljø-DNA i en prøve, da DNA ikke er sammenhengende distribuert i et miljø. For eks., hvis prøven ved tilfeldighet er samlet inn i nærheten av en organisme, vil det bli funnet en høyere konsentrasjon av miljø-DNA her, enn hvis prøven er samlet inn lengre

vekk. Miljø-DNA-metoden kan derfor kun gi indikasjoner om trend i tetthet i slike miljøer, inntil disse usikkerheter er ytterligere undersøkt (Thomsen et al., 2012b).

Det kan være vanskelig å si om miljø-DNA-metoden er mer kostnadseffektive enn andre metoder, da dette gjerne avhenger av arten som skal studeres (Willerslev & Thomsen, 2015). Flere studier viser likevel en kortere behandlingstid og lavere kostnader når sammenlignet med tradisjonelle (Biggs et al., 2015; Jerde et al., 2011). Dette gjelder spesielt for unntvikkende og sjeldne arter, på grunn av den høye deteksjonsmuligheten. For eks. trengs det kun en forsker til å samle inn og filtrere vannprøver, mens det er nødvendig med flere biologer for å trygt samle inn dynddjevle (*Cryptobranchus alleganiensis*) via sten-løft (Olson, Briggler, & Williams, 2012). Dejean et al. (2012) kalkulerte at miljø-DNA-metoden var mindre tidkrevende og 2,5 ganger billigere enn tradisjonelle metoder, ved overvåkning av den invasive arten Amerikansk oksefrosk (*Lithobates catesbeianus*). I et annet forsøk beregnet Biggs et al. (2015) at det var mellom 6-10 ganger billigere å oppnå samme deteksjonssannsynlighet med miljø-DNA, som med tradisjonelle metoder, for storsalamander (*Triturus cristatus*). For arter som er lett å observere eller fange med tradisjonelle metoder kan miljø-DNA-metoden likevel være mindre kostnadseffektiv, på grunn av det ekstra trinnet med laboratorie-analyser. Dette gjelder for eksempel for ferskvannsfisken sandsmett (*Cobitis taenia*), som det gjennomsnittlig tok 15 minutter å fange med en tradisjonell metode. Uten videre kalkulering kan man se at tradisjonelle metoder vil være mer kostnadseffektive for denne arten, da analysekostnader vil komme i tillegg med miljø-DNA-metoden (Herder et al., 2014).

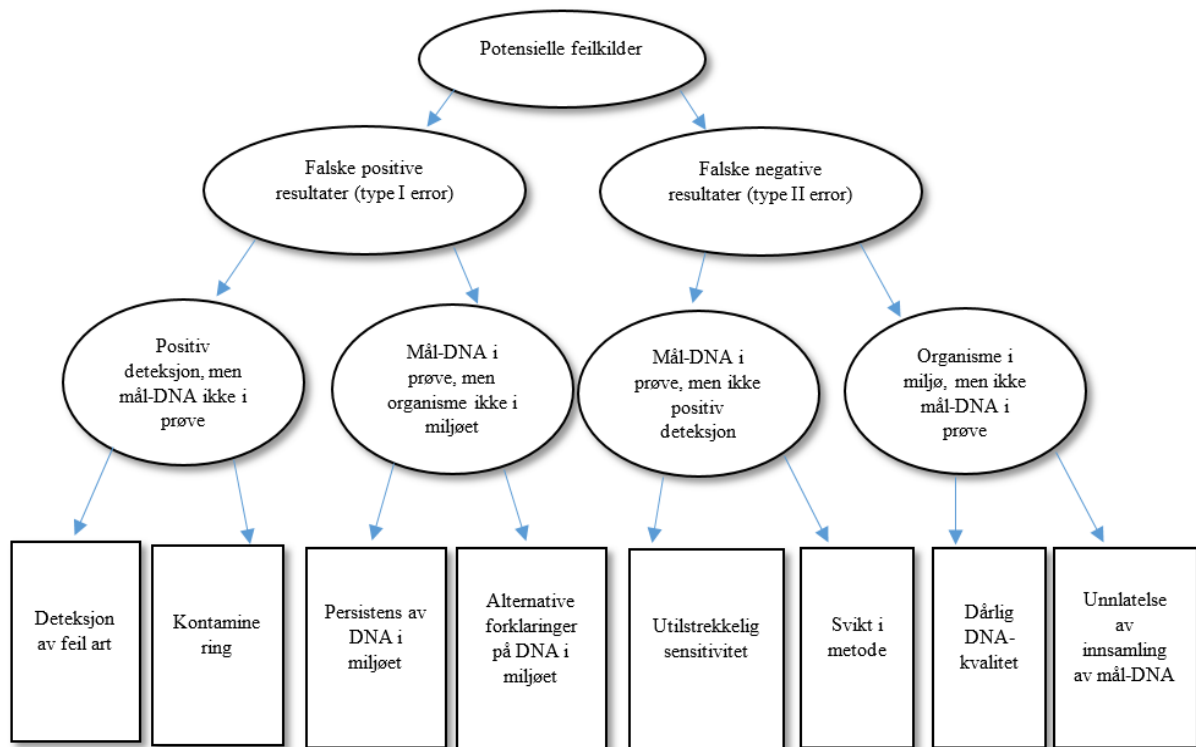
Miljø-DNA-metoden har også noen ulemper sammenlignet med tradisjonelle metoder. Metoden kan blant annet kun detektere om en art er til stedet eller ikke. Den kan ikke, slik som tradisjonelle metoder, si noe om livs-stadier (yngel, ung, voksen), populasjonens demografiske struktur, fruktbarhet eller helse til mål-arten, som er viktig når man skal vurdere helsen til et miljø (Herder et al., 2014). En annen ulempe, og muligens den største, er faren for kontaminering. Kontaminering kan skje fra miljø-DNA-prøvene blir samlet inn i felt og gjennom hele analysen i laboratoriet. Krysskontaminering kan forekomme hvis flere lokaliteter blir testet etter hverandre, og DNA kan bli overført fra en lokalitet til en annen. Laboratoriekontaminering kan være spesielt alvorlig på grunn av den hyppige bruken av PCR i miljø-DNA-studier. Det vil si at kontamineringen kan bli kopiert til millioner av kopier som

kan spre seg rundt i laboratoriet. For å forhindre dette er det viktig med strenge laboratoriekontroller og blankprøver under hele analysen (Willerslev & Thomsen, 2015).

Det finnes også flere kilder til usikkerhet med resultatene av en miljø-DNA-analyse, som falske negative og falske positive resultater (Figur 4). Falske positive resultater (type I error) vil si at miljø-DNA er detektert i et område der arten ikke er naturlig til stede. Dette kan skje hvis DNA er blitt fraktet fra et område til et annet via f.eks. ballastvann, kloakkutslipp, andre dyr, eller utstyr som ikke er tilstrekkelig sterilisert (Bohmann et al., 2014). Metoden kan heller ikke skille mellom levende og døde organismer, som gjør at f. eks. avføring fra et rovdyr, som inneholder mål-artens DNA, kan dette slå ut som et positivt resultat. (Darling & Mahon, 2011). DNA fra arter som tidligere har oppholdt seg i et område kan også bli detektert, men dette gjelder hovedsakelig i miljø der nedbrytningen av DNA er sakte (Willerslev & Thomsen, 2015). En annen mulighet er at man får falske positive resultater når PCR primerprober ikke er spesifikke nok. Det vil si at DNA bli amplifisert i PCR til tross for at mål-artens DNA ikke er i prøven. (Bohmann et al., 2014). primerprober ikke er spesifikke nok. Det vil si at DNA bli amplifisert i PCR til tross for at mål-artens DNA ikke er i prøven. (Bohmann et al., 2014).

Falske negative resultater (type II error) er når miljø-DNA ikke blir detektert til tross for at mål arten er til stedet i miljøet. Hvis organismen er i miljøet, men det ikke er miljø-DNA i prøvene, kan dette kan komme av utilstrekkelig innsamling eller at DNAet er av for dårlig kvalitet. Alternativt kan miljø-DNA være i prøven, men metoden klarer ikke å detektere det. Dette kan komme av utilstrekkelig sensitivitet hos primere og prober, eller svikt i andre trinn av analysen (Bohmann et al., 2014). Miljø-DNA består av degradert og fragmentert DNA, som betyr at det er hovedsakelig korte DNA-fragmenter i en prøve. Hvis fragmentene man forsøker å amplifisere med primere er for lange, kan man gå glipp av disse sekvensene (Herder et al., 2014). Når man ekstraherer miljø-DNA fra prøver kan det også komme med humussyrer og humusstoffer. Dette gjelder først og fremst i jordprøver, men kan også forekomme i vannprøver kontaminert med sedimentpartikler. Disse substansene hemmer enzymer som Taq Polymerase, som brukes i PCR til å oppformere DNAet. Slike feilkilder er viktig å ta hensyn til, for å unngå resultater som gir et feil inntrykk av artssammensetningen i et miljø (Willerslev & Thomsen, 2015). Det finnes også forholdsregler som kan forhindre flere av disse feilkildene, som bruk av positive kontroller, negative kontroller og blankprøver.

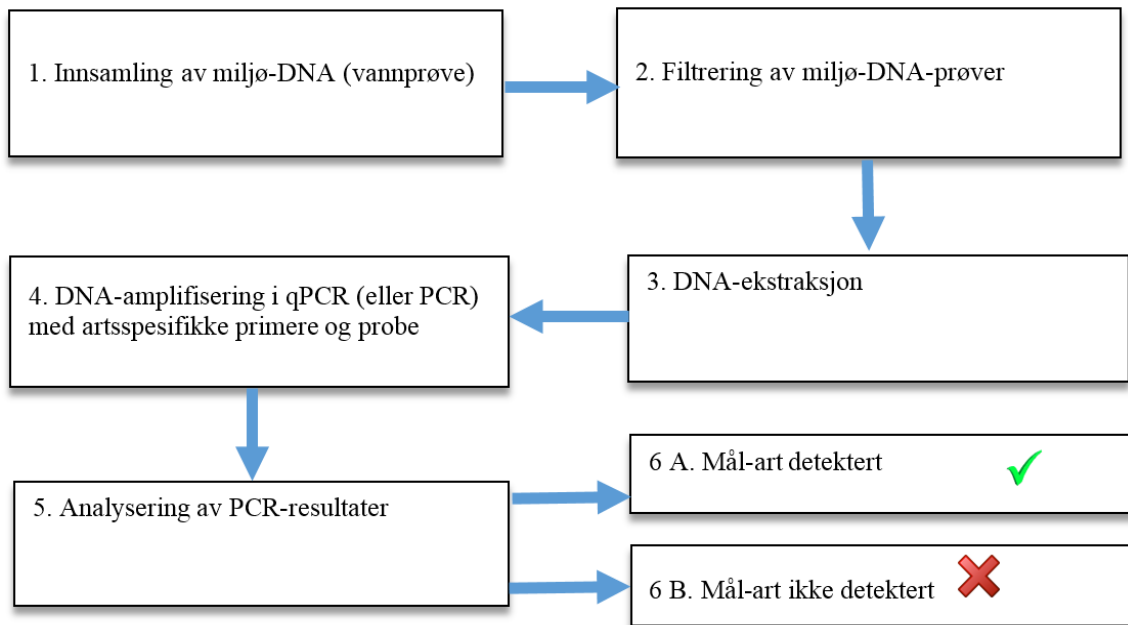
Positive kontroller viser om primerne amplifiserer mål-DNAet, negative kontroller om primerne amplifiserer DNA fra andre arter og blankprøver om det er kontaminering i PCR.



Figur 4 Potensielle kilder til feil ved analysering av miljø-DNA (tegnet etter: Darling & Mahon (2011))

1.3 Artsspesifikk deteksjon

Hvis man vil undersøke om en spesifikk art er til stedet i et akvatisk miljø bruker man artsspesifikk deteksjon. Etter innsamling av miljø-DNA (en vannprøve) inkluderer dette filtrering av vannprøven, ekstraksjon av DNA og analysing av DNA vha. kvantitativ PCR, eller tradisjonell PCR, med artsspesifikke primere og probe (Figur 5) (Rees et al., 2014).



Figur 5 Oversikt over ulike trinn av en miljø-DNA-analyse med artsspesifikke primere.

1. Innsamling av miljø-DNA. 2. Filtrering av vannprøven. 3. Uthenting av DNA fra filter.

4. Amplifikasjon av DNA i qPCR (eller PCR) med artsspesifikke primere og probe.

5. Analysing av qPCR resultater. 6 A. Positivt utslag på qPCR, mål-arten detektert.

6 B. Negativt utslag på qPCR, mål-arten ikke detektert

Kvantitativ PCR, også kjent som realtime-PCR eller qPCR, er foretrukket fremfor tradisjonell PCR i slike analyser fordi de er mer spesifikke (ved bruk av TaqMan prober) og mer sensitive (Pilliod et al., 2014). Visualisering av amplifikasjonskurve er også enklere enn visualisering av PCR-produkt på gel (Herder et al., 2015). Artsspesifikke primere amplifiserer den ønskede DNA-sekvensen fra en art (eller noen få arter som er nært beslektede), og kan kun bli designet hvis den relevante sekvensen allerede er kjent for den spesifikke arten (Freeland, Kirk, & Petersen, 2011). Denne fremgangsmåten har høy spesifisitet og sensitivitet. Likevel er den hemmet ved at den kun kan detektere en art om gangen. For mer diverse bio-systemer kan

denne fremgangsmåten fort bli lite kostnadseffektiv og i noen tilfeller umulig på grunn av mangel på DNA-ekstrakt for mange reaksjoner (Willerslev & Thomsen, 2015).

1.3.1 Verifisering av artsspesifikke primere og prober

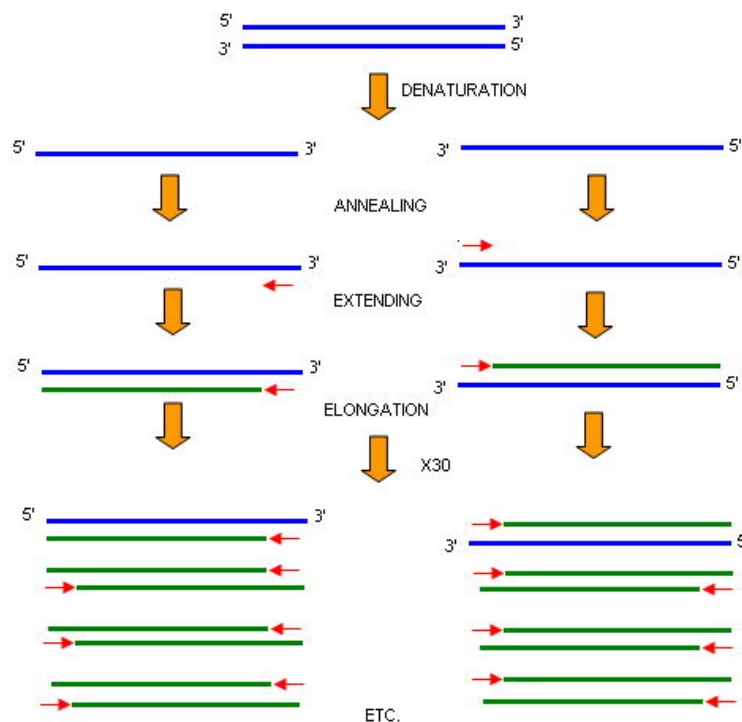
For å kunne amplifisere miljø-DNA i qPCR må man designe primere og en probe som kun passer til mål-artens DNA. Primere er korte (vanligvis mellom 15 og 25 basepar), syntetiske DNA-fragmenter som er nødvendige for å starte syntesen av DNA i PCR. Primerne må være komplementære til den delen av DNA som ligger ved siden av sekvensen man vil syntetisere. Den ene primeren må være komplementær til starten av genet (forward) og en andre til enden (reverse) (Freeland et al., 2011). I miljø-DNA-analyser burde primerne være målrettet mot et kort DNA fragment fordi miljø-DNA-fragmenter vanligvis er kortere enn 150 basepar, på grunn av nedbrytning av DNA i miljøet (Herder et al., 2014). En probe er en enkelttrådet, lineær oligonucleotide som er designet for å øke spesifisiteten til kvantitativ PCR (Holland, Abramson, Watson, & Gelfand, 1991).

De fleste miljø-DNA-studier bruker mitokondriegenet som markør fordi det finnes hundrevis til tusenvis av kopier med mitokondrie-DNA, sammenlignet med to kopier av kjerne-DNA, per celle (Robin & Wong, 1988). Dette høye antallet av kopier forsterker sannsynligheten for å detektere DNA i nedbrutte prøver som miljø-DNA-prøver. Noen mitokondriegenet (f.eks. Cytokrom c oksidase I og cytokrom b) har i tillegg en mutasjonsrate, som gjør dem mer passende for artsidentifisering på grunn av genetisk variasjon. Cytokrom c oksidase I (COI) er et gen som ofte blir brukt som markør i miljø-DNA-analyser fordi ingen andre genetiske regioner, funnet i databaser, dekker så mange arter (Deagle, Jarman, Coissac, Pompanon, & Taberlet, 2014). 12S-genet er en annen markør som blir mye brukt. Miya et al. (2015) brukte blant annet dette når de designet sine primere, da de ikke kunne finne regioner med nok ulikheter i COI genet. Det finnes likevel noen ulemper med mitokondrie-DNA, blant annet at det kun er nedarvet fra mor. Dette gjør at det ikke er mulig å skille mellom hybrider og deres mors art (Giles, Blanc, Cann, & Wallace, 1980).

Før miljø-DNA-analysen må påliteligheten, robustheten, og spesifisiteten til primere og probe bli testet, siden kvaliteten til disse påvirker analysen. De må bli testet *in silico*, så *in vitro* og tilslutt *in situ*. *In silico* vil si at primerne (og probe) blir sjekket opp mot alle kjente sekvenser i offentlige og private databaser, som f.eks. primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Denne testen viser alle arter som potensielt

kan bli amplifisert med disse primerne. Målet er å finne primere som amplifiserer mål-artens DNA, med minimal mulighet for amplifikasjon av andre arter. Primere og probe må så testes *in vitro*. Det vil si testet med kvantitativ PCR på DNA uthentet fra vevsprøver av mål-arten og nært beslektede arter (positiv og negativ kontroll). Til slutt er primerne testet *in situ*, dvs. med kvantitativ PCR på miljø-DNA hentet fra de aktuelle lokasjonene (Herder et al., 2014).

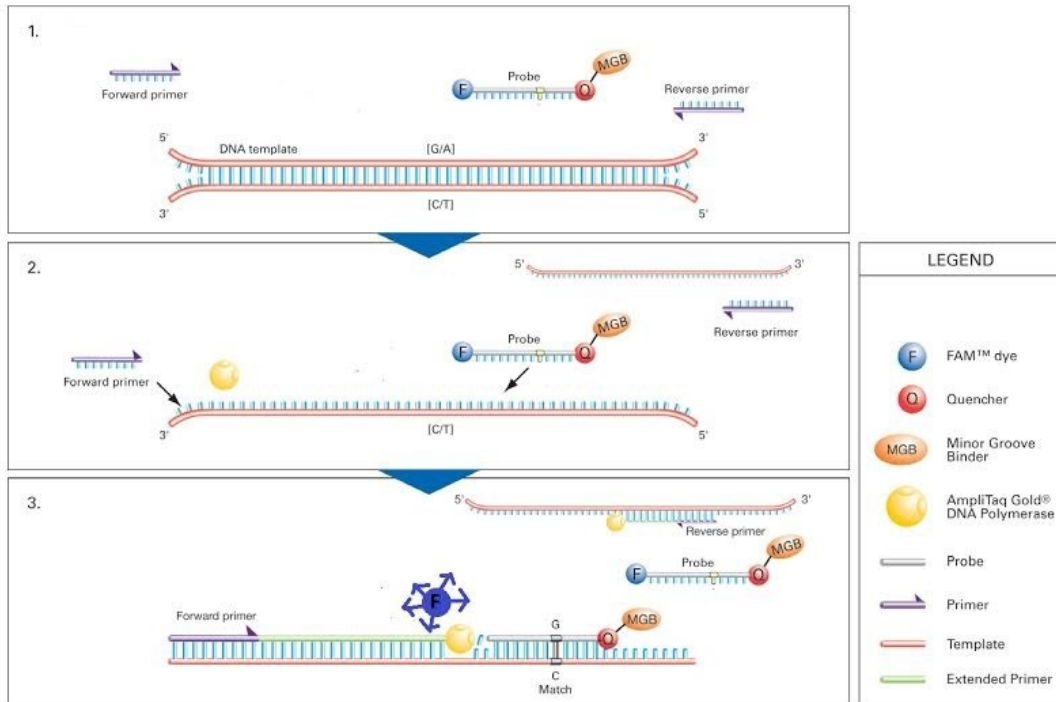
PCR er en prosess som amplifiserer en bestemt DNA-sekvens (Corpus, 2010). Hver syklus i en PCR-reaksjon består av tre trinn: denaturering, hybridisering (anealing) og polymerisering. Ved det første trinnet denatureres DNA-templatet ved høy temperatur (ca. 94°C), slik at DNAet blir enkeltrådet. I trinn to senkes temperaturen slik at primerne kan fester seg til den komplementære sekvensen på DNA-templatet (mellom 50 og 65°C). I det tredje trinnet heves så temperaturen (ca.72°C) slik at DNA-polymerasen kan syntetisere en ny DNA-tråd ved å inkorporere passende nukleotider (Hadidi & Candresse, 2003). Antall sekvenser øker eksponentielt gjennom hele reaksjonen (Figur 6) (Freeland et al., 2011).



Figur 6 Forenklet skisse over en PCR-reaksjon med dens tre trinn: denaturering, hybridisering og polymerisering. Blå streker indikerer DNA-templat, røde piler indikerer primerne og grønne streker indikerer nysyntetiserte DNA-tråder. (Hentet fra Warwik., *biophysical chemistry, PCR (2009)*)

Kvantitativ PCR tillater at amplifikasjonen av DNA kan bli overvåket i real-time mens amplifikasjonen pågår. Amplifikasjon kan utføres raskt (<2 timer) for å bestemme om en spesifikk DNA- eller RNA-sekvens er tilstede, mens den også kalkulerer antall kopier av målsekvensen (Wood et al., 2013). Kvantitativ PCR er allment akseptert som den beste metoden for spesifikk påvisning og kvantifisering av DNA på grunn av sin høye følsomhet og sitt store dynamikkområde for deteksjon (Yao, Nellåker, & Karlsson, 2006). I miljø-DNA-analyser er det vanlig å ha flere qPCR sykluser sammenlignet med tradisjonelt DNA-arbeid, gjerne over 50 (Dejean et al., 2012). Dette er på grunn av den lave DNA-konsentrasjonen, og flere sykluser øker sannsynligheten for å detektere mål-DNAet. Det er likevel viktig å ikke ha for mange sykluser, da dette øker sannsynligheten for falske positive resultater. Det er også viktig å utføre flere replikater av PCR-analysene, for å kunne eliminere falske negative resultater (Herder et al., 2014).

Fragmentene produsert i kvantitativ PCR er enten merket med en fluorescerende fargestoff-prober (TaqMan®) eller DNA-bindende fargestoff (Freeland et al., 2011). I miljø-DNA-analyser er fremgangsmåten med probe fortrukket, da den er mer spesifikk, og resultatene blir mer pålitelige (Herder et al., 2014). En TaqMan fluoriserende-probe er en enkelttrådet, lineær oligonukleotide (Holland et al., 1991), med et fluorogent fargestoff festet til 5' enden (en reporter, som kan bli kvantifisert etter hver syklus (Freeland et al., 2011)), og en quencher festet til 3' enden (Yao et al., 2006). Quencheren hemmer reporteren i å fluorisere når de henger sammen på proben. Når DNA-polymerasen amplifiserer fragmentet, vil proben, dersom den har hybridisert til templatet, bli brutt ned av 5' → 3' eksonuklease-aktiviteten til Taq polymerase. Den fluoriserende reporteren vil da bli frigjort, quencheren vil ikke lengre hemme den, og et signal kan måles (Yao et al., 2006). Taqman minor groove binding (MGB™) prober er en oppgradert versjon av TaqMan proben, som har blitt mye brukt de siste årene (Yao et al., 2006). Denne proben har en MGB hengende på quencheren, som gjør at proben hybridiseres sterkere til enkelttrådet DNA (Figur 7). Dette fører til økt smeltetemperatur (Kutyavin et al., 2000), som gjør at man kan bruke en kortere, og ofte mer spesifikk, probe (Guo et al., 2009). MGB-prober har også en ikke-fluorescerende quencher (NFQ) som gjør at man får mindre bakgrunns støy og dermed bedre presisjon i målingen (Yao et al., 2006).



Figur 7 Illustrasjon av konseptet til Taqman minor groove binding (MGBTM) probe i qPCR. 1. Dobbeltrådet DNA-templat og analysekomponenter. 2. Denaturert templat. 3. Primere og Taqman proben, med sin quencher (Q), og Fam reporter (F), hybridiserer til DNA templatet, og polymerasen syntetiserer en ny tråd. F blir frigjort fra proben, og et fluoriserende signal blir kan detekteres. (Hentet fra: Applied biosystems, TaqMan Gene Expression Assay Solutions (udatert))

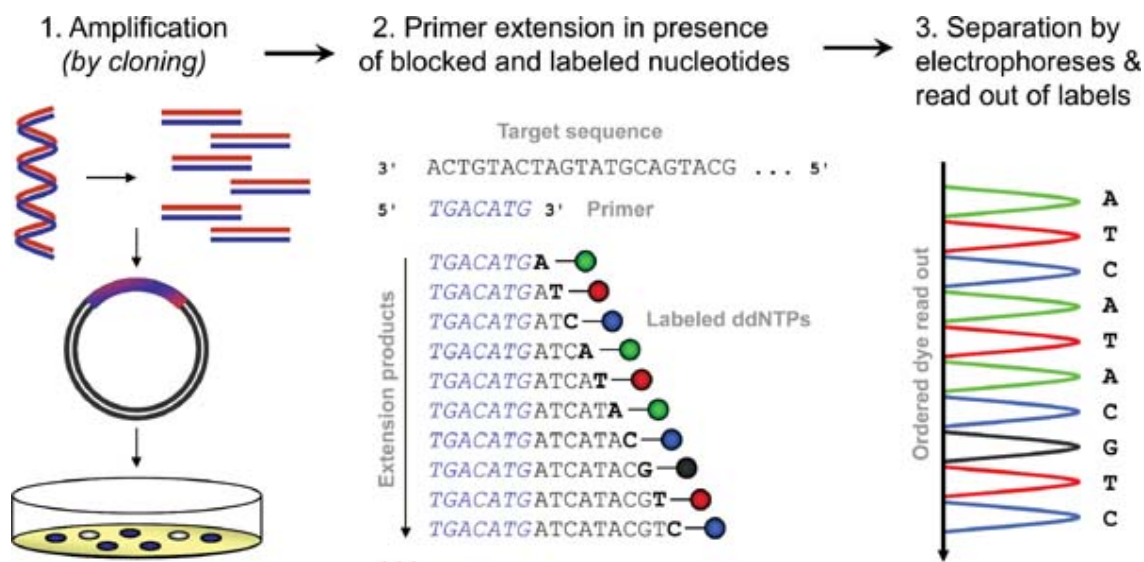
1.3.2 Kontroll av PCR-produktet ved kloning og sekvensering

For å være sikker på at det er mål-artens DNA som blir amplifisert i qPCR, kan man foreta en kontroll ved å klonere og sekvensere qPCR-produktet (Figur 8). qPCR-produktet blir først klonert, bakteriekolonier blir plukket ut og det blir kjørt en qPCR på koloniene, for å se om primere og prober har hybridisert til DNAet. For å være helt sikker på at det er mål-artens DNA som blir amplifisert, kan man sekvensere de bakteriekoloniene som gir positivt resultat i qPCR (Thomsen et al., 2012a).

For å klonere qPCR-produktet blandes DNA, med A overheng i 5' enden, og åpne vektorer, med T-overheng i 3' enden. Noe av DNAet vil da bli ligert inni vektorene, som f.eks. kan være plasmider. Plasmidene blir så introdusert inn i bakterier via transformasjon, dvs. at bakterien tar opp DNA fra omgivelsene. (Noen bakterier kan gjøre dette naturlig, mens andre

må bli behandlet kjemisk eller fysisk). Inne i bakterien vil plasmidene replikere og formere seg, mens bakteriene også formerer seg. Celler som inneholder rekombinante plasmider kan så bli detektert, vha. Blue-White screening (Pierce, 2014) (Se vedlegg I for mer utdypende informasjon om Blue-White Screening).

Sanger sekvensering, eller dideoxy-sekvensering, er basert på syntese av fragmentet man vil sekvensere (Figur 8). Metoden bruker kjede-terminering som går ut på at en DNA-tråd blir syntetisert helt frem til en terminerende base blir inkorporert. Dette skjer ved at man i tillegg til de fire vanlige nukleotidene, deoksyribonukleosidtrifosfater (dNTPs), også bruker spesielle nukleotider kalt di-deoksynukleosidtrifosfater (ddNTPs). Disse nukleotidene mangler OH-gruppen i 3` enden, noe som hindrer polymerasen i å henge på en ny nukleotide. Hver av de fire nukleotidene (ddNTPs) er merket med ulike fluoriserende farger. Under DNA syntesen vil polymerasen sette inn nye dNTP helt frem til en ddNTP blir inkorporert og syntesen stopper opp. Denne prosessen blir gjentatt i flere sykluser. På denne måten blir det produsert fragmenter med ulik størrelse (Pierce, 2014). Disse fragmentene blir så denaturert slik at en får enkeltrådet-DNA, og frie nukleotider og primere blir renset vekk i en renseprosedyre (Kircher & Kelso, 2010). De gjenværende fragmentene går igjennom en kapillærelektroforeseprosess. Her blir fragmentene med ulik størrelse separert ved at de migrerer i ulik hastighet, avhengig av størrelsen på fragmentet, hvor små fragmenter vandrer raskere enn store. Til slutt vil de vandre forbi en laser som aktiverer fluorescensen på ddNTP, og denne fluorescensen blir lest av en optisk skanner. Informasjonen blir lagret på en data og hvert fragment kan så ses som en `topp`, og fargen på `toppen` indikerer hvilken base som er til stedet (Pierce, 2014). Den oppnådde DNA-sekvensen kan så sammenlignes med kjente sekvensert i en database for å verifisere arten (Herder et al., 2014).

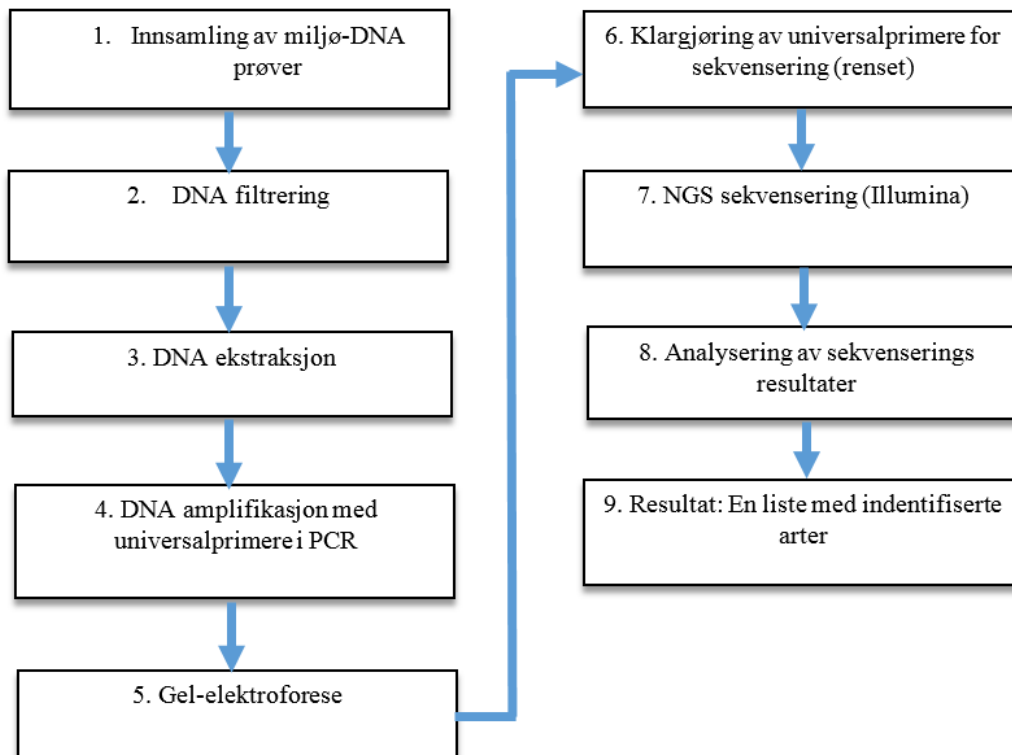


Figur 8 Kontroll av PCR-produkt. 1. Kloning av DNA-fragment som skal sekvenseres 2. Trådsyntese i PCR på koloniene fra kloningen, ved hjelp av en primer og en blanding av dNTP og ddNTP. Under DNA-syntesen vil polymerasen sette inn nye dNTP helt frem til en ddNTP blir inkorporert og syntesen stopper opp. Dette produserer fragmenter med ulik størrelse 3. Separering av DNA-fragmenter med kapillærelektroforese og avlesning av fluoriserende merker på ddNTP (Hentet fra: Kircher and Kelso (2010))

1.4 Multi-arts deteksjon (miljø-DNA metabarkoding)

Hvis man vil studere flere, eller alle, artene i et miljø bruker man multi-arts deteksjon. Denne metoden bruker ofte universalprimere, som amplifiserer DNA fra en gruppe mål-arter. Dette er mulig da homologe sekvenser hos ulike arter ofte viser en grad av likhet med hverandre, fordi de nedstammer fra samme gen (Freeland et al., 2011). Universalprimer, som artsspesifikke primere, må kunne amplifisere korte DNA-sekvenser, som degradert DNA fra miljø-prøver. De må også være spesifikke til målorganismegruppen, for å unngå amplifikasjon av ikke-mål DNA i prøven. (Epp et al., 2012). Slik som med artsspesifikk deteksjon må man først samle inn miljø-DNA-prøvene, f.eks. vannprøver. Vannprøvene er så filtrert, DNAet ekstrahert og universalprimere for amplifisering i PCR designet. For å kontrollere at universalprimerne amplifiserer DNAet i prøvene, kan man kjøre en gelelektroforese. Hvis universalprimerne fungerer som forventet kan PCR-produktet renses og sekvenseres med NGS teknologi, som Illumina. De sekvenserte sekvensene er så

sammenlignet med sekvenser i en referanse database for å generere en liste med arter tilstede (Figur 9) (Herder et al., 2014).



Figur 9 Illustrerer forløpet ved multi-arts deteksjon av miljø-DNA i vannprøver.

1. Innsamling av miljø-DNA. 2. Filtrering av vannprøvene. 3. Ekstraksjon av miljø-DNA. 4. DNA-amplifisering med universalprimere i PCR. 5. Gel-elektroforese. 6. Klargjøring av universalprimere for sekvensering. 7. NGS-sekvensering. 8. Analysering av sekvenserings resultater. 9. Resultatet er en liste med identifiserte arter

Multi-arts deteksjon er en kostnadseffektiv fremgangsmåte og teknologien for å sekvensere store mengder DNA forbedres stadig. Det største ulempen når man bruker generiske primere for metabarkoding, er skjevhet i primer-affinitet. Det gjør at visse DNA-sekvenser (arter) amplifiseres mindre effektivt enn andre. Dette vil igjen begrense resultatene til arter med best primeraffinitet. Slike begrensninger vil bli kontinuerlig mindre på grunn av optimalisering og publisering av generiske primere for metabarkoding (Willerslev & Thomsen, 2015).

1.4.1 Kontroll av universalprimere med gel-elektroforese

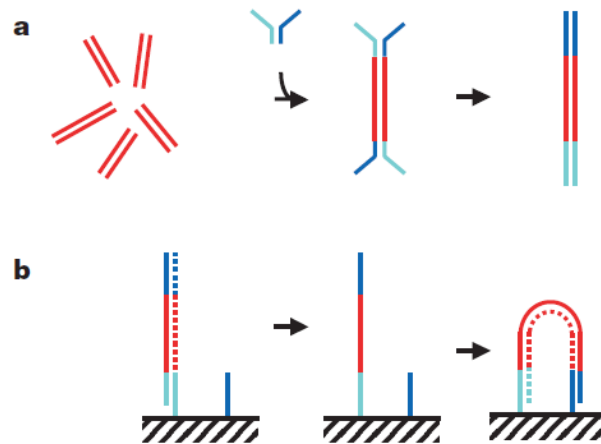
For å være sikker på at miljø-DNAet har blitt amplifisert i PCR kan man kjøre gel-elektroforese. PCR produktet blir overført til ulike brønner i en agarose gel eller akrylamidgel, og en elektrisk strøm blir tilført. DNA-molekylene, som er negativt ladet, vandrer mot den positive elektroden. Migrasjonshastigheten til DNA-fragmentene avhenger hovedsakelig av størrelse på fragmentet, hvor små fragmenter vandrer raskere enn store. For å visualisere DNA-molekylene bruker man fargestoffer, som etium-bromid, som binder seg til DNA, og som kan visualiseres ved hjelp av kort-bølget ultrafiolett lys. En størrelsesstandard, som består av DNA-fragmenter med kjent størrelse, blir brukt til å bestemme størrelsen på DNA fragmentene (Freeland et al., 2011).

1.4.2 Illumina sekvensering

For å få en komplett liste over DNA-sekvenser i en miljø-DNA-prøve må PCR-produktet sekvenseres med en NGS teknologi, som Illumina. Illumina-metoden er basert på en revers terminator teknologi, og benytter et sekvenseringskonsept (sekvensering ved syntese) hvor inkorporeringsreaksjonen stoppes etter hver base. Nukleotidene som brukes har en fluorescerende «tag» (merking) for hver type nukleotid (A, T, C, G). Hvert nukleotid har også en kjemisk gruppe (en terminator) som, etter inkorporert inn i den voksende DNA-tråden, hindrer inkorporering av flere nukleotider. Denne termineringen er reversibel, og kan bli kjemisk fjernet (Kircher & Kelso, 2010).

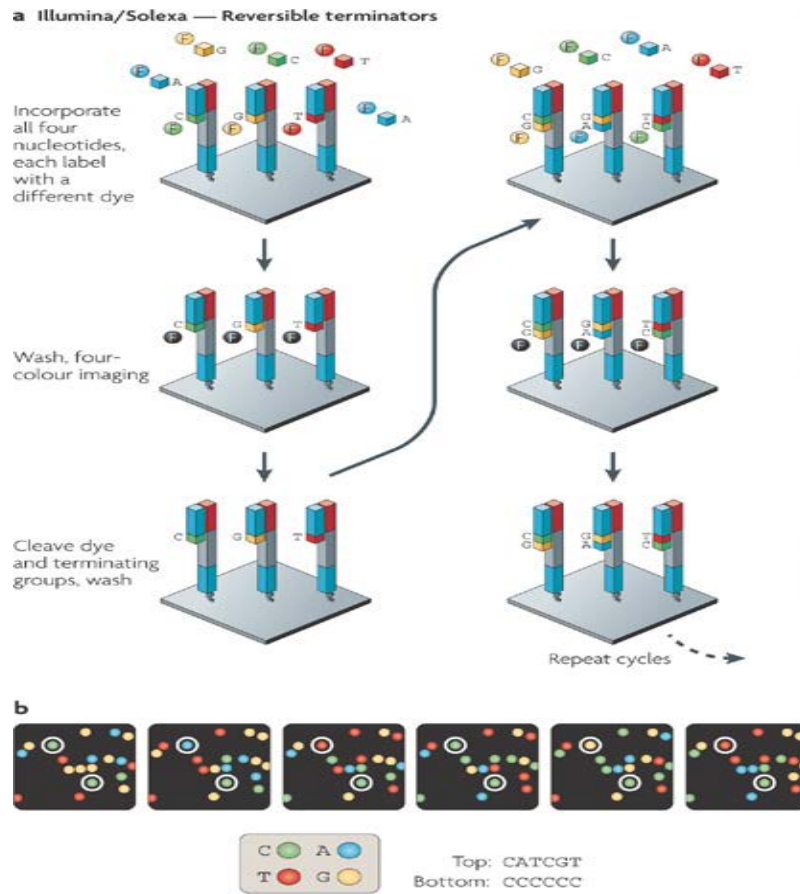
Før sekvensene kan bli sekvensert må det lages et sekvensbibliotek. Primerne brukt til sekvensering har fått adaptere og indekser festet til endene. Adapterne er nødvendige for amplifikasjon og sekvensering, og indeksene er nødvendig for å kunne skille mellom ulike prøver etter at de er slått i sammen (Kircher & Kelso, 2010). Adapter regionen til DNA-trådene hybridiserer til komplementære oligonukleotidene i en flytcelle. Polymerase fester seg så i 3' enden av DNA-sekvensen og syntetiserer en ny, komplementær, tråd. Den originale tråden blir vasket vekk, slik at det kun er reverstråden som står igjen. Adapter sekvensen i 3' enden av hver tråd danner så en bro ved bøyer seg over og hybridiserer seg til sin komplementære oligonukleotide på flytcellen. Polymerase hybridiserer til tråden og syntetiserer en komplementær tråd. (Bentley et al., 2008). Denne prosessen kalles broamplifisering og mer enn 40 millioner klynger (clusters) dannes på flytcellen, hvor hver klynge stammer fra en enkelt original tråd (Figur 10). Prosessen blir gjentatt flere ganger

inntil hver klynge har rundt tusen kopier av det originale templatet, både forward og revers-sekvenser (Morozova & Marra, 2008). Før sekvensering vaskes alle reverstrådene vekk, slik at det kun er forwardtråder igjen og hver klynge består av enkelttråder som er identiske kopier av originalsekvensen (Bentley et al., 2008).



Figur 10 Modifisering og broamplifisering. A. Klargjøring av primere for sekvensering ved liggering av adaptore og indekser på endene. B. Broamplifisering ved at DNA-tråden bøyer seg og bindes kovalent til adapterens komplementære oligonukleotide i flytcellen (Hentet fra Bentley et al. (2008))

Biblioteket er nå komplett og sekvensene kan bli sekvensert. Primere fester seg til adapteren på sekvensen som skal bestemmes, og polymerase forlenger sekvensen ved å inkorporere nukleotider som er merket med ulik fluorescens og som har en inaktiv 3`-OH gruppe. Den inaktive OH-gruppen fungerer som en terminator og sikrer at kun et nukleotid blir satt inn i hver runde (Shokralla, Spall, Gibson, & Hajibabaei, 2012). Polymerasen og de frie nukleotidene vaskes så vekk og merkingen av de inkorporerte basene for hver sekvens blir lest av. Dette blir gjort ved hjelp av fire bilder tatt gjennom ulike filtre, og ved å bruke to ulike lasere (rød: A, C og grønn G, T) til å illuminere fluorescensen. Terminator og fluorescens blir så fjernet og prosessen gjentas med inkorporering av neste base. Slik fortsetter det til hele sekvensen er lest (Figur 11) (Kircher & Kelso, 2010).



Figur 11 Illustrasjon av Illumina sekvensering. A. De fire nukleotidene med ulike fluorescerende merking blir skylt over flytcellen, og passende nukleotide blir inkorporert i DNA-sekvensen. Polymerasen og frie nukleotider blir vasket vekk, og det blir tatt et bilde av fluorescensen til den inkorporerte nukleotiden. Terminator og fluorescens blir vasket vekk, og prosessen gjentas. B. Bilde av fluorescensen i flytcellen. (Hentet fra: Metzker (2010))

2 Problemstilling

Målet med oppgaven er å etablere miljø-DNA-metoden for påvisning av utvalgte marine fiskearter. For analysering av miljø-DNA, uthentet fra vannprøver, vil jeg benytte artsspesifikk deteksjon for å påvise tilstedeværelsen av utvalgte fiskearter i åtte ulike lokaliteter langs kysten av Sør-Norge. Jeg vil også benytte multiart-deteksjonsmetoden, med Next generation sequencing, for påvisning av mange arter. For å studere effektiviteten til miljø-DNA-metoden skal jeg sammenligne resultatene fra miljø-DNA-analysen med fiskeartene observert, i de samme områdene, med en tradisjonell metode, standnotttrekk (utført av Havforskningsinstituttet i Agder, Flødevigen).

3 Metoder

3.1 Strandnottrekk

Strandnottrekket ble utført mellom 16. og 18. september av Havforskningsinstituttet i Flødevigen, Arendal. Trekket ble utført samme dag og på samme lokalitet som innsamlingen av miljø-prøvene. Nota som ble brukt er 30 meter lang, 3,7 meter høy og har en maskevidde på 15 millimeter (strukket maske). I hver ende har den 30 meter lange tau, og dekker totalt et areal opp mot ca. 700 m². All fisk som ble fanget i nota ble identifisert, telt og lengde-målt. Fiskene ble sluppet løs når ferdig.

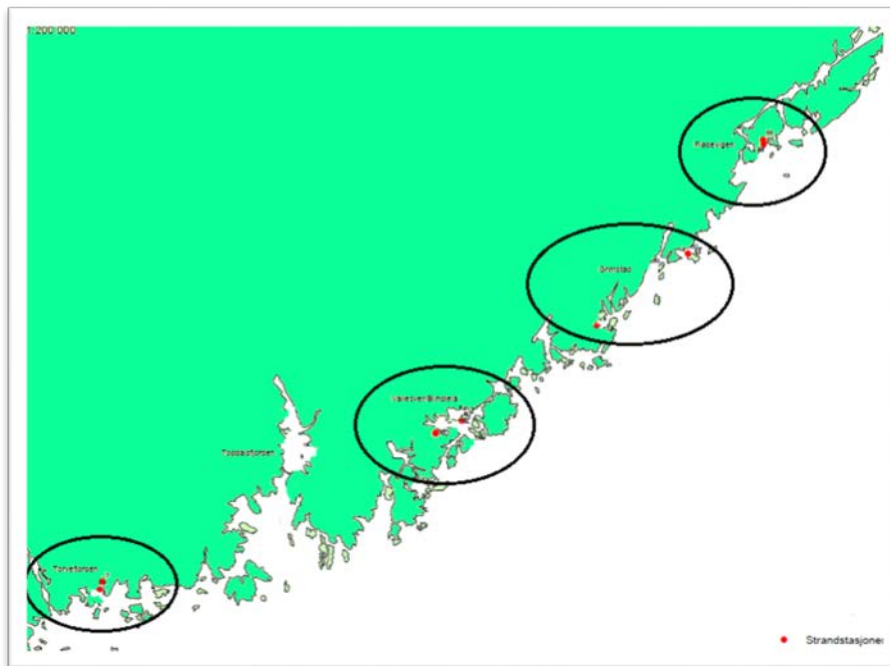
3.2 Innsamling av miljø-DNA

Miljø-DNAet ble samlet inn av Espen Moland Olsen fra havforskningsinstituttet i Flødevigen, Arendal (Figur 12). Miljø-DNAet ble samlet inn rett etter strandnottrekket, med et 50 ml-skrukorkrør jevnt fordelt over strandnottrekk området. Hver miljø-DNA-prøve besto av 700 ml vann som ble lagret i sterile plast flasker. Hver flaske ble markert med stasjonsnummer, område og dato. For å forhindre kontaminering mellom ulike områder ble det brukt nye hansker og nye innsamlingsrør for hver lokalitet. Prøvene ble så lagt på is inntil de kunne bli lagt i fryser.



Figur 12 Innsamling av miljø-DNA etter strandnottrekket i Kumkroken (stasjon 36), Flødevigen

Strandnottrekket og innsamling av miljø-DNA ble utført i Rauskjer (stasjon 3, 58°4'3.6"N 7°48'46.2"E) og utenfor Risøya (Stasjon 5, 58°3'40.5"N 7°46'42.7"E) i Torvefjorden (Søgne). I indre Lusekilen (stasjon 36, 58°11'45.8"N 8°17'16.1"E) og utenfor Fjelldalsøya (stasjon 41, 58°12'25.9"N 8°18'47.2"E) i Høvåg. I Bufjorden (stasjon 57, 58°17'10.8"N 8°31'26.4"E) og i Hesnessund (stasjon 60, 58°20'13.7"N 8°38'31.2"E) i Grimstad og i Lillehavn (stasjon 65, 58°25'22.2"N 8°45'10.8"E) og Kumkroken (stasjon 66, 58°25'36.5"N 8°45'9.6"E) i Flødevigen (Figur 13).



Figur 13 Kart over stasjoner for strandnottrekk og innsamling av miljø-DNA. Røde prikker viser de ulike stasjonene

3.3 Filtrering av vannprøver (miljø-DNA)

De frosne miljø-DNA-prøvene ble satt til tining i lunnet vann (ca. 1,5 timer). For at springvann ikke skulle komme oppi flaskene ble det nøye passet på at de ikke kantet. Filtreringsutstyret satt sammen av en gummipakning, en 1000 ml sugekolbe, og en vakuumslange, som ble montert på sidearmen til sugekolben. Vakuumslangen ble koblet til en vakuumpumpe (Reciprotor, The electromagnetic piston pump 506 R, 220 volt, 50 watt, København, Danmark). En perforert glasstrakt ble plassert i gummipakningen og på trakten ble det plassert et nylonfilter, med en diameter på 47 mm og en 0,45 µl pore størrelse (Pall

Corporation, Ann Arbor, Michigan). For at dette skulle ligge på plass ble det dekket med destillert vann. På toppen ble det plassert et 250 ml vakuump-filtreringsglass, som ble festet til glasstrakten ved hjelp av en aluminiums klemme (Figur 14).



Figur 14 Bilde av filtreringsutstyr

450 ml av hver vannprøve ble vakuump-filtrert. Hvert filter ble så rullet sammen og lagt i separate «samlerør». Rørene ble merket og fryst (-20°C). For hver ny filtrering ble utstyret desinfisert i 10% klor i minimum 10 minutter.

3.4 DNA-isolering

3.4.1 DNA- isolering av miljø-DNA-prøver

For å isolere DNA fra miljø-DNA-prøvene ble Qiagen DNeasy Blood and tissue kit (Qiagen, Inc., Valencia, California, USA) benyttet. De frosne filtrene fra vakuump-filtreringen ble lagt i hvert sitt rene plastveieskip for å tine. Etter tining ble filtrene rullet sammen og kuttet opp i ca. 1 mm tynne slides og puttet i beadbeating rør med 0,3 g 0,5 mm Zirconia/Silica beads.. 750 µl ATL-buffer (fra Qiagenkitet) ble tilført og rørene ble ristet i en beadbeatingmaskin (MAGNA Lyser, Rocher) i 45 sekunder ved 2800 oscillations. De ble så satt i en varmeblokk i 30 minutter ved 56°C. De ble så ristet igjen i 45 sekunder ved 2800 oscillations. 80 µl Proteinase K ble tilført, før rørene igjen ble satt på en varmeblokk ved 56°C i 2 timer. Ved jevne mellomrom ble innholdet blandet ved å knipse på rørene. Rørene ble så vortexet i 15 sekunder

og sentrifugert (Centrifuge 5810R, Eppendorf) i 1 minutt ved 8000 rpm (6000g). Supernatanten, 600 μ l, ble så overført til nye 2 ml mikrosentrifugerør. 600 μ l AL-buffer ble tilført og rørene ble vortexet i 15 sekunder. 600 μ l etanol (96%) ble tilført, og rørene ble igjen vortexet i 15 sekunder. De 1800 μ l i rørene ble så fordelt på 3 DNeasy Mini spinn kolonner plassert i 2 ml samlerør (600 μ l i hver). Rørene ble så sentrifugert ved 8000 rpm i ett minutt. DNeasy Mini spinnkolonnene ble så forsiktig tatt ut av samlerørene, slik at de ikke kom i kontakt med væsken som inneholdt etanol, og overført til nye 2 ml samlerør. De brukte rørene, med væsken, ble kastet. 500 μ l AW1 vaskebuffer ble tilført og rørene ble sentrifugert ved 8000 rpm i ett minutt. Samlerørene, og bunnfallet, ble igjen kastet og spinn kolonnene plassert i nye 2 ml samlerør. 500 μ l AW2-buffer ble tilført og rørene ble sentrifugert i 3 minutter ved 14,000 rpm (20,000 x g) for å tørke DNeasy membranene. Samlerørene med bunnfallet ble kastet, og spinnkolonnene plassert i nye 2 ml mikro sentrifuge rør, som hver var merket med en bokstav, A, B og C.

50 μ l AE-buffer ble så pipettert direkte på DNeasy membranen til rør A. Rørene ble inkubert i ett minutt ved romtemperatur og sentrifugert i ett minutt ved 8000 rpm. 50 μ l AE-buffer ble igjen tilført de samme rørene (rør A), og igjen inkubert ved romtemperatur i ett minutt, og sentrifugert ved 8000 rpm i ett minutt. 50 μ l fra rør A ble så pipettert over DNeasy membranen til rør B, som ble inkubert i ett minutt ved romtemperatur og sentrifugert ved 8000 rpm i ett minutt. Den samme prosedyren ble gjentatt slik at rør B inneholdt 100 μ l, og rør A ble kastet. 50 μ l fra rør B ble så overført til DNeasy membranen til rør C, som ble inkubert i ett minutt ved romtemperatur og sentrifugert i ett minutt ved 8000 rpm. Den samme prosedyren ble gjentatt, slik at rør C inneholdt 100 μ l, og rør B ble kastet. De 100 μ l fra rør C ble så pipettert over til et nytt 1,5 ml mikro sentrifuge rør som ble markert med stasjons nummer.

DNA-mengde og renhet i prøvene ble bestemt ved hjelp av et spektrofotometer (Nanodrop T1000). For å initiere maskinen ble det brukt 1,2 μ l destillert vann og for å ta en blankprøve 1,2 μ l AE-buffer. 1,2 μ l av hver DNA-prøve ble analysert. Prøvene ble lagt på frysen (-20°C) inntil videre arbeid.

3.4.2 DNA-isolering av genomisk fiske-DNA.

For å isolere DNA fra torsk (*Gadus morhua*), sei (*Pollachius virens*), svartkutling (*Gobius niger*), bergnebb (*Ctenolabrus rupestris*) og grønnngylt (*Symphodus melops*) ble Qiagen DNeasy Blood and tissue kit (Qiagen, Inc., Valencia, California, USA) benyttet. Omtrent 25 mg muskelprøve (halefinnen) fra hver art ble kuttet opp i små biter i hver sitt rene plastveieskip. Dette ble så overført til hvert sitt 1,5 ml sentrifuge rør og 180 µl ATL-buffer ble tilført. Hvert rør ble merket med passende navn. Til hvert av rørene ble det så tilført 20 µl proteinase K, etterfulgt av 30 sekunder med vortexing. Rørene ble inkubert ved 56°C inntil muskelprøvene var helt lysert (ca. 2,5 timer). Rørene ble vortexet et par ganger under inkubering for å blande prøvene.

Etter inkubering ble rørene vortexet i 15 sekunder, 200 µl AL-Buffer ble tilført, og rørene ble igjen vortexet i 15 sekunder. Så ble 200 µl etanol (96-100%) tilført og rørene vortexet. Væsken i rørene ble pipettert over til hver sin DNeasy Mini spinn kolonne plassert i et 2 ml samlerør. Dette ble sentrifugert i ett minutt ved 8000 rpm. Samlerørene med bunnfallet ble kastet, og DNeasy Mini spinn kolonnene ble plassert i nye 2 ml samlerør. 500 µl AW1-buffer ble tilført alle kolonnene og sentrifugert i ett minutt ved 8000 rpm. Samlerør og bunnfall ble igjen kastet og DNeasy Mini spinn kolonnene ble plassert i nye 2 ml samlerør. 500 µl AW2-buffer ble tilført og for å tørke membranen helt ble de sentrifugert i tre minutter ved 14,000 rpm. Samlerør og bunnfall ble kastet og kolonnene plassert i nye 2 ml samlerør. 50 µl AE-buffer ble så pipettert direkte på DNeasy membranene, prøvene ble inkubert ved romtemperatur i ett minutt og så sentrifugert i ett minutt ved 8000 rpm for å eluere. 50 µl AE-buffer ble igjen pipettert direkte på membranene, prøvene ble inkubert ved romtemperatur i ett minutt, så sentrifugert i ett minutt ved 8000 rpm. Mengde DNA og renhet i prøvene ble målt ved hjelp av et spektrofotometer (Nanodrop T1000). Prøvene ble så lagret i fryseren (-20°C).

3.5 Primer og probe design

3.5.1 Artsspesifikke primere og prober

For å finne passende primere og prober ble DNA-sekvens-databasen ved NCBI (The National Center for Biotechnology Information) brukt for å finne sekvensen for Cytokrom c oksidase I (COI) genet til torsk, sei, svartkutling, bergnebb og grønnngylt. Disse artene ble valgt da de ble observert ved de fleste stasjoner.

Primer-BLAST i NCBI ble så brukt for å finne primere og prober som er spesifikke for hver art. De fleste standard oppsett ble brukt bortsett fra max lengden på PCR produkt ble endret til 250 nukleotider, database ble endret til nr. og organisme navn ble fjernet. På avanserte parametere ble det markert at intern hybridiserings oligo (probe) var ønsket. Primere og probe med høyest score og lavest E-verdi ble valgt for hver art.

Ved hjelp av programmet Primer express software, version 3.0 (Life Technologies) ble proben forkortet mest mulig for å få mer spesifikk binding. Dette programmet tar hensyn til MGB og Fam i endene av probene, noe Primer-BLAST programmet fra NCBI ikke gjør. For å dobbeltsjekke at de ulike probene ikke ville passe til andre arter ble det kjørt en multiple sequence alignment i clustal Omega, EMBL-EBI, mot alle andre arter som ble registrert i strandnottrekket.

Primere ble bestilt fra Eurofins Genetics (Tyskland), og prober fra Applied Biosystems, by Life Technologies (USA). Probene var merket med Taqman minor groove binding (MGBTM) (quencher) i 3` enden og med FAM (reporter) i 5` enden.

3.5.2 Universalprimere

Fem ulike universalprimerpar, som tidligere har blitt brukt i miljø-DNA-analyser, ble valgt ut fra 3 publikasjoner (Tabell 8). Nukleotide-BLAST i NCBI ble benyttet for å sjekke at universalprimerene ville passe til fiskeartene funnet i strandnottrekket. Primere ble bestilt fra Eurofins Genetics (Tyskland).

3.6 Artsspesifikk deteksjon

3.6.1 Utprøving av artsspesifikke primere og prober

Primerne ble tilsendt i tørket tilstand, og det ble laget en stocksolution på 100 μM ved å tilføre oppgitt mengde AE-buffer (vedlegg II og vedlegg III). Probene var tilsendt med en konsentrasjon på 100 μM . For å lage en workingsolution, på 10 μM , ble 10 μl av stockløsning blandet med 90 μl AE-buffer i nye eppendorfrør. Rørene med primere og prober ble så sentrifugert i 1 min ved 8000 rmp.

Alle primere og prober ble testet i qPCR (StepOnePlus Real-Time PCR system, Applied Biosystems) opp mot en positiv kontroll (måartens-DNA), DNA fra de andre artene, noen utvalgte miljø-DNA-prøver og blankprøve, for å teste at de fungerte som forventet. Torsk-probe 2- og svartkutling-probe ble så testet mot alle miljø-DNA-prøvene. Alle forsøk ble gjentatt flere ganger. Der resultatet ble som forventet ble det utført triplikater av forsøket.

For å lage en mastermix ble følgende oppskrift brukt: 10 μl TaqMan Environmental Master Mix (Thermo Fisher Scientific microbiology), 0,9 μl H₂O, 1,8 μl primer R (10 μM), 1,8 μl primer F (10 μM) og 0,5 μl probe (10 μM).

15 μl av mastermixen ble så overført til hver sin brønn i microAmp strips (Applied Biosystems). Det ble brukt 5 μl templat for analyse av miljø-DNA-prøvene, og 1 μl templat + 4 μl H₂O for analyse av genomisk fiske-DNA. I blankprøven ble det tilført 5 μl H₂O (20 μl i hver brønn). Stripsene ble spunnet i GalaxyMini (VWR) i 1 minutt for at all væske skulle samle seg i bunnen av rørene.

Det ble kjørt en qPCR med denne temperaturprofilen: 50° C, 2 min; 95 ° C, 10 min; etterfulgt av 60 sykluser, 95 ° C, 15 sek; og 60 ° C; 1 minutt med fluorescens deteksjon etter hver syklus.

Torsk 1-, sei-, bergnebb- og grønngylt-probe ble også utprøvd med ulike annealing-temperaturer: 58 °C, 62°C, 64°C og 66°C.

Sensitivitet til primere og probe for torsk og svartkutling:

Sensitiviteten til torsk 2- og svartkutling-probe ble estimert ved å teste dem på ulike fortynninger av torsk-, svartkutling- og miljø-DNA. 10 X fortynningsrekke ble laget for

torske-DNA og svartkutling-DNA. Dette ble gjort ved å blande 2 µl genomisk fiske-DNA med 18 µl H₂O i et nytt eppendorfrør. Dette ble blandet godt sammen før 2 µl av dette ble overført til et nytt rør og blandet med 18 µl H₂O. Prosessen ble gjentatt 10 ganger. Formel 1 viser utregningen av DNA-konsentrasjon i PCR-reaksjonen.

Formel 1 Utregning av DNA-konsentrasjon i PCR-reaksjonen med fortennet torsk- og svartkutling-DNA

$$\frac{\text{Opprinnlig DNA konsentrasjon} \times 3 \mu\text{l (antall } \mu\text{l i prøven)}}{20 \mu\text{l (total mengde væske i reaksjon)}} \\ = \text{konsentrasjon av DNA i PCR reaksjonen (ng/}\mu\text{l)}$$

Det ble så kjørt en qPCR med torske-probe 2 mot ufortynnet torske-DNA, de 10 fortenningene og blank. Det samme ble gjort med svartkutling-proben. Det ble brukt 17 µl mastermix og 3 µl fiske-DNA. Samme mastermix og temperaturprofilen som tidligere ble brukt.

Miljø-DNA-prøvene ble fortennet ved å blande 1 µl (fra stasjon 36) med 9 µl AE-buffer. Dette ble gjentatt 5 ganger. Torsk 2- og svartkutling-probe ble så testet med qPCR mot ufortynnet miljø-DNA, de 5 fortenningene og blank. Det ble brukt 18 µl mastermix og 2 µl miljø-DNA, og temperaturprofilen ble brukt. Formel 2 viser utregningen av DNA-konsentrasjon i PCR-reaksjonen med fortennet miljø-DNA.

Formel 2 Utregning av DNA-konsentrasjon i PCR-reaksjonen med fortennet miljø-DNA

$$\frac{\text{Opprinnlig DNA konsentrasjon} \times 2 \mu\text{l (antall } \mu\text{l i prøven)}}{20 \mu\text{l (total mengde væske i reaksjon)}} \\ = \text{konsentrasjon av DNA i PCR reaksjonen (ng/}\mu\text{l)}$$

3.6.2 Kloning

For å lage agar-skåler til kloning av PCR-produkt (fra torske-probe 2 og svartkutling-probe) ble det blandet 37 gram LB-Agar (MILLER) med 1 liter destillert vann. Dette ble blandet godt før det ble satt i en autoklav (Steen Sterilizer HV series, HMC Europe). Her ble prøvene inkubert i 121°C i 20 minutter for å drepe alle bakterier. Blandingen ble så kjølt ned til ca.

60°C og 500 µl ampicillin ble blandet inn. Væsken ble helt over i agar-skåler (ca. 0,5 cm), og satt i stabler. Disse ble stående på benken i 2 dager til gelen var stivnet, før de ble dekket i plast og satt i kjøleskapet.

For å ligere sammen vektor og mål-DNA ble QIAGEN^R PCR Cloning kit (cat. nos. 231122 og 231124) brukt. Vektoren i kittet var lineær med U-overheng i 3` enden, slik at PCR-produktet, med A-overheng i 3` enden, kunnen bli direkte ligert. Alle ingrediensene ble godt mikset før bruk og satt på is. 1 µl pDrive Cloning Vector (50ng/µl) ble blandet sammen med 2 µl PCR-produkt, 2 µl H₂O og 5 µl Ligation Master Mix, 2x. Dette ble gjort for 2 reaksjoner, en for PCR-produkt med svartkutling-probe, og en for PCR-produkt med torske-probe 2. Dette ble så lett mikset og inkubert i 10°C i en time i PCR-maskinen (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems).

Rør med kompetente bakterieceller (MAX Efficiency^R DH10BTM Competent Celles) ble satt på is. 100 µl av dette ble overført til 4 nedkjølte Falcon^R 2059 rør (17 x 100mm polypropylene rør). Det ble tilført 1 µl av PCR-produkt fra torske-probe 2 til det ene røret, og 1 µl PCR-produkt fra svartkutling-probe til et annet. 1 µl PCR-produkt fra torske-probe 2 ble fortynnet med 4 µl AE-buffer, og 2 µl av dette ble pipetert til et tredje rører med kompetente celler. Til det siste røret ble det tilført 5µl (50 pg) kontroll-DNA. Innholdet i rørene ble blandet forsiktig sammen ved å knipse lett på bunnen av rørene. Det ble så inkubert i 30 minutter på is. Rørene ble satt over i flytebrygger og inkubert i vannbad, 42°C, i 45 sekunder. Deretter ble de satt tilbake på is i 2 minutter. 900 µl S.O.C-medium ble tilført alle rørene (vedlegg IV). Dette ble inkubert i 37 °C i 60 minutter, ved 225 rpm.

Det ble pipetert 40 µl X-Gal-løsning (20mg/ml) (Thermo Scientific) og 40 µl IPTG-løsning (100mM) (SGMA) på samme sted på hver LB_{AMP}-skål. Dette ble blandet og jevnt fordelt utover skålen med en bakterieøse. Skålene ble satt på benken, med lokket havveis av. Da de var tørket ble lokket ble satt på, og skålene ble stående på benken inntil en halv time før transformering. Da ble skålene satt i et varmeskap med 30°C.

Etter 30 minutter ble skålene hentet ut av varmeskapet. Kontroll-plasmid-DNAet ble fortynnet 1:100 ved å blande 10 µl av dette med 990 µl S.O.C. Medium. 100 µl av hver bakterieløsning ble så pipetert til hver sin LB_{AMP}-skål og spredd utover med en bakterieøse. Skålene ble merket tosk A og svartkutling A, fortynnet A og kontroll-DNA. Den gjenværende bakterieløsningen ble sentrifugert i 2 minutter, 2000 rpm. Supernatanten ble pipetert vekk og

den gjenværende pelleten ble resuspendert i 100 µl S.O.C. Medium. Disse 100 µl ble spredd på nye LB_{AMP}-skåler, som ble merket tosk B og svartkutling B, fortynnet B. Alle skålene ble inkubert ved 37°C til neste dag.

Neste dag ble antall blå og hvite kolonier på hver skål telt. Hvite kolonier, som lå mest mulig separert fra blå kolonier, ble plukket ut å stryket på nye LB-skåler med en bakterieøse. Det ble plukket 3 kolonier fra torske-DNA merket A1, A2 og A3 og tre fra svartkutling-DNA merket B1, B2, B3. Falcon^R 2059 rør (17 x 100mm polypropylene rør) ble fylt med 5 ml S.O.C medium og 5 µl ampicillin. Hver bakterieøse, brukt til å spre kolonier på nye LB-skåler, ble rørt i hvert sitt falconrør. Disse rørene ble så satt i et varmeskap (37°C), ved 225 rpm, til neste dag.

Det ble kjørt en qPCR på de samme koloniene. Oppskriften som ble fulgt var: 10 µl Taqman, 5,9 µl H₂O, 1,8 µl Forward primer, 1,8µl Reverse primer og 0,5 µl probe. Litt av hver bakterie koloni ble så tilført. Alle koloniene ble kjørt med en positiv-kontroll og en blankprøve. Temperaturprofilen var: 50° C, 2 min; 95 ° C, 10 min; etterfulgt av 60 sykluser, 95 ° C, 15 sek; og 60 °C, 1 minutt med fluorescens deteksjon etter hver syklus.

Plasmid fra kolonier som gav positivt qPCR-resultat ble så rensert (torsk A1 og A2 og svartkutling B1). For rensing av plasmid DNA ble QIAprep^R Spin Miniprep kit (50) (Cat. No 27104) med mikrosentrifugerør brukt. Først ble 2 ml av løsningen i falconrørene overført til eppendorfrør. Disse ble så sentrifugert ved 8000 rpm i 3 minutter. Supernatanten ble helt vekk. Pelletene, med bakterieceller, ble resuspendert i 250 µl P1-buffer. 250 µl P2-buffer ble så tilsatt og blandet forsiktig inn ved å snu rørene opp ned 4-6 ganger. Væsken blir da tykflytende og klar. 350 µl N3-buffer ble så tilført og blande inn ved å snu forsiktig på rørene 4-6 ganger. Rørene ble så sentrifugert i 10 minutter ved 13000 rpm. En hvit pellet ble da dannet i bunnen av hvert rør. Supernatanten i hvert rør ble så pipettert over til hver sin QIAprep spinnkolonne, som fulgte med i kittet. Disse ble sentrifugert i 30-60 sekunder, og bunnfallet ble kastet. For å vaske spinnkolonnene ble det tilført 500 µl PB-buffer, og kolonnene ble sentrifugert i 30-60 sekunder. Bunnfallet ble kastet. For å vaske igjen ble det samme prosedyren gjentatt med 750 µl PE-buffer. Bunnfallet ble igjen kastet og, for å være sikkert på at all vaskebuffer var vekk, ble rørene sentrifugert en gang til i ett minutt. QIAprep kolonnene ble plassert i rene 1,5 ml mikrosentrifugerør. For å eluere DNAet ble det tilført 50 µl EB-buffer (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) til midten av hver QIAprep spinnkolonne. Disse ble stående i ett minutt på benken og så sentrifugert i ett minutt. DNA-konsentrasjonen til hvert

rør ble så målt ved hjelp av et spektrofotometer. Rørene ble så langt i fryseren (-20°C) inntil videre arbeid.

3.6.3 Forbehandling av PCR-produkt for sangersekvensering:

BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit ble brukt for å klargjøre prøvene til fluorescensbasert syklussekvensering. Torsk A2 hadde ca. dobbelt høy DNA-konsentrasjon som A1 og B1 og ble derfor fortynnet. Dette ble gjort ved å blande 5 µl av blandingen med 5 µl H₂O. Oppskriften som videre ble fulgt var: 4 µl Ready Reaction Premix (konsentrasjon 2,5X), 2 µl BigDye Sequencing Buffer (5X), 3,2 µl primer (-21 M13 primer), 8,8 µl H₂O og 2 µl templat. Det ble også tillaget en brønn med 1 µl kontroll-plasmid. Det ble kjørt en blankprøve og positiv-kontroll med alle prøvene. Temperaturprofilen som ble brukt var: 96°C i 1 minutt, for aktivering av polymerasen og denaturering av DNA, 25 sykluser med 96 °C i 10 sekunder, 50 °C i 5 sekunder og 60 °C i 4 minutter, etterfulgt av 4 °C inntil prøvene ble hentet og lagt i fryseren frem til rensing av produktet.

For å fjerne uinkorporert terminatorfarge, som kan forstyrre under selve sekvenseringen, måtte produktet renses. For å gjøre dette ble ethanol/EDTA precipitation metoden brukt. Prøvene ble først overført til en 96-brønns reaksjons plate og sentrifugert. 5 µl av 123 mM EDTA ble tilført til bunnen av hvert rør, så ble det tilført 60 µl av 100% etanol og platen ble dekket med plastfolie. Dette ble forsiktig blandet ved å snu opp ned på platen 4 ganger. Platen ble inkubert i 15 minutter i romtemperatur før den ble sentrifugert i 30 minutter ved 3000 x g. Platen ble så vendt opp ned og sentrifugert igjen ved 185 x g i et par sekunder. 60 µl av 70 % etanol ble tilført, og platen ble sentrifugert i 4 °C, ved 1650 x g, i 15 minutter. Platen ble igjen vendt opp ned og sentrifugert i ett minutt ved 185 x g. Prøvene ble til slutt resuspendert i 20 µl injeksjons buffer (formamid), og satt i en varmeblokk i 5 minutter ved 95°C.

3.6.4 Sanger sekvensering

Platen med prøvene, torsk A1, torsk A2, svartkutling B1, blankprøve og kontroll-plasmid, ble plassert i sekvenseringsmaskinen (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, HITACHI) og prosedyre for elektroforese av produktene ble fulgt.

Etter sekvensering, for kontrollere at det var riktige sekvenser som ble sekvensert, ble det kjørt en alignmet i NCBI med sekvenseringsresultatet og COI-sekvensen til artene.

3.7 Multi-art deteksjon

3.7.1 Utprøving av universalprimere

Det ble laget en stocksolution på 100 μM ved å blande med oppgitt mengde AE-buffer (vedlegg V). For å lage en workingsolution, på 10 μM , ble 10 μl av stockløsning blandet med 90 μl AE-buffer i nye eppendorfrør. Rørene ble så sentrifugert i 1 min ved 8000 rmp.

Alle universalprimerne ble testet mot genomisk fiske-DNA (positiv kontroll), en utvalgt miljø-DNA-prøve og en blankprøve. Hvert primer par ble testet flere ganger.

For videre analyse ble universalprimerparet Ac12s testet mot torske-DNA (positiv kontroll), 7 miljø-DNA-prøver og blankprøve. Stasjon 5 ble ikke testet, da det var lite miljø-DNA igjen fra denne stasjonen. Dette ble gjentatt tre ganger.

For å lage en mastermix ble følgende oppskrift brukt: 10 μl TaqMan Environmental Master Mix, 3 μl H₂O, 1 μl Reverse primer og 1 μl Forward primer. 15 μl av mastermixen ble tilført hver brønn. Det ble brukt 5 μl templat for analyse av miljø-DNA-prøvene og 1 μl templat + 4 μl H₂O for analyse av genomisk fiske-DNA. I blankprøven ble det tilført 5 μl H₂O (20 μl i hver brønn). Stripsene ble så spunnet i GalaxyMini (VWR) i 1 minutt før de ble satt i PCR-maskinen.

Temperaturprofil for alle primere var: 95°C 10 min; etterfulgt av 50 sykluser med 95°C i 30 sek; 50°C 30 i sek; 72°C i 30 sek; så en inkubering på 72°C i 5 minutter og 4°C frem til henting. Ca. 2,5 timer.

PCR-produktet ble så kjørt i en 1,5 % agarose gel. For å lage gelen ble 1,5 gram agarose gel pulver blandet med 100 ml 1x TAE (vedlegg VI). Dette ble smeltet i en mikrobølgeovn, og 7 μl GelRed Nucleic acid, eller 5 μl etumbromid, ble tilført. Den flytende gelen ble helt over i et støype brett, med en kam til å lage 20 brønner, hvor det lå i ca. 45 minutter til gelen var stivnet.

2 μl av 1 kb pluss DNA-ladder (Invitrogen) ble blandet med 18 μl H₂O, for å lage en størrelse standard. 5 μl Loading dye (50% glyserol, bromphenol blått) (vedlegg VII) ble pipettert til alle prøvene, og størrelsesstandard. 10 μl av hver prøve ble så overført til hver sin brønn, med størrelsesstandard i første og siste. Gelen ble kjørt på 100V i 45 minutter. Etter kjøringen ble gelen overført til et UV-skap, og det ble tatt et bilde.

Før- og etter- PCR-produkt ble behandlet i ulike rom for å hindre kontaminering.

3.7.2 Utprøving av universalprimere med adaptere og indekser for Illumina-sekvensering

Nye Ac12s-F og R primere, som var rensset og klargjort for Illumina sekvensering, ble bestilt fra Eurofins Genetics (Tyskland). Primerne hadde fått på adaptere med komplementær sekvens til sekvenseringsprimerne, samt indeksekvens på reverse-primerne for å kunne skille mellom 4 ulike miljø-DNA-prøver. Det ble laget stocksolution på 100 μ M, og workingsolution på 10 μ M, ved å blande med AE-buffer.

For å sjekke at behandlet universalprimere fungerte som forventet ble de først testet på fiske-DNA, så på miljø-DNA. Samme oppskrift på master mix og temperaturprofil, som på universalprimere uten adaptere og indekser, ble brukt.

De ble så testet med en annen temperaturprofil. Temperaturprofil var hentet fra Evans et al., (2015), hvor universalprimerne var hentet fra, men med noen få endringer for å tilpasse PCR maskinen: (1) 95°C i 2 min; (2) 95°C i 10 s; (3) 63°C i 20 s; (4) 72°C i 30 s; (5) trinn 2-4 repeteres ytterligere 9 ganger; (6) 98°C i 10 s; (7) 60 °C i 20 s; (8) 72°C i 30 s; (9) trinn 6-8 repeteres ytterligere 9 ganger; (10) 98°C i 10 s; (11) 58 °C i 20 s; (12) 72°C i 30 s; (13) trinn 10-12 repeteres ytterligere 29 ganger; (14) 72°C i 10 min; (15) hold på 4°C til prøvene hentes.

4 Resultater

4.1 Strandnottrekk

Tabell 1 viser antall individer funnet av hver art ved de ulike stasjonene med strandnottrekk. De fleste fiske var yngel.

Tabell 1 Antall individer av hver art ved de ulike stasjonene fanget i strandnot-trekket

Stasjon →	3 Rauskjær	5 Risøy	36 Lusekilen indre	41 Fjeldalsøya ytre	57 Bufjorden Indre	60 Hesnessund	65 Lillehavn	66 Kumkragan
Fiskeart ▼								
Torsk (<i>Gadus morhua</i>)	0	7	2	30	2	4	5	1
Hvitling (<i>Merlangius merlangus</i>)	0	0	31	9	0	0	0	1
Lyr (<i>Pollachius pollachius</i>)	0	1	3	2	0	10	0	1
Sei (<i>Pollachius virens</i>)	0	0	0	0	0	1	0	0
Bergnebb (<i>Ctenolabrus rupestris</i>)	0	23	13	60	9	17	30	17
Berggylt (<i>Labrus bergylta</i>)	0	3	2	1	0	2	1	0
Grøngylt (<i>Symphodus melops</i>)	0	8	5	10	6	1	4	3
Svartkutling (<i>Gobius niger</i>)	4	16	181	113	1	2	0	8
Sandkutling (<i>Pomatoschistus minutus</i>)	14	0	3	0	3	1	0	20
Skrubbe (<i>Platichthys flesus</i>)	0	0	0	0	0	0	0	2
Ørret (<i>Salmo trutta</i>)	0	0	2	0	0	0	0	0

4.2 DNA-isolering

Mengden DNA (ng/ μ l) i miljø-DNA-prøvene, ble målt med et spektrofotometer (nanodtop T1000). 260/ 280 viser til renheten av prøvene (Tabell 2).

Tabell 2 DNA-konsentrasjon og renhet i miljø-DNA-prøver

Stasjonsnummer	Ng/ μ l	260/280
3	25,1	1,61
5	76,5	1,43
36	24,8	1,66
41	38,1	1,58
57	42,8	1,47
60	28,2	1,71
65	22,4	1,76
66	26,6	1,61

Mengden DNA i genomisk fiske-DNA-prøver ble målt med et spektrofotometer. 260/ 280 viser til renheten av prøvene (Tabell 3).

Tabell 3 DNA-konsentrasjon og renhet i genomisk fiske-DNA-prøver

Fiskeart	Ng/μl	260/280
Torsk	110,7	2,10
Sei	121,5	2,10
Svartkutling	203,5	2,03
Bergnebb	129,7	2,04
Grønngylt	251,0	2,04

4.3 Artsspesifikk deteksjon

Tabell 4 viser artsspesifikke primere og prober, designet for artsspesifikk deteksjon.

Tabell 4 Oversikt over alle artsspesifikke primere og prober. I parentes står antall nukleotider i sekvensen.

Art	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')	MGB Probe (5' → 3')
Torsk 1	TATTAATATGAAACCTC CGGCAATT (25)	AGACGGGAAGAGATAATA GTAGAAGCA (27)	AGTACCAAACACCC CTATT (19)
Torsk 2	CGTCTTAGCAGCTGGTA TCACAA (23)	TCCAGCAGGGTCAAAGAA AGAA (22)	TCTAACTGACCGTAA TC (17)
Sei	TTATTATCCCTTCCCGT CTTAGCA (24)	GCAGGATCAAAGAAGGAA GTATTAAGAT (28)	ATTACAATACTCCTA ACCGATC (22)
Svart- kutling	CCCCTCTCTTTGTTTGG GCT (20)	GCGGGGTCAAAGAAGGTA GT (20)	AATTACTATGCTTTT AACC (19)
Bergnebb	TCACAATATCAAACCCC TCTCTTTG (25)	GAAAGGAGTAGAAGGACG GCAGTA (24)	CTGGGCCGTTCTA (13)
Grønngylt	CCCGCCTTTAGCTGGGA AT (19)	TTAATTGCGCCAAGGATTG AG (21)	CGTCGACTTAACTAT C (16)

4.3.1 Utprøving av artsspesifikke primere og prober

Alle forsøkene var utført med blankprøve og, hvis ikke annet er bemerket, ble utslaget negativt.

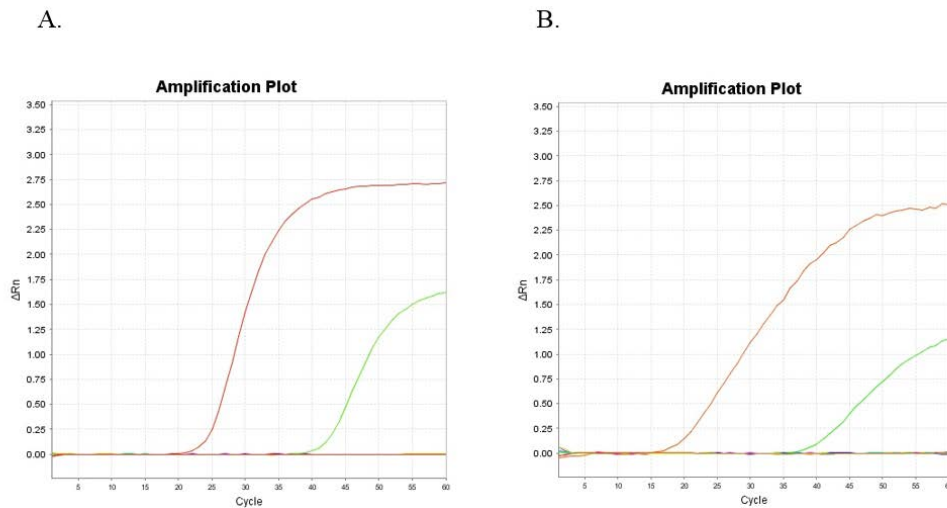
I alle utprøvingene av torsk-probe 1 ble det positivt utslag på torske-DNA (positiv kontroll) og miljø-DNA, som forventet, men også på sei-DNA. DNA fra de andre artene gav negativt utslag. Forsøket ble gjentatt flere ganger, med ulike temperaturprofiler, men med samme resultat.

Siden torsk-probe 1, med primere, ikke var spesifikk, ble det designet nye torsk-primere og torsk-probe (torsk-probe 2). Figur 15 viser et eksempel på en multiple sequence alignment i clustal Omega, EMBL-EBI, med torsk-probe 2 mot andre arter som var blitt registrert i strandnottrekket. Sekvensen som torsk-probe 2 hybridiserer til er markert med rødt.

```
A. CAATACTTCTAACTGACCGTAATCTTAATAC'  
CAATACTCCTAACCGATCGTAATCTTAATAC'  
***** ** * ** * ** * ** * ** * ** *  
B. CAATACTTCTAACTGACCGTAATCTTAATAC'  
CTATGCTTTTAAACCGACCGAAATCCTTAACAC'  
* ** * ** * ** * ** * ** * ** *  
C. CAATACTTCTAACTGACCGTAATCTTAATAC'  
CAATACTTTTAACTGATCGTAATCTTAATAC'  
***** ** * ** * ** * ** * ** * ** *  
D. CAATACTTCTAACTGACCGTAATCTTAATAC'  
CTATACTTCTAACCGATCGTAACCTTAATAC'  
* ** * ** * ** * ** * ** * ** *  
E. CAATACTTCTAACTGACCGTAATCTTAATAC'  
CAATGCTACTAACAGACCGCAACCTGAACAC'  
**** * ** * ** * ** * ** * ** *  
F. CAATACTTCTAACTGACCGTAATCTTAATAC'  
CAATACTCCTGACAGACCGAAATCCTTAACAC'  
***** ** * ** * ** * ** * ** * ** *  
G. CAATACTTCTAACTGACCGTAATCTTAATAC'  
CAATACTTCTCACAGATCGAAACCTCAATAC'  
***** ** * ** * ** * ** * ** * ** *  
H. CAATACTTCTAACTGACCGTAATCTTAATAC'  
CGATACTCCTCACCGACCGAAACCTTAACAC'  
* ** * ** * ** * ** * ** * ** *  
I. CAATACTTCTAACTGACCGTAATCTTAATAC'  
CAATGCTCCTCACAGATCGCAACCTTAACAC'  
**** * ** * ** * ** * ** * ** *  
J. CAATACTTCTAACTGACCGTAATCTTAATAC'  
CTATGCTACTCACAGACCGAAATCTTAATAC'  
* ** * ** * ** * ** * ** * ** *
```

Figur 15 Multiple sequence alignment i clustal Omega, EMBL-EBI, med torsk-probe 2 mot lyr (A), hvitting (B), sei (C), skrubbe (D), bergnebb (E), grønngylt (F), sandkutling (G), svartkutling (H), berggylt (I) og ørret (J). Nukleotider markert med rødt indikerer sekvensen torsk-probe 2 hybridiserer til. Stjerne indikerer lik nukleotide, og mellomrom indikerer forskjell

I alle utprøvingene av torske-probe 2 ble det positivt utslag på torske-DNA og miljø-DNA (fra stasjon 41), men ikke på DNA fra de andre fiskeartene. Svartkutling-proben gav positivt utslag på svartkutling-DNA og miljø-DNA (fra stasjon 36), men ikke på DNA fra de andre fiskeartene (Figur 16).



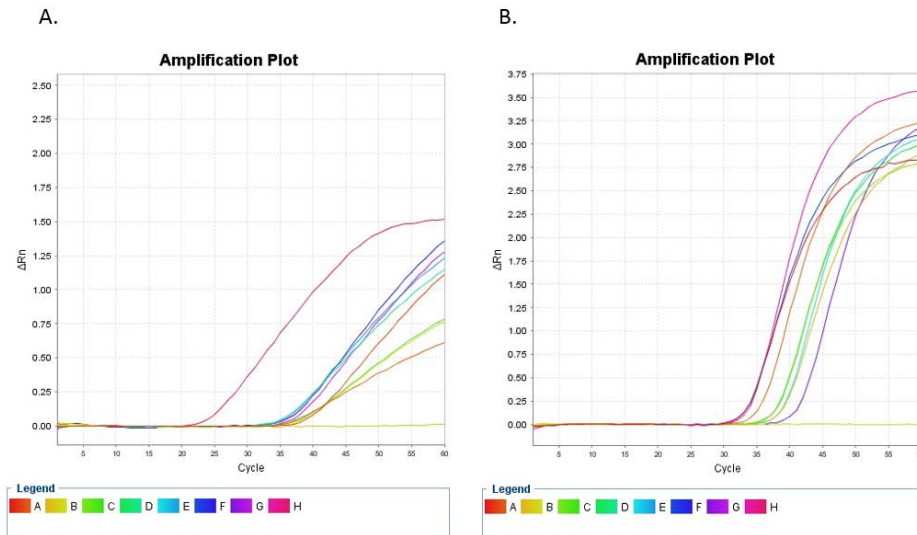
Figur 16 qPCR bilde av torske-probe 2 (A) og svartkutling-probe (B) mot fiske-DNA fra torsk, svartkutling, sei, bergnebb, grønngylt, miljø-DNA og blank. Rød kurve er positivt utslag på, torske-DNA (A) og svartkutling-DNA (B). Grønn kurve er positivt utslag på miljø-DNA. Rette kurver er negative utslag. X-aksen viser C_T -verdi

Alle utprøvingene av sei-proben ga positivt utslag på sei-DNA og miljø-DNA som ønsket, men også på torske-DNA. De andre artene gav negativt utslag. Forsøket ble gjentatt flere ganger, med ulike temperaturprofiler, men med samme resultat.

I første utprøving av bergnebb-proben ble det positivt utslag på bergnebb-DNA og miljø-DNA (stasjon 65) som ønsket, men også på grønngylt-DNA, svartkutling-DNA og blankprøven. Sei- og torske-DNA gav negativt utslag. Andre forsøk av bergnebb-proben gav positivt utslag på bergnebb-DNA, miljø-DNA (stasjon 65), og grønngylt-DNA. Torsk- og sei-DNA gav negativt utslag. Forsøket ble gjentatt flere ganger, med ulike temperaturprofiler, men med samme resultat.

I alle utprøvinger av grønngylt-proben ble det positivt utslag på grønngylt-DNA, miljø-DNA (stasjon 65), og bergnebb-DNA. Svartkutling-, torsk- og sei-DNA gav negative resultater. Forsøket ble gjentatt flere ganger, med ulike temperaturprofiler, men med samme resultat.

I utprøvingen av svartkutling-probe og torske-probe 2 mot alle miljø-DNA-prøver gav svartkutling-probe positivt resultat på alle miljø-DNA-prøvene (Figur 17 A), det samme gjorde torske-probe 2 (Figur 17 B).



Figur 17 qPCR bilde av svartkutling-probe (A) og torske-probe 2 (B) mot alle miljø-DNA-prøver (A=miljø-DNA fra stasjon 3, B= miljø-DNA fra stasjon 5, C= miljø-DNA fra stasjon 36, D= miljø-DNA fra stasjon 41, E= miljø-DNA fra stasjon 57, F= miljø-DNA fra stasjon 60, G= miljø-DNA fra stasjon 65, H= miljø-DNA fra stasjon 66. Gul linje uten utslag= blankprøve, røde linjen med lavest C_T = kontroll DNA). X-aksen viser C_T -verdi

Sensitivitet til primere og probe for torsk og svartkutling:

Tabell 5 viser sensitiviteten til torske-probe 2 og svartkutling-probe mot fortynnet fiske-DNA. Torske-proben mot fortynnet torsk-DNA gav positivt utslag ned til en DNA-konsentrasjon på 0,0016605 ng/μl i PCR-reaksjon, mens svartkutling-proben gav positivt utslag ned til en DNA-konsentrasjon på 0,000030525 ng/μl i PCR-reaksjonen.

Tabell 5 DNA-konsentrasjon (ng/μl) i PCR-reaksjon av fortynnet torsk- og svartkutling-DNA

Fortynning	Konsentrasjon av torsk-DNA (ng/μl)	Konsentrasjon av svartkutling-DNA (ng/μl)
Ufortynnet	16,605	30,525
10 ¹	1,6605	3,0525
10 ²	0,16605	0,30525
10 ³	0,016605	0,030525
10 ⁴	0,0016605	0,0030525
10 ⁵	0,00016605	0,00030525
10 ⁶	0,000016605	0,000030525
10 ⁷	0,0000016605	0,0000030525
10	0,00000016605	0,00000030525
10 ⁹	0,000000016605	0,000000030525
10 ¹⁰	0,0000000016605	0,0000000030525

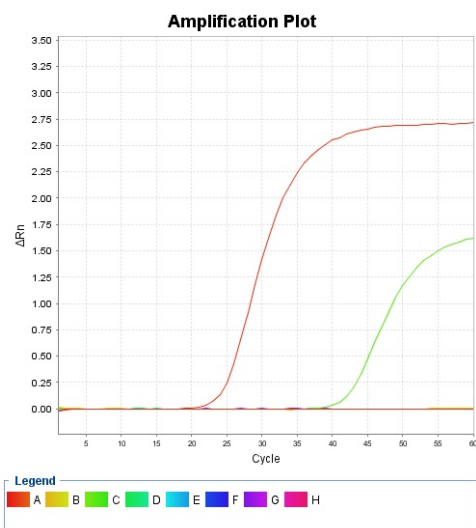
Tabell 6 viser sensitiviteten til torske-probe 2 mot fortynnet miljø-DNA fra stasjon 36 og svartkutling-probe mot fortynnet miljø-DNA fra stasjon 5.

Tabell 6 DNA konsentrasjon (ng/μl) i PCR-reaksjonen med fortynnet miljø-DNA

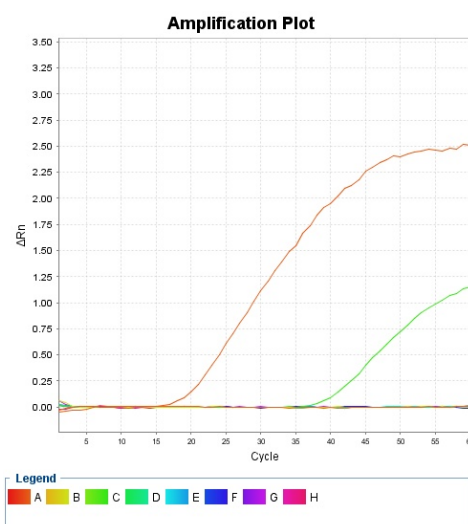
Fortynning	Konsentrasjon vannprøve DNA (ng/μl) (Torske-probe, stasjon 36)	Konsentrasjon vannprøve DNA (ng/μl) (Svartkutling-probe, stasjon 5)
Ufortynnet	2,48	7,65
10 ¹	0,248	0,765
10 ²	0,0248	0,0765
10 ³	0,00248	0,00765
10 ⁴	0,000248	0,000765

I qPCR gav torske-probe 2 positivt utslag på torske-DNA og ufortynnet miljø-DNA fra stasjon 36, 2.48 ng/μl (Figur 18 A). Svartkutling-proben gav positivt utslag på svartkutling-DNA og ufortynnet miljø-DNA fra stasjon 5, 7.65 ng/μl (Figur 18 B).

A.



B.



Figur 18 qPCR bilde av torske-probe 2 (A) og svartkutling-probe (B) mot positiv kontroll (rød kurve), ufortynnet miljø-DNA (grønn kurve), fortynnet miljø-DNA og blank (de andre kurvene)

4.3.2 Kloning

Tabell 7 viser antall blå og hvite kolonier funnet på LB-agar platene med klonet PCR-produkt fra torske-probe 2 og svartkutling-probe mot miljø-DNA.

Tabell 7 Antall blå og hvite bakterie kolonier på LB-agar plater

Prøve	Blå kolonier	Hvite kolonier
Kontroll	56	0
Torsk A1	60	24
Torsk A2	80	12
Svartkutling B1	110	16
Svartkutling B	116	16
Fortynnet Torsk A3	24	4
Fortynnet Torsk B3	45	3

Koloni-PCR på bakteriekoloni fra torsk A1, torsk A2 og svartkutling B1 gav positivt resultat på positiv kontroll, bakterieprøve, og negativt utslag på blank. Tilsvarende koloni-PCR på svartkutling B2 og fortynnet torsk A3 og B3 gav positivt resultat på positiv kontroll, men negativt resultat på bakterieprøve.

4.3.3 Sanger sekvensering

Sekvensering av torsk A2, svartkutling B1 og kontroll-DNA gav lesbare sekvenser, mens torsk A1 ikke gav lesbar sekvens. Alignment i NCBI med sekvenseringsresultatet fra torsk A2 og COI genet til torsk stemte 100% overens (Figur 19). Alignment av svartkutling B1 og COI genet viste betydelige ulikheter.

```
CGTCTTAGCAGCTGGTATCACAA TACTTCTAACTGACCGTAATCTTAATACTTCTTTCTTTGACCCTGCTGGA  
CGTCTTAGCAGCTGGTATCACAA TACTTCTAACTGACCGTAATCTTAATACTTCTTTCTTTGACCCTGCTGGA  
*****
```

Figur 19 Viser resultatet av alignment med sekvenseringsresultatet av torsk A2 og COI genet. Stjerne indikerer lik base. Nukleotider markert med blå viser Reverse og Forward primer. Røde nukleotider viser proben.

4.4 Multi-art deteksjon

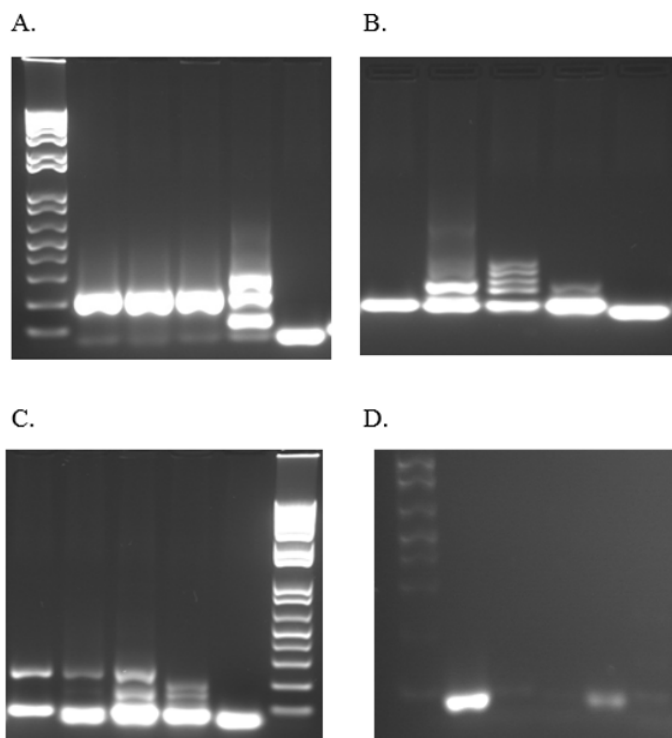
Tabell 8 viser universalprimerene hentet fra Miya et al. (2015), P.F. Thomsen et al. (2012a) og Evans et al. (2015), med deres navn, sekvens og mål-gen.

Tabell 8 Universalprimer med deres navn, sekvens, mål gen og referanse.

Primer navn	Sekvens (5'→3')	Mål-gen	Referanse
MiFish-U-F (Forward)	GTCGGTAAACTCGTGCCAGC	12S	(Miya et al., 2015),
MiFish-U-R (reverse)	CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTG		
Fish2bCBR (Forward)	GATGGCGTAGGCAAACAAGA	Cyt B	(Thomsen et al., 2012a)
Fish2CBL (reverse)	ACAACTTCACCCCTGCAAAC		
Fish2degCBL (Forward)	ACAACTTCACCCCTGCRAAY		
Fish2CBR (reverse)	GATGGCGTAGGCAAATAGGA	Cyt B	
L2513 F (Forward)	GCCTGTTACCAAAAACATCAC	12S	(Evans et al., 2015),
H2714 R (reverse)	CTCCATAGGGTCTTCTCGTCTT		
Ac12s-F (Forward)	ACTGGGATTAGATACCCCACTATG		
Ac12S-R (reverse)	GAGAGTGACGGGCGGTGT	16S	

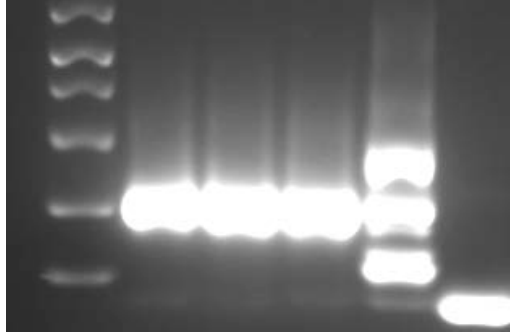
4.4.1 Utprøving av universalprimere

I de første forsøkene med universalprimerene MiFish-U-F/MiFish-U-R (Figur 20 A), Fish2bCBR/Fish2CBL (B) og Fish2degCBL/ Fish2CBR (C) kom det utslag på torske-, sei-, svartkutling- og miljø-DNA. I de andre forsøkene fikk jeg fortsatt positivt utslag på fiske-DNA, men ikke på miljø-DNA. Miljø-DNA fra ulike stasjoner ble brukt ved ulike forsøk. I det første forsøket med L2513-F/H2714-R (D), kom det kun utslag på torske-DNA og et svakt utslag på miljø-DNA. I andre forsøk kom det kun utslag på torske-DNA. Ved gjentatte forsøk ble resultatene det samme.



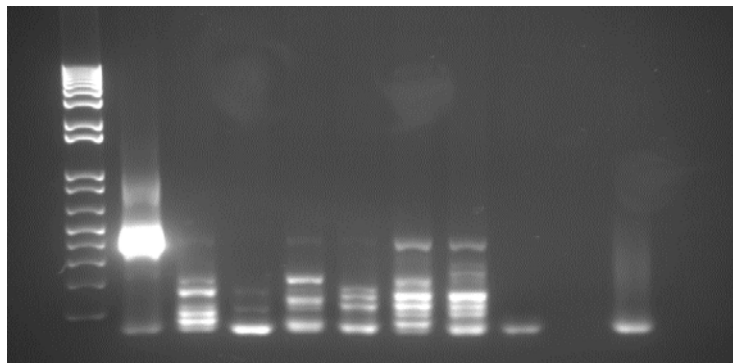
Figur 20 Gelbilde av universalprimere MiFish-U-F/MiFish-U-R (A), Fish2bCBR/Fish2CBL (B), Fish2degCBL/ Fish2CBR (C) og L2513-F/H2714-R (D) testet på, fra venstre mot høyre, torske-DNA, sei-DNA, svartkutling-DNA, miljø-DNA og blank. Første spor i A og D, og siste spor i C er størrelsesstandard

Med universalprimerparet Ac12s-F og Ac12S-R fikk jeg utslag på torske-DNA, sei-DNA, svartkutling-DNA og miljø-DNA fra stasjon 5. Blank gav negativt utslag (er primerdimerer neders i blank) (Figur 21). Forsøket ble gjentatt to ganger til med samme resultat.



Figur 21 Gelbilde av universalprimere Ac12s testet på, fra venstre mot høyre, torske-DNA, sei-DNA, svartkutling-DNA, miljø-DNA (stasjon 41) og blank (første spor er størrelsesstandard)

Videre testing av universalprimere Ac12s slo ut på torske-DNA og alle miljø-DNA-prøvene, bortsett fra den siste, stasjon 66. De slo heller ikke ut på blankprøven. De nederste båndene er primerdimerer (Figur 22). Det samme resultatet kom i alle forsøkene.



Figur 22 Gelbilde av universalprimere Ac12 testet på, fra venstre mot høyre, torske-DNA, miljø-DNA fra stasjon 3, 36, 41, 57, 60, 65, 66, mellomrom og blank. (første spor er størrelsesstandard)

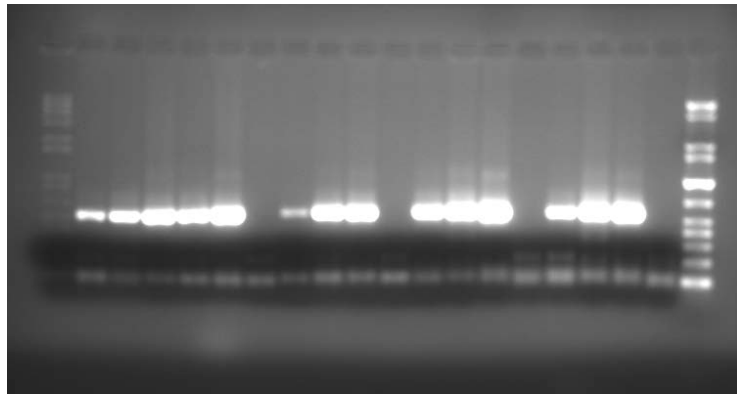
4.4.2 Utprøving av universalprimere med adaptore og indekser for Illumina-sekvensering

Tabell 9 viser universalprimere klargjort for Illumina-sekvensering. De har blitt forlenget med nødvendige adaptore og indekser i endene.

Tabell 9 Oversikt over universalprimere, med indekser og adaptore, for Illumina sekvensering

Oligo-navn	Sekvens (5' → 3')
Ac12sFb (Forward)	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTA CTGGGATTAGATACCCCCTATG (82)
Ac12sR01b (Reverse)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACAGT GGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCC GATCTGAGAGTGACGGGCGGTGT (82)
Ac12R02b (Reverse)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCCAAT GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGA TCTGAGAGTGACGGGCGGTGT (82)
Ac12R03b (Reverse)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTTGTAG TGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC TGAGAGTGACGGGCGGTGT (82)
Ac12R04b (Reverse)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTGAAAG TGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC TGAGAGTGACGGGCGGTGT (82)

Universalprimere Ac12s, med adaptore og indekser, gav positivt resultat mot fiske-DNA. Det første primerparet med forward primer og reverse primer 01, slo ut mot torsk-, sei-, svartkutling-, bergnebb- og grønngylt-DNA, de resterende primerparene ble kun utprøvd på torsk-, sei- og svartkutling-DNA, og gav positivt resultat på alle. Blankprøvene gav negativt utslag (Figur 23).



Figur 23 Gelbilde av universalprimere Ac12s, med adaptore og indekser, mot fiske-DNA. Fra venstre til høyre: Størrelsesstandard. Forward primer med reversprimer 01 mot torsk-, sei-, svartkutling-, bergnebb- og grønngylt-DNA og blankprøve. Forward primer med reversprimer 02 mot torsk-, sei- og svartkutling-DNA og blank. Forward primer med reversprimer 03 mot torsk-, sei- og svartkutling-DNA og blank. Forward primer med reversprimer 04 mot torsk-, sei- og svartkutling-DNA og blank. Størrelsesstandard

Ac12s, med adaptore og indekser, ble videre testet mot alle miljø-DNA-prøvene. Her slo de ut på positiv kontroll (fiske-DNA), men ikke på noen av miljø-DNA-prøvene, verken med ny eller gammel temperaturprofil. I alle forsøkene kom det tykke bånd med primerdimerer nederst på gelen.

Det ble til slutt gjentatt utprøvinger med universalprimerne Ac12s uten adaptore og indekser. Her kom det positivt utslag på fiske-DNA, men negativt utslag på alle miljø-DNA-prøvene. På dette tidspunktet var det ikke nok tid til å bestille nye universalprimere for å begynne på nytt, så Illumina sekvensering ble ikke utført.

5 Diskusjon

Målet med denne oppgaven var å se om analyser av miljø-DNA kan benyttes til påvisning av marine fiskearter, og hvordan resultatene samsvarer med strandnot-metoden. Jeg har vist at dette er mulig da jeg kunne påvise både torsk og svartkutling med denne metoden. Med miljø-DNA fant jeg at torsk og svartkutling var til stedet i alle åtte lokaliteter, mens strandnot-metoden observerte disse artene i syv av åtte. Probene fra torsk 1, sei, bergnebb og grønngylt var ikke spesifikke nok og gav positivt utslag på DNA fra andre fiskearter enn mål-arten. Med multi-art deteksjon fikk jeg ikke generert en liste med arter, da universalprimerne ikke fungerte som forventet, noe strandnot-metoden kunne. På grunn av indikasjoner om lavere sensitivitet med strandnot-metoden er det likevel ikke sikkert at denne listen er komplett.

5.1 Artsspesifikk deteksjon

Renheten til isolert fiske-DNA og miljø-DNA ble målt for å se at den var akseptabel for PCR-analyser. Renheten til miljø-DNAet lå mellom 1,43 og 1,76 (260/280), som indikerer at det er noe proteiner eller andre kontamineringer i prøven (Tabell 2). Renheten til fiske-DNAet lå mellom 2,03 og 2,10 (260/280), som indikerer at det er noe RNA i prøvene (Tabell 3). Denne renheten var akseptabel for PCR-analyser.

5.1.1 Artsidentifisering

For å være sikker på at det var torsk- og svartkutling-DNA som ble amplifisert i qPCR ble PCR-produktet klonet og sekvensert. Sekvenseringsproduktet til torsk korresponderte 100% med COI-sekvensen hentet fra NCBI, som bekrefter at qPCR produktet kom fra mål-arten (Figur 19). Sekvenseringsproduktet til svartkutling var svært forskjellig fra COI-sekvensen til arten, og jeg kan derfor ikke konkludere med at det var svartkutling. qPCR resultatene i alle andre utprøvinger viser likevel at proben var veldig spesifikk. For å kunne bekrefte at det var svartkutling-DNA burde jeg isolert mer enn to bakteriekolonier og sekvensert mer enn en. Det ble telt 16 hvite kolonier på hver av agar-platene til svartkutling. Det var likevel noe vanskelig å skille mellom de blå og hvite koloniene, og det var kun 2 hvite kolonier som lå helt isolert fra de blå. Det samme gjaldt for agar-platene til torsk, og derfor isolerte jeg kun disse (Tabell 7). Med strandnot-metoden er artsidentifisering avhengig av taksonomisk ekspertise, som ofte mangles eller er i rask nedgang (Willerslev & Thomsen, 2015). Identifisering basert på morfologiske karakterer kan også være krevende, spesielt for juvenile som det hovedsakelig

var her, da de fleste identifikasjonsnøkler fokuserer på voksne individer (Herder et al., 2014). Dette ble også vist da DNA-analyser måtte bli brukt for å identifiser den invasive arten Japansk Østers-boresnegl, når visuell identifikasjon ikke var tilstrekkelig (Darling & Mahon, 2011).

5.1.2 Metodens sensitivitet

Med artsspesifikk deteksjon kunne jeg påvise torsk- og svartkutling-DNA i alle miljø-DNA-prøvene. Det vil si at disse fiskeartene var til stedet i alle 8 lokaliteter (Figur 17). Med strandnot-metoden ble det ikke observert torsk i stasjon 3 (Rauskjær), og svartkutling ble ikke observert i stasjon 65 (Lillehavn). I de andre stasjonene ble begge arter observert (Tabell 1). Det at artsspesifikke-primere registrere torsk og svartkutling i stasjoner hvor strandnot-metoden ikke gjorde, indikerer at miljø-DNA-metoden har en høyere deteksjonsmulighet enn en tradisjonell metode, som strandnottrekk.

Hvis en metode unngår å registrere arter som er naturlig tilstede i et miljø, slik som analysen indikerer at strandnot-metoden gjør, kan dette føre til en underestimering av artene, som igjen kan påvirke konserveringsinnsatsen. Det er derfor viktig med en sensitiv metode, med høy deteksjonsmulighet. Sensitiviteten til torske-probe 2 og svartkutling-probe ble først testet ved å kjøre en qPCR på fortynnet torske-DNA og svartkutling-DNA. Torske-proben mot fortynnet torske-DNA gav positivt utslag ned til en DNA-konsentrasjon på 0,0016605 ng/μl i PCR-reaksjonen, mens svartkutling-proben gav positivt utslag ned til en DNA-konsentrasjon på 0,000030525 ng/μl i PCR reaksjonen (Tabell 5). Dette indikerer at svartkutling-proben var mer sensitiv enn torske-proben. Mot miljø-DNA gav torske-proben kun positivt utslag på ufortynnet miljø-DNA (2,48 ng/μl i PCR reaksjonen) (stasjon 36), det samme gjorde svartkutling-proben (7,65 ng/μl i PCR reaksjonen) (stasjon 5) (Tabell 6). Dette indikerer at ca. 0,0016605 ng/μl av miljø-DNAet fra stasjon 36 stammer fra torsk, og ca. 0,000030525 ng/μl av miljø-DNAet fra stasjon 5 stammer fra svartkutling. Det vil si at det er mye annet DNA i disse prøvene som stammer fra andre kilder enn disse artene. For å kunne gi bedre estimater av dette kunne jeg finfortynnet fiske-DNAet og miljø-DNAet. Dette ble ikke gjort på grunn av for lite tid. Med slike estimert kunne jeg også ha beregnet PCR-effektiviteten på miljø-DNA. Likevel viser deteksjonen av så små DNA-konsentrasjoner, hvor sensitiv denne metoden er. Figur 3 viser fordelene med denne høye sensitiviteten til miljø-DNA-metoden, sammenlignet med tradisjonelle metoder. Ut fra den kan man se at høyere sensitivitet med miljø-DNA-metoden gir høyere deteksjonsmulighet ved lav tetthet, enn tradisjonelle metoder. Dejean et

al. (2012) bekrefter dette da de undersøkte metoden for deteksjon av amerikansk oksefrosk, som er en invasiv art i Sør-Vest Frankrike. Arten var tilstedte i lave konsentrasjoner, og ble kun detektert i 7 av 49 lokaliteter med en tradisjonell metode (visuelle observasjoner på dagtid og nattetid). Miljø-DNA-metoden detekterte oksefrosken i 38 av 49, inkludert de syv lokalitetene hvor arten ble observert med visuell overvåkning. Denne høye deteksjonsmuligheten for amerikansk oksefrosk viste også Ficetola et al. (2008) da de detekterte den i alle lokaliteter hvor arten var til stedet. I tillegg viste de at miljø-DNA-metoden ikke påviste DNA fra arten der det var kjent at den ikke var tilstede (ikke falske positive resultater).

Høy deteksjonssannsynlighet av arter er blitt påvist i av Thomsen et al. (2012b). De viste blant annet at miljø-DNA-metoden kunne påvise alle fiskearter tilstede i kontrollerte omgivelser med kjent fiskebestand. Likevel er de fleste publikasjoner, som viser denne høye deteksjonsmuligheten for miljø-DNA, hovedsakelig undersøkelser av sjeldne og unnvikende arter, som forekommer i lav tetthet. Torsk og svartkutling er verken sjeldne eller unnvikende, men i stasjonene hvor strandnot-metoden ikke klarte å registrere disse artene, vil jeg anta at tettheten var lav. Utfra tabell 1, som viser antall individer funnet av hver art ved de ulike stasjonene, kan man også se det er få individer registrert av svartkutling og torsk ved de fleste stasjonene. Kun stasjon 41 (Fjelldalsøya ytre) og 36 (Lusekilen indre) skiller seg ut, med 113 svartkutlinger og 30 torsk i stasjon 41, og 118 svartkutlinger i stasjon 36. I de resterende stasjonene ble det i gjennomsnitt registrert 5,1 svartkutlinger og 3 torsk.

I tillegg til at lave DNA-konsentrasjoner er nødvendig for deteksjon, kan den høye deteksjonsmuligheten for miljø-DNA komme av DNAets mulighet til å spre seg over et større område i vann (Rees et al., 2014). På den måten kan miljø-DNAet fra torsk og svartkutling bli detektert i en større omkrets enn direkte ved DNAets opphav. Med strandnot-metoden ble kun arter innenfor notas rekkevidde registrert (700 m²). Når nota ble trukket førte dette også til bevegelse i vannet, som kan ha skremt fiskene vekk, utenfor notas deteksjonsområde. På den måten kan strandnot-metoden ha unngått å detektere torsk i stasjon 3 og svartkutling i stasjon 65, til tross for at artene er naturlig tilstede. Miljø-DNA metoden vil ikke ha blitt påvirket av dette, da DNAet fortsatt vil ligge igjen.

5.1.3 Biomasseestimater

Biomasseestimater spiller en viktig rolle i overvåkning av arter, men for akvatisk arter kan dette ofte være vanskelig med tradisjonelle metoder. Med miljø-DNA-metoden er det vist at dette kan bli gjort ved å se på sammenhengen mellom tettheten av arter og mengde miljø-DNA frigjort til omgivelsene. Kelly et al. (2014) viste blant annet i saltvanns mesokosmer at det var en korrelasjon mellom mengden miljø-DNA de fant og artenes biomasse. Den korrelasjonen er likevel ikke like enkel å finne i naturlige marine systemer, da det er flere faktorer å ta hensyn til. I åpne marine systemer vil det blant annet være større spredning og fortykning av DNA.

Med bruk av Miljø-DNA kan det likevel være mulig å detektere relativ forskjeller i forholdet mellom arter. Ved å studere C_T -verdiene fra analysen med artsspesifikke prober (torsk 2 og svartkutling) på miljø-DNA (Figur 18), kan jeg si noen om forholdet mellom miljø-DNA fra disse artene og hvordan det varierer mellom stasjonene. F.eks. kan jeg se at det var funnet mer svartkutling-DNA enn torske-DNA på lokalitet 65, men enda mer svartkutling-DNA enn torske-DNA i stasjon 66, som indikerer at det er større forskjeller mellom svartkutling og torsk i stasjon 66 enn stasjon 65.

Jeg kan også se at forholdet mellom miljø-DNA fra svartkutling og torsk i stasjon 57 og 66 (med flere svartkutlinger) er større enn forholdet mellom disse artene i stasjon 65 og 41. I strandnottrekket ble det funnet 8 ganger mer svartkutling enn torsk i stasjon 66 og 3,7 ganger mer svartkutling enn torsk i stasjon 41 (Tabell 1), som stemmer med mine resultater. Det samme forholdet kan ikke bli sett med strandnot-metoden i de andre stasjonene, da de fant at det var mer torsk enn svartkutling i stasjon 65 og 57. Her er det likevel snakk om lave antall, med to torsk i forhold til en svartkutling i stasjon 57. I stasjon 65 fant de 5 torsk og ingen svartkutling, men da mine resultater indikerer at det var svartkutling tilstede, er det mulig at dette forholdet fra strandnot-metoden ikke er korrekt.

I analysene av miljø-DNA var det kun to stasjoner som viste et forhold med mer torsk enn svartkutling, stasjon 3 og 60, med indikasjoner om større forskjeller i stasjon 60. I strandnottrekket fant de at det var dobbelt så mye torsk enn svartkutling i stasjon 60, mens i stasjon 3 fant de at det var 4 ganger mer svartkutling enn torsk, med 4 svartkutlinger og ingen torsk. Dette er igjen, som med stasjonen 66, at mine resultater indikerer at det var torsk tilstede, og det er mulig at dette forholdet fra strandnot-metoden ikke er korrekt.

I stasjon 5 og 36 var C_T verdiene like for begge arter, som indikerer at forholdet mellom torsk og svartkutling i disse stasjonene er tilnærmet likt. Dette ligner ikke på resultatene de fant med strandnottrekket, da det var funnet 2,2 ganger flere svartkutlinger enn torsk i stasjon 5 og hele 90,5 ganger flere svartkutlinger enn torsk i stasjon 36. Det er likevel viktig å huske, i slike sammenligninger av forhold mellom arter, at miljø-DNA ikke er sammenhengende distribuert i et marint system. Innsamlingsmetoden kan påvirke mengde miljø-DNA funnet i en prøve. For eksempel hvis prøver er samlet inn i nærheten av et individ (eller mange individer) vil mer DNA kunne bli tatt opp, enn hvis prøven er tatt lengre vekk. I denne oppgaven ville det derfor vært bedre hvis flere prøver ble tatt over et tidsrom, og gjennomsnittet ble regnet ut. Det kan også være forskjeller i mengde DNA i prøvene på grunn av ulik isoleringseffektivitet, eller det kan være ulik PCR-effektivitet på grunn av mer PCR-hemmere i noen prøver enn andre. I undersøkelsen av sensitiviteten til torsk- og svartkutling-probe ble det også vist at svartkutling-proben var mer sensitiv (Tabell 5), som kan bety at en lavere C_T ikke nødvendigvis indikerer mer svartkutling-DNA i prøven. Det er også usikkerheter knyttet til mengde DNA en art frigjør. Torsk er en større fisk enn svartkutling (som voksne), og vil trolig avgi mer DNA til omgivelsene. De fleste fisk i strandnottrekket var likevel yngel (dvs. at de er mer like i størrelse), men jeg har ikke informasjon om dette gjaldt alle fisk, i alle stasjoner. Jeg vil også anta at aktivitetsnivået til fisken vil påvirke DNA-mengden, hvor aktive fisk frigir mer DNA enn rolige fisk, men heller ikke dette har jeg nok informasjon til å uttale meg om. Hvor fiskene befinner seg i vannmassene også vil påvirke mengde miljø-DNA i prøvene. Miljø-DNAet ble samlet inn i det øverste laget av vannmassene, som kan ha gjort at DNA fra fisker som oppholdt seg nær bunnen ikke ble opptatt i samme mengde som DNA fra fisker i de øvre vannmassene. For å få sikrere tall fra strandnot-metoden burde jeg også brukt informasjon om antall arter, i disse stasjonene, fra flere år.

5.1.4 Tid- og kostnadseffektivitet

I denne oppgaven er det vanskelig å si noen om tid- og kostnadseffektiviteten til metodene. Jeg har ingen informasjon om kostnadene knyttet til strandnottrekket eller analysene av miljø-DNA, da disse ble gjentatt veldig mange ganger. Tidsmessig var strandnot-metoden betydelig raskere da det kun tok tre dager å samle inn resultatene, mens det tok flere måneder å analysere miljø-DNAet (inkludert designing av primere og utprøving). Det er likevel viktig å huske at målet med oppgaven var å utprøve en metode som ikke er vel etablert og at en slik

utprøving selvsagt vil ta mye tid og koster mye penger. Når metoden er vel etablert vil denne arbeidstiden minske og kostnadene vil stabilisere seg på et lavere nivå, og det er denne tiden og disse kostnadene som kan sammenliknes med f.eks. strandnottrekk.

I andre miljø har metoden vist seg å ha en kortere behandlingstid og lavere kostnader sammenlignet med tradisjonelle. I ferskvannssystemer ble det kalkulert at miljø-DNA-metoden var mindre tidkrevende og 2,5 ganger billigere ved overvåkning av den invasive arten amerikansk oksefrosk (Dejean et al. 2012), og 6-10 ganger billigere for overvåkning av storsalamander (Biggs et al., 2015). I en studie av Jerde et al., (2011) ble det også vist at metoden var betydelig mer tidseffektiv for å observere sølvkarpe (*Hypophthalmichthys molitrix*), da det tok 93 arbeidsdager for å detektere karpene i en lokalitet med elektrofiske, sammenlignet med 0.147 arbeidsdager med miljø-DNA-analyser. Det er likevel viktig å nevne at slike beregninger gjerne gjelder for sjeldne og unntvikkende arter. I tilfeller hvor arter en lett å detektere er det ikke sikkert at resultatene er de samme (Herder et al., 2014).

5.1.5 Fordeler med miljø-DNA-metoden

Flere fordeler, som tidligere er blitt vist med miljø-DNA metoden, ble også observert her. For det første ble verken habitat eller organismer nevneverdig påvirket, som viser at metoden ikke er invaderende (Willerslev & Thomsen, 2015). Med strandnot-metoden ble alle fiskene sluppet fri etter de var identifisert og lengde-målt, men en slik metode vil trolig påføre noe stress for fisken, og habitatet vil bli noe forstyrret. Det var også mindre risiko for spredning av invaderende arter og sykdommer, da materialene brukt for å hente inn miljø-DNA-prøver var sterile. Strandnota ble ikke desinfisert mellom trekk i ulike områder og kunne derfor ha være en kilde til introduserte arter og sykdommer (Herder et al., 2014). Miljø-DNA-prøvene kunne også bli samlet inn i nærmest alle habitater, mens strandnottrekket kun kunne bli utført der havbunnen tillot det, som i områder med lite vegetasjon og stein. Miljø-DNA kunne også bli samlet inn i alle typer værforhold, mens strandnottrekket blant annet ble utsatt i noen lokaliteter på grunn av flom i elvene som munnet ut ved stasjonene.

5.1.6 Ulemper med miljø-DNA-metoden

Miljø-DNA-metoden hadde også noen ulemper sammenlignet med strandnot-metoden. Med strandnottrekket fant de blant annet mer tilleggsinformasjon enn det som er mulig med miljø-DNA-metoden. De fikk f. eks. informasjon om størrelsen på fisken, som kan gi en indikasjon

på fiskens alder. Med miljø-DNA-metoden er dette ikke mulig, da jeg kun kan se om arten er til stedet eller ikke. Jeg kan heller ikke si noe om fiskens helse eller reproduksjon, som er viktig når man skal vurdere tilstanden til et miljø (Herder et al., 2014). Med artsspesifikke primere og prober hadde jeg heller ikke muligheten til å oppdage nye arter, eller nye aspekter av det marine systemet, noe som var mulig med strandnot-metoden (og med multiart-deteksjon, se avsnitt 5.3). Det er også viktig å huske at man kun kan detektere arter som har kjente DNA-sekvenser, noe som ikke er tilfellet for alle. Dette var ikke et hinder her, da det fantes kjente sekvenser for alle artene funnet i strandnottrekket, men det kan være en begrensning i andre undersøkelser. Det jobbes i dag med å få kjente sekvenser for alle fiskearter, og i 2012 var mer enn en tredjedel av verdens fiskearter dokumentert.

Muligheten for kontaminering er en av de største ulempene med analysering av miljø-DNA, og kan forkomme i alle trinn av metoden, fra innsamling til analysering. Krysskontaminering, fra en prøve til en annen, kan skje hvis prøvene ikke er isolert eller lagret på tilstrekkelig måte. Alle prøvene mine ble oppbevart i sterile flasker, men i samme kjølerom under strandnottoktet, og i samme beholder under transportering til laboratoriet. Likevel er det liten sannsynlighet for at slik kontaminering har skjedd, da hver flaske ble godt lukket etter hver prøvetaking. For å kunne være helt sikker på at det ikke forekom kontaminering i denne fasen kunne jeg ha brukt kontrollprøve i feltet. En slik kontrollprøve kan være sterilt vann, oppbevart i en steril flaske, som blir behandlet og testet på samme måte som miljø-DNA-prøvene. Hvis denne slår ut negativt, altså ingen DNA detektert, kan man være sikrere på at krysskontaminering ikke har forekommet.

Laboratorie-kontaminering kan være spesielt alvorlig på grunn av den hyppige bruken av PCR i miljø-DNA-studier (Willerslev & Thomsen, 2015). I denne undersøkelsen ble det brukt separerte rom for pre- og post-PCR-arbeid. Det ble også brukt et eget rom for filtrering av miljø-DNA-prøvene. I alle PCR- og qPCR-analysene ble det også brukt positive kontroller og blankprøver. Hvis blankprøven slo ut, ble forsøket gjort på ny. Jeg kan derfor, med god sikkerhet, eliminere muligheten for kontaminering av mine prøver på laboratoriet.

5.1.7 Potensielle feilkilder

Når man analyserer resultatene fra en miljø-DNA-analyse er det viktig å være noe kritisk, da det kan være andre grunner til at DNA blir registrert, enn at arten er naturlig til stedet. Jeg kan ha fått falske positive resultater. Dette kan skje hvis primere og prober ikke er spesifikke nok,

og binder seg til DNA fra andre arter enn mål-arten (Darling & Mahon, 2011). Dette skjedde med torsk 1-, sei-, bergnebb- og grønngylt-proben. Disse probene ble testet *in silico*, mot kjente sekvenser med Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), og viste da forskjeller i sekvensen. Når probene ble testet *in vitro*, mot DNA uthentet fra fiskeartene, var forskjellene likevel ikke betydelige nok til å kunne skille mellom de ulike artene. Alle probene ble testet flere ganger, også med ulike annealing-temperaturer, uten å få ønsket resultat. Jeg prøvde da å finne sekvenser som hadde flere ulikheter, men dette var spesielt vanskelig mellom torsk og sei, og mellom bergnebb og grønngylt. Dette kommer av at disse artene er nært beslektet med hverandre. Torsk og sei tilhører begge torskefamilien, og bergnebb og grønngylt tilhører piggfinnefiskfamilien. Dette viser hvor viktig det er med spesifikke prober, og at de blir testet før de blir brukt på miljø-DNA. Uten utprøving på genomisk DNA fra andre arter ville disse prøvene gitt falske positive resultater, som vil si at artene ville blitt feilaktig registrert i de ulike lokaliteter. For torsk 2- og svartkutling-proben (og primere) ble denne feilkilden eliminert, da disse ble validert ved å teste dem *in silico*, *in vitro* og *in situ*. Kloning og sekvensering av qPCR-produktet til torsk bekreftet også dette.

En annen kilde til falske positive resultater er at DNAet kan ha blitt transportert fra et område til et annet med havstrømmer. Thomsen et al., (2012a) estimerte at DNA kunne bli transportert ca. 40-600 km i havet før det var så degradert at det ikke lengre kunne detekteres med miljø-DNA-metoden. De påpeker likevel at på grunn av den store uttynningen av DNA i havet vil miljø-DNA-konsentrasjonen synke betydelig med økt avstand til kilden. På grunn av dette vil miljø-DNA trolig komme fra lokalt opphav. For å eliminere sannsynligheten for at miljø-DNA har blitt transportert fra fjerne lokaliteter utførte de også et eksperiment hvor de undersøkte nedbrytningen av DNA i saltvann. I løpet av 15 dager ble det tatt gjentatte prøver på 400 ml (den første en time etter innsamling) fra et akvarium med 50 L. Prøvene ble analysert med artsspesifikke primere og prober, og viste at det kun tok 0.9 dager før DNAet til trepigget stingsild, og 6.7 dager før DNAet til skrubbe, ikke lengre kunne detekteres. De konkluderte derfor med at deteksjon av DNA i saltvann sannsynligvis stammer fra en art av lokalt opphav. Willerslev and Thomsen (2015) mente også at en slik rask nedbrytning indikerer at arten har vært i området i nærmeste fortid.

Ballastvann, kloakkutslipp, andre dyr og utstyr som ikke er tilstrekkelig sterilisert kan også ha introdusert miljø-DNAet til et område. Jeg har ingen informasjon om ballastvann eller kloakkutslipp i prøvetakingsområdene, noe som burde vært undersøkt for å eliminere disse

mulighetene. Jeg vil likevel tro at sannsynligheten for at svartkutling-DNA er blitt fraktet med kloakkutslipp, er minimal da den verken blir holdt som husdyr eller høstet for mat. Jeg tror også at sannsynligheten for at ballastvann har påvirket mine prøver er liten, da miljø-DNA-prøvene ble innhentet relativt nærme land, der vannet var grunt, og større båter ikke har tilgang. I tillegg, som nevnt overfor, skjer nedbrytningen av DNA relativt raskt, fra et par dager til en måned. Dette indikerer at DNAet jeg detekterte var tilført vannet i nærmeste fortid, noen som minsker sannsynligheten for at det var DNA fra slike kilder jeg detekterte. Transport via andre dyr er også en mulighet, da miljø-DNA metoden ikke kan skille mellom levende og døde organismer. DNAet jeg registrerte kan f.eks. komme fra ekskrementer til fugler, eller andre rovdyr, som har spist torsk eller svartkuling. Jeg tror likevel at sannsynligheten er minimal for at det var slik DNA jeg registrerte, med tanke på det store vannvolumet, den høye nedbrytningen av DNA og den lille mengden med vann som ble samlet inn. I tillegg vil kvantiteten og kvaliteten til DNA som har gått igjennom fordøyelsessystemet til et rovdyr trolig være lav (Herder et. al., (2014).

Miljø-DNA kan bli fraktet fra et område til et annet vha. mennesker. Fiskeutstyr, båter, arbeidsklær og innsamlingsutstyr for miljø-DNA kan transportere med seg DNA. I innsamling av miljø-DNA-prøvene ble det brukt nye hansker og nytt innsamlingsutstyr for hver lokalitet, så det er lite sannsynlig at DNA ble transportert på denne måten. Strandnottrekket ble utført direkte før en vannprøve ble samlet inn, og miljø-DNA kan ha blitt fraktet med nota. Likevel vil mengde DNA fraktet på denne måten være små, og sannsynligheten liten for at det var slik DNA jeg registrerte. For å minimere disse usikkerhetene om introdusert-DNA burde jeg ha tatt gjentatte prøver av samme området på ulike tidspunkt. På den måten ville døde dyr, avføring fra rovdyr og andre kilder til introdusert-DNA hatt tid til å brytes ned, mens arter som er permanent tilstede ville fortsatt kunne detekteres.

5.2 Multi-art deteksjon

Med multi-arts deteksjon kunne jeg ikke generere en liste av arter, da universalprimerne ikke fungerte som forventet. Universalprimerene MiFish-U-F/R, Fish2bCBR/ Fish2CBL og Fish2degCBL/Fish2CBR fungerte ved første forsøk da de slo ut på fiske-DNA og miljø-DNA. Jeg var noe usikker på blanken i A, B og C (Figur 20), men dette er sannsynligvis ikke positivt utslag, men primerdimerer. Ved gjentatte forsøk av disse fikk jeg positivt resultat på fiske-DNA, men ikke på miljø-DNA. L2513-F/H2714-R gav positivt utslag på torske-DNA,

men negativt utslag på sei- og svartkutling-DNA. På miljø-DNA ser det ut som det var et svakt positivt utslag (Figur 20 D). Ved gjentatte forsøk med disse universalprimerene fikk jeg negativt utslag på både fiske-DNA og miljø-DNA.

Universalprimerne Ac12s fungerte i de første stadiene av analysen, da de gav PCR-produkt fra både genomisk fiske-DNA og miljø-DNA (Figur 22). Utslagene på miljø-DNAet var svake og på stasjon 66 var det ikke synlig bånd. Resultatet ble det samme i alle forsøkene. Når primerne hadde indekser og adaptore i endene, for Illumina sekvensering, slo de fortsatt sterkt ut på fiske DNA (Figur 23), men ikke lengre på miljø-DNAet fra noen av stasjonene.

Det at universalprimerne i dette forsøket ikke klarte, ved gjentatte forsøk, å gi PCR-produkt fra miljø-DNA-prøvene (i alle fall ikke nok til å detekteres med gel elektroforese) betyr at jeg har fått falske negative resultater (type II error). Det finnes to ulike forklaringer på slike resultater. Den første er at miljø-DNA ikke er blitt registrert i PCR, til tross for at det er miljø-DNA i vannprøvene. Dette kan det komme av at ekstraksjon av miljø-DNA fra en vannprøve ikke er tilstrekkelig. Hvis humussyrer eller humusstoffer er tilstede i en vannprøve, kan dette hemme Taq Polymerasen, og DNAet vil ikke bli tilstrekkelig oppformert i PCR. I denne oppgaven er dette trolig ikke tilfellet, da artsspesifikke primere amplifiserte DNA fra de samme miljø-prøvene. PCR-miksen jeg brukte var også spesielt designet for slike analyser, med ekstra robuste enzymer og stoffer som motvirker PCR-hemmere. En annen årsak kan være at primerne ikke var sensitive nok til å detektere DNAet. Miljø-DNA består hovedsakelig av degradert og fragmentert DNA, som betyr at det er veldig korte sekvenser (ned mot 150 basepar) tilgjengelig i prøvene. Hvis man forsøker å amplifisere et fragment som er lengre, vil ikke disse korte sekvensene bli registrert. For universalprimerne Ac12s er dette mest sannsynlig ikke tilfellet, da disse primerne var sensitive nok til å amplifisere miljø-DNA fra lokalitet 3, 41, 57, 60 og 65. Heller ikke for universalprimerne MiFish-U-F/R, Fish2bCBR/ Fish2CBL, Fish2degCBL/Fish2CBR og L2513-F/H2714-R er dette en sannsynlig årsak. Alle universalprimerne, inkludert Ac12s, var hentet fra tidligere publikasjoner som viste at de fungerer på miljø-DNA. Thomsen et al. (2012a) viste at universalprimerparene Fish2bCBR/ Fish2CBL og Fish2degCBL/Fish2CBR fungerte bra i deres undersøkelser, da de detekterte DNA fra 15 ulike arter utenfor kysten av Danmark. Universalprimerne L2513-F/H2714-R og Ac12s ble testet i 12 mesokosmer, som inneholdt de samme 9 artene, hvor L2513-F/H2714-R klarte å detektere alle artene, i alle mesokosmene. Ac12s klarte ikke å detektere østlig moskitofisk (*Gambusia holbrooki*) i 2 av mesokosmene, og ikke runpetroll av Amerikansk oksefrosk i 3, men ellers ble alle arter detektert (Evans et al., 2015).

Miya et al. (2015) som designet MiFish-U-F/R primerne, hadde først problemer når de først skulle teste disse primerne. PCR-bånd på gelen var ofte utydelige og det kom flere ekstrabånd på utsiden av forventet produktstørrelse. De måtte prøve å feile med flere ulike eksperimentelle design før de fant at PCR-kittet (KAPA HiFi HotStart ReadyMix), sammen med en høy annealing temperatur (65-67°C), var de viktigste faktorene som påvirket suksessfull amplifisering. Med denne informasjonen klarte de å detektere miljø-DNA fra 168 arter i et akvarium med 249 arter, men hvor kun 180 av disse hadde referanse sekvenser i databaser.

Det at jeg brukte en annet PCR kit (TaqMan® Environmental Master Mix 2.0 (Life Technologies)) og lavere annealing-temperaturer (50°C) enn Miya et al. (2015) kan også være en mulighet for at universalprimerne MiFish ikke fungerte. Universalprimerne L2513-F/H2714-R og Ac12s ble også testet med andre enzymer og buffere enn det jeg brukte, og med en 'step-down' temperaturprofil, med tre ulike annealing temperaturer. I undersøkelsen av Fish2bCBR/ Fish2CBL og Fish2degCBL/Fish2CBR ble det brukt samme master mix som og samme annealing temperatur jeg jeg brukte, så det kan ikke være en forklaring på at disse ikke fungerte som forventet.

Den andre typen falske negative resultater, er at arten er tilstede i et miljø, men DNAet blir ikke samlet inn. Det kan komme av utilstrekkelig innsamlings metode. Dette gjelder hovedsakelig i rennende vann, som en elv, hvor DNAet raskere blir fraktet vekk fra kilden. I denne analysen kan ikke dette være en forklaring, da jeg vet at det er miljø-DNA i prøvene, da dette ble målt og artsspesifikke prober (og primere) fungerte på de samme miljø-DNA-prøvene.

En annen mulighet er at prøvene ikke ble behandlet eller lagret på en tilstrekkelig måte og DNAet i prøvene kan ha blitt brutt ned før videre analysering. Miljø-DNA-prøvene ble lagret i frysen (-20°C) og satt på is når de ble testet. Likevel kan dette være en forklaring på mine resultater. Alle universalprimerne gav et sterkt positivt utslag på miljø-DNA ved første forsøk, bortsett fra L2513-F/H2714-R. Ved videre forsøk var det kun Ac12s som fikk utslag på miljø-DNA, men da med et betydelig svakere utslag. På dette stadiet hadde miljø-DNA-prøvene blitt tint og fryst ved mange anledninger. Det svake utslaget på miljø-DNA-prøvene kan komme av at DNAet hadde begynt å bryte ned på dette stadiet. Det svake utslaget på miljø-DNA med L2513-F/H2714-R, og mangel på utslag på stasjon 66 med Ac12s, i de første utprøvnigen kan komme av at miljø-DNA fra stasjoner testet her var mer brutt ned enn de

andre. Det var blant annet ikke miljø-DNA fra stasjon 66 igjen ved de siste analysene, som viser at den ofte ble brukt til tester, og dermed ofte ble tint og fryns.

Universalprimerne Ac12s, med indekser og adaptore for Illumina-sekvensering, ble testet sist, fem måneder etter DNA-ekstraksjon. På dette tidspunktet kan miljø-DNAet fra alle stasjonene være så brutt ned at det ikke ble detektert i noen prøver. Det kom det også veldig mye primerdimere, og en mulighet kan være at primerne heller dannet sekundærstrukturer med seg selv, enn å binde seg til miljø-DNAet, som var av ``dårligere`` kvalitet. For å teste dette ble Ac12s uten adaptore og indekser testet igjen på torsk-DNA og miljø-DNA. Denne gangen slo torsk fortsatt ut, med det ble ikke detektert miljø-DNA i noen av prøvene. Dette indikerer at nedbrytning av DNA kan være en mulig årsake til at universalprimerne ikke presterte som forventet. Miljø-DNAet ble testet med artsspesifikke primere i qPCR etter forsøket med Ac12s og kunne da detekteres. Dette kan likevel komme av at qPCR er mer sensitiv metode enn PCR, og at primerne, med probe, var mer sensitive.

Det at universalprimerne fungerte på fiske-DNA, men ikke miljø-DNA prøvene, er fordi det er lettere å få PCR-produkt på genomisk DNA, enn miljø-DNA som er delvis nedbrutt. Genomisk fiske-DNA hadde også en høyere DNA konsentrasjon (mellom 110,7-251,0 Ng/ul) (Tabell 3), enn miljø-DNA, (mellom 22,4-76,5 Ng/uL) (Tabell 2).

5.3 Miljø-DNA i fremtiden

Miljø-DNA-metoden tilbyr nye alternativer for overvåkning av marine økosystemer, men, som med de fleste nye metoder, kommer det også nye utfordringer. Det er flere usikkerheter koblet til en miljø-DNA analyse, og flere undersøkelser trengs før metoden kan bli allment akseptert som en pålitelig overvåkningsmetode for marine fauna. Denne oppgaven viser hvor utfordrende og arbeidskrevende en slik prosess med utprøving og optimalisering av primere og prober er. Den viser også hvor viktig det er at man tar hensyn til feilkilder når man analyserer resultatene.

I andre miljøer har metoden vist at den både er mer tids- og kostnadseffektiv enn tradisjonelle metoder, spesielt i undersøkelser av arter som forekommer i lav tetthet (Biggs et al., 2015). Deteksjonen er ikke alltid 100 %, men sammenlignet med tradisjonelle metoder er det vist at den veldig ofte har en høyere deteksjonssannsynlighet (Dejean et al., 2012). Studier har også vist her at miljø-DNA-analyser i disse miljøene er en pålitelig metode, men, som med de

fleste deteksjonsmetoder, er det feilkilder å ta hensyn til, som falske positive og negative resultater (Darling & Mahon, 2011). Slike feilkilder forekommer likevel også i tradisjonelle metoder, og en deteksjonsmetode uten noen former for feilkilder er urealistisk. Jeg vil derfor tro at metoden kan bli et godt alternativ til overvåkning av arter også i marine miljøer. Før dette kan skje er det likevel nødvendig med flere undersøkelser om ulike faktorer som påvirker miljø-DNA her. Først og fremst er det nødvendig med mer informasjon om hvordan faktorer som temperatur, pH og salinitet påvirke miljø-DNA. Det er også viktig med flere undersøkelser av nedbrytning, fortykning og spredning av miljø-DNA for bedre påliteligheten til resultatene, spesielt med hensyn til falske negative og positive resultater. Disse faktorene er bedre forstått i andre miljøer, men det er kun noen få publikasjoner som viser dette i åpne saltvannssystemer (Thomsen et al., 2015a; Foote et al., 2012; Kelly et al., 2014). Det er også uklart om mengden miljø-DNA i marine vann reflekterer populasjonsstørrelse eller biomassen til faunaaen i et område. Dette kommer blant annet av usikkerheter knytte til mengde DNA en art frigjør til omgivelsene. Flere undersøkelser av dette, og hvordan det er påvirket av størrelsen og levestilten til artene, behøves.

Multiart-deteksjon av miljø-DNA fungerte ikke som forventet i dette forsøket, men jeg vil likevel tro, på grunn av tidligere funn, at dette kan bli en god metode for overvåkning av marine fiskearter. Thomsen et al. (2012a) fant blant annet at metoden var mer sensitiv en strandnot-metoden, da det ble registrerte 15 marine fiskearter med miljø-DNA-analyser og kun 4 (i gjennomsnitt av tre år) med strandnot-metoden. I tillegg detekterte de sardin (*sardina pilchardus*), en art som ikke er vanlig i det området som ble undersøkt, som viser at denne fremgangsmåten har muligheten til å oppdage nye arter (i motsetning med artsspesifikk deteksjon).

Det er også viktig med mer kunnskap om PCR-effektivitet på miljø-DNA fra flere arter. Med multiart-deteksjon er primer affinitet den største ulempen, hvor noen sekvenser blir amplifisert lettere enn andre. Dette kan gi et skjevt bilde av artssammensetningen i et miljø, og det er derfor viktig med mer kunnskap om effektiviteten til universalprimere (og artsspesifikke) på miljø-DNA fra flere arter. Med denne informasjonen kan blant annet NGS kan gi indikasjoner om mengdeforhold mellom arter, og ikke bare detektere hvilke arter som er tilstede. Det er også viktig at metoden blir mer standardisert, og at et felles vokabular blir opprettet, slik at forsøk lettere kan bli replikert.

Teknologien for DNA-analyser fortsetter stadig å forbedre seg, og flere primere vil bli optimalisert og publisert. FISH-BOL, the Fish Barcode of Life Campaign

[\(http://www.fishbol.org/\)](http://www.fishbol.org/), jobber i dag med å kartlegge COI-sekvenser for alle fisker i verden. Disse sekvensene kan bli brukt til artsidentifikasjon, og databasen vil være et godt hjelpemiddel for designing av primere og prober til miljø-DNA analyser. I undersøkelser av marin biodiversitet tror jeg at metoden kan fungere bedre som et supplement, da tradisjonelle metoder kan gi mer informasjon om artene og deres miljø. I tilfeller der det kun er nødvendig å detektere arten, og informasjonen hentet med miljø-DNA er tilstrekkelig, kan nåværende metoder bli erstattet. Også der det er viktig med raske tilbakemeldinger, som ved påvisning av invasive arter, og i overvåkning av unntvikende og sjeldne arter vil jeg tro at metoden kan bli overlegen, da disse er vanskelige å observere med de metodene som blir brukt i dag.

6 Konklusjon

I denne oppgaven ble det bekreftet at miljø-DNA-metoden kan brukes for påvisning av marine fiskearter. Med artsspesifikk deteksjon kunne jeg påvise at torsk og svartkutling var tilstede i alle utprøvde lokaliteter. Analysering av miljø-DNA indikerte også en høyere sensitivitet enn standnot-metoden, da disse artene ikke ble observert i alle lokalitetene med denne metoden. Artsspesifikke prober for sei, bergnebb, grønngylt og torsk (1) var ikke spesifikke nok, da de hybridiserte til DNA fra flere arter enn seg selv. Med multiart-deteksjon kunne jeg ikke generere en liste med arter, da universalprimerne ikke fungerte som forventet. I første del av analysen amplifiserte universalprimerne både genomisk fiske-DNA og miljø-DNA, men etter flere utprøvnings ble miljø-DNAet ikke lengre registrert. Dette kommer trolig av at miljø-DNAet hadde begynt å bryte ned, slik at sekvensene var for korte til at primerne kunne lokalisere dem. Strandnot-metoden genererte en liste med arter, men på grunn av indikasjoner om lavere sensitivitet er det ikke sikkert alle arter tilstedte i miljøet er representert her.

Metoden viser potensialet til å bli et pålitelig redskap for fremtidig overvåkning av marin fauna. For å forsterke påliteligheten til miljø-DNA-analysene er det viktig med mer kunnskap om faktorer som påvirker miljø-DNA i marine økosystemer.

Referanser

- Andersen, K., Bird, K. L., Rasmussen, M., Haile, J., Breuning-Madsen, H., Kjaer, K. H., . . . Willerslev, E. (2012). Meta-barcoding of 'dirt' DNA from soil reflects vertebrate biodiversity. *Molecular Ecology*, 21(8), 1966-1979. doi:10.1111/j.1365-294X.2011.05261.x
- Applied biosystems, TaqMan Gene Expression Assay Solutions (udatert). Hentet 19.08.15 fra: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/taqman-gex-brochure.pdf>
- Bentley, D. R., Balasubramanian, S., Swerdlow, H. P., Smith, G. P., Milton, J., Brown, C. G., . . . Bignell, H. R. (2008). Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*, 456(7218), 53-59.
- Biggs, J., Ewald, N., Valentini, A., Gaboriaud, C., Dejean, T., Griffiths, R. A., . . . Brotherton, P. (2015). Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt (*Triturus cristatus*). *Biological Conservation*, 183, 19-28.
- Bohmann, K., Evans, A., Gilbert, M. T., Carvalho, G. R., Creer, S., Knapp, M., . . . de Bruyn, M. (2014). Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends Ecol Evol*, 29(6), 358-367. doi:10.1016/j.tree.2014.04.003
- Bourlat, S. J., Borja, A., Gilbert, J., Taylor, M. I., Davies, N., Weisberg, S. B., . . . Benzie, J. (2013). Genomics in marine monitoring: new opportunities for assessing marine health status. *Marine pollution bulletin*, 74(1), 19-31.
- Cappellini, E., Willerslev, E., Boomsma, W., Nielsen, R., Hebsgaard, M. B., Brand, T. B., . . . Dahl-Jensen, D. (2007). Ancient biomolecules from deep ice cores reveal a forested southern Greenland. *science*, 317(5834), 111-114.
- Corpus, G. (2010). Get in the "groove" with new molecular technology. *MLO: medical Laboratory Observer*, 42(1), 36.
- Costanza, R. (1999). The ecological, economic, and social importance of the oceans. *Ecological economics*, 31(2), 199-213.
- Darling, J. A., & Mahon, A. R. (2011). From molecules to management: Adopting DNA-based methods for monitoring biological invasions in aquatic environments. *Environmental Research*, 111(7), 978-988. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2011.02.001>
- Davison, J., Moora, M., Willerslev, E., Zobel, M., Coissac, E., Edwards, M. E., . . . Taberlet, P. (2014). Fifty thousand years of Arctic vegetation and megafaunal diet. *Nature*, 506(7486), 47-+. doi:10.1038/nature12921
- Deagle, B. E., Jarman, S. N., Coissac, E., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2014). DNA metabarcoding and the cytochrome c oxidase subunit I marker: not a perfect match. *Biology letters*, 10(9), 20140562.

- Dejean, T., Valentini, A., Miquel, C., Taberlet, P., Bellemain, E., & Miaud, C. (2012). Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Journal of Applied Ecology*, *49*(4), 953-959.
- Epp, L. S., Boessenkool, S., Bellemain, E. P., Haile, J., Esposito, A., Riaz, T., . . . Johnsen, A. (2012). New environmental metabarcodes for analysing soil DNA: potential for studying past and present ecosystems. *Molecular Ecology*, *21*(8), 1821-1833.
- Espeland, S. H., & Knutsen, H. (2014). Rapport fra høstundersøkelsene med strandnot i Indre Oslofjord 2014.
- Evans, N. T., Olds, B. P., Renshaw, M. A., Turner, C. R., Li, Y., Jerde, C. L., . . . Lodge, D. M. (2015). Quantification of mesocosm fish and amphibian species diversity via environmental DNA metabarcoding. *Mol Ecol Resour.* doi:10.1111/1755-0998.12433
- Ficetola, G. F., Miaud, C., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2008). Species detection using environmental DNA from water samples. *Biol Lett*, *4*(4), 423-425. doi:10.1098/rsbl.2008.0118
- Foote, A. D., Thomsen, P. F., Sveegaard, S., Wahlberg, M., Kielgast, J., Kyhn, L. A., . . . Gilbert, M. T. (2012). Investigating the potential use of environmental DNA (eDNA) for genetic monitoring of marine mammals. *PLoS One*, *7*(8), e41781. doi:10.1371/journal.pone.0041781
- Freeland, J. R., Kirk, H., & Petersen, S. (2011). *Molecular Ecology* (Second ed. Vol. Second). chichester, UK John Wiley & Sons, Ltd.
- Giguët-Covex, C., Pansu, J., Arnaud, F., Rey, P. J., Griggo, C., Gielly, L., . . . Taberlet, P. (2014). Long livestock farming history and human landscape shaping revealed by lake sediment DNA. *Nature Communications*, *5*. doi:10.1038/ncomms4211
- Giles, R. E., Blanc, H., Cann, H. M., & Wallace, D. C. (1980). Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proceedings of the National academy of Sciences*, *77*(11), 6715-6719.
- Guo, Y., Cheng, A., Wang, M., Shen, C., Jia, R., Chen, S., & Zhang, N. (2009). Development of TaqMan® MGB fluorescent real-time PCR assay for the detection of anatis herpesvirus 1. *Virology Journal*, *6*(1), 1.
- Hadidi, A., & Candresse, T. (2003). Polymerase chain reaction. *Viroids*, 115-122.
- Hansen, A. J., Willerslev, E., Binladen, J., Brand, T. B., Gilbert, M. T. P., Shapiro, B., . . . Cooper, A. (2003). Diverse plant and animal genetic records from Holocene and Pleistocene sediments. *science*, *300*(5620), 791-795.
- Herder, J., Valentine, A., Bellemain, E., Dejean, T., Delft, J., P.F., T., & Taberlet, P. (2014). Environmental DNA-a review of the possible applications for the detection of (invasive) species. *Stichting RAVON, Nijmegen., Report 2013-104*.
- Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R., & Gelfand, D. H. (1991). Detection of Specific Polymerase Chain-Reaction Product by Utilizing the 5'- 3' exonuclease activity of

Thermus-Aquaticus DNA-polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(16), 7276-7280.
doi:10.1073/pnas.88.16.7276

- Jerde, C. L., Chadderton, W. L., Mahon, A. R., Renshaw, M. A., Corush, J., Budny, M. L., . . . Lodge, D. M. (2013). Detection of Asian carp DNA as part of a Great Lakes basin-wide surveillance program. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 70(4), 522-526.
- Jerde, C. L., Mahon, A. R., Chadderton, W. L., & Lodge, D. M. (2011). "Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conservation Letters*, 4(2), 150-157.
- Kelly, R. P., Port, J. A., Yamahara, K. M., & Crowder, L. B. (2014). Using environmental DNA to census marine fishes in a large mesocosm. *PLoS One*, 9(1), e86175.
- Kircher, M., & Kelso, J. (2010). High-throughput DNA sequencing—concepts and limitations. *Bioessays*, 32(6), 524-536.
- Kutyavin, I. V., Afonina, I. A., Mills, A., Gorn, V. V., Lukhtanov, E. A., Belousov, E. S., . . . Gall, A. A. (2000). 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic acids research*, 28(2), 655-661.
- Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies—the next generation. *Nature reviews genetics*, 11(1), 31-46.
- Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J. Y., Sato, K., . . . Iwasaki, W. (2015). MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society Open Science*, 2(7), 150088. doi:10.1098/rsos.150088
- Morozova, O., & Marra, M. A. (2008). Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. *Genomics*, 92(5), 255-264.
- Olson, Z. H., Briggler, J. T., & Williams, R. N. (2012). An eDNA approach to detect eastern hellbenders (*Cryptobranchus a. alleganiensis*) using samples of water. *Wildlife Research*, 39(7), 629-636. doi:10.1071/wr12114
- Pierce, B. A. (2014). *Genetics, A Conceptual Approach*. New York: W.H Freeman and Company.
- Pilliod, D. S., Goldberg, C. S., Arkle, R. S., & Waits, L. P. (2014). Factors influencing detection of eDNA from a stream-dwelling amphibian. *Molecular Ecology Resources*, 14(1), 109-116.
- Rees, H. C., Maddison, B. C., Middleditch, D. J., Patmore, J. R. M., Gough, K. C., & Crispo, E. (2014). REVIEW: The detection of aquatic animal species using environmental DNA - a review of eDNA as a survey tool in ecology. *Journal of Applied Ecology*, 51(5), 1450-1459. doi:10.1111/1365-2664.12306

- Robin, E. D., & Wong, R. (1988). Mitochondrial-DNA Molecules and Virtual Number of Mitochondria per Cell in Mammalian-Cells. *Journal of Cellular Physiology*, 136(3), 507-513. doi:10.1002/jcp.1041360316
- Rogers, L. A., Olsen, E. M., Knutsen, H., & Stenseth, N. C. (2014). Habitat effects on population connectivity in a coastal seascape. *Marine Ecology Progress Series*, 511, 153-163. doi:10.3354/meps10944
- Shokralla, S., Spall, J. L., Gibson, J. F., & Hajibabaei, M. (2012). Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Mol Ecol*, 21(8), 1794-1805. doi:10.1111/j.1365-294X.2012.05538.x
- Stenseth, N. C., Bjornstad, O. N., Falck, W., Fromentin, J. M., Gjosaeter, J., & Gray, J. S. (1999). Dynamics of coastal cod populations: intra- and intercohort density dependence and stochastic processes. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 266(1429), 1645-1654. Retrieved from <Go to ISI>://WOS:000082118200006
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., & Rieseberg, L. H. (2012). Environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21(8), 1789-1793.
- Takahara, T., Minamoto, T., Yamanaka, H., Doi, H., & Kawabata, Z. (2012). Estimation of fish biomass using environmental DNA. *PLoS One*, 7(4), e35868. doi:10.1371/journal.pone.0035868
- Thomsen, P. F., Kielgast, J., Iversen, L. L., Moller, P. R., Rasmussen, M., & Willerslev, E. (2012a). Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. *PLoS One*, 7(8), e41732. doi:10.1371/journal.pone.0041732
- Thomsen, P. F., Kielgast, J., Iversen, L. L., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, M. T., . . . Willerslev, E. (2012b). Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Mol Ecol*, 21(11), 2565-2573. doi:10.1111/j.1365-294X.2011.05418.x
- Warwick, Biophysical Chemistry, PCR (2009). Hentet 13.08.15 fra: <http://www2.warwick.ac.uk/fac/sci/chemistry/research/arodger/arodgergroup/people/mrhab/research/pcr/>
- Wilcox, T. M., McKelvey, K. S., Young, M. K., Sepulveda, A. J., Shepard, B. B., Jane, S. F., . . . Schwartz, M. K. (2016). Understanding environmental DNA detection probabilities: A case study using a stream-dwelling char *Salvelinus fontinalis*. *Biological Conservation*, 194, 209-216.
- Willerslev, E., & Thomsen, P. F. (2015). Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation*, 183, 4-18. doi:10.1016/j.biocon.2014.11.019
- Wood, S. A., Smith, K. F., Banks, J. C., Tremblay, L. A., Rhodes, L., Mountfort, D., . . . Pochon, X. (2013). Molecular genetic tools for environmental monitoring of New Zealand's aquatic habitats, past, present and the future. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 47(1), 90-119. doi:10.1080/00288330.2012.745885

- Worm, B., Barbier, E. B., Beaumont, N., Duffy, J. E., Folke, C., Halpern, B. S., . . . Palumbi, S. R. (2006). Impacts of biodiversity loss on ocean ecosystem services. *science*, *314*(5800), 787-790.
- Yao, Y., Nellåker, C., & Karlsson, H. (2006). Evaluation of minor groove binding probe and Taqman probe PCR assays: Influence of mismatches and template complexity on quantification. *Molecular and Cellular Probes*, *20*(5), 311-316.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2006.03.003>

Oversikt over tabeller

Tabell 1 Antall individer av hver art ved de ulike stasjonene fanget i strandnot-trekket.....	49
Tabell 2 DNA-konsentrasjon og renhet i miljø-DNA-prøver	50
Tabell 3 DNA-konsentrasjon og renhet i genomisk fiske-DNA-prøver	51
Tabell 4 Oversikt over alle artsspesifikke primere og prober. I parentes står antall nukleotider i sekvensen.	51
Tabell 5 DNA-konsentrasjon (ng/μl) i PCR-reaksjon av fortynnet torsk- og svartkutling-DNA	55
Tabell 6 DNA konsentrasjon (ng/μl) i PCR-reaksjonen med fortynnet miljø-DNA	56
Tabell 7 Antall blå og hvite bakterie kolonier på LB-agar plater	57
Tabell 8 Universalprimer med deres navn, sekvens, mål gen og referanse.	59
Tabell 9 Oversikt over universalprimere, med indekser og adaptore, for Illumina sekvensering	62

Oversikt over figurer

Figur 1 Oversikt over de 21 områdene for strandnottrekk (Hentet fra: Espeland and Knutsen (2014)).....	11
Figur 2 Antall fiske arter registrert med 9 tradisjonelle overvåkningsmetoder og miljø-DNA. Stolpene viser gjennomsnittlig antall arter fanget i 2009, 2010 og 2011. Miljø-DNA stolpen (eDNA) viser totalt antall fiskearter registrert i 2011 med denne metoden. (*-avhengig av kompetente eksperter i fiskeidentifisering) (** -bare mulig der tilstanden til havbunnen tillater det). Standardavvik er markert. (Hentet fra: Thomsen et al. (2012a)).....	15
Figur 3 Illustrasjon av fordelene med høyere deteksjonssannsynlighet med miljø-DNA, sammenlignet med tradisjonelle metoder. (Tegning etter: Herder et al. (2014)).....	16
Figur 4 Potensielle kilder til feil ved analysering av miljø-DNA (tegnet etter: Darling & Mahon (2011)).....	20

Figur 5 Oversikt over ulike trinn av en miljø-DNA-analyse med artsspesifikke primere. 1. Innsamling av miljø-DNA. 2. Filtrering av vannprøven. 3. Uthenting av DNA fra filter. 4. Amplifikasjon av DNA i qPCR (eller PCR) med artsspesifikke primere og probe. 5. Analysing av qPCR resultater. 6 A. Positivt utslag på qPCR, mål-arten detektert. 6 B. Negativt utslag på qPCR, mål-arten ikke detektert 21

Figur 6 Forenklet skisse over en PCR-reaksjon med dens tre trinn: denaturering, hybridisering og polymerisering. Blå streker indikerer DNA-templat, røde piler indikerer primerne og grønne streker indikerer nysyntetiserte DNA-tråder. (Hentet fra Warwik., biophysical chemistry, PCR (2009))..... 23

Figur 7 Illustrasjon av konseptet til Taqman minor groove binding (MGBTM) probe i qPCR. 1. Dobbeltrådet DNA-templat og analysekomponenter. 2. Denaturert templat. 3. Primere og Taqman proben, med sin quencher (Q), og Fam reporter (F), hybridiserer til DNA templatet, og polymerasen syntetiserer en ny tråd. F blir frigjort fra proben, og et fluoriserende signal blir kan detekteres. (Hentet fra: Applied biosystems, TaqMan Gene Expression Assay Solutions (udatert) 25

Figur 8 Kontroll av PCR-produkt. 1. Kloning av DNA-fragment som skal sekvenseres 2. Trådsyntese i PCR på koloniene fra kloningen, ved hjelp av en primer og en blanding av dNTP og ddNTP. Under DNA-syntesen vil polymerasen sette inn nye dNTP helt frem til en ddNTP blir inkorporert og syntesen stopper opp. Dette produserer fragmenter med ulik størrelse 3. Separering av DNA-fragmenter med kapillærelektroforese og avlesning av fluoriserende merker på ddNTP (Hentet fra: Kircher and Kelso (2010)) 27

Figur 9 Illustrerer forløpet ved multi-arts deteksjon av miljø-DNA i vannprøver. 1. Innsamling av miljø-DNA. 2. Filtrering av vannprøvene. 3. Ekstraksjon av miljø-DNA. 4. DNA-amplifisering med universalprimere i PCR. 5. Gel-elektroforese. 6. Klargjøring av universalprimere for sekvensering. 7. NGS-sekvensering. 8. Analysing av sekvenserings resultater. 9. Resultatet er en liste med identifiserte arter 28

Figur 10 Modifisering og broamplifisering. A. Klargjøring av primere for sekvensering ved liggering av adaptere og indekser på endene. B. Broamplifisering ved at DNA-tråden bøyer seg og bindes kovalent til adapterens komplementære oligonukleotide i flytcellen (Hentet fra Bentley et al. (2008))..... 30

Figur 11 Illustrasjon av Illumina sekvensering. A. De fire nukleotidene med ulike fluorescerende merking blir skylt over flytcellen, og passende nukleotide blir inkorporert i DNA-sekvensen. Polymerasen og frie nukleotider blir vasket vekk, og det blir tatt et bilde av fluorescensen til den inkorporerte nukleotiden. Terminator og fluorescens blir vasket vekk, og prosessen gjentas. B. Bilde av fluorescensen i flytcellen. (Hentet fra: Metzker (2010)).....	31
Figur 12 Innsamling av miljø-DNA etter strandnottrekket i Kumkroken (stasjon 36), Flødevigen.....	35
Figur 13 Kart over stasjoner for strandnottrekk og innsamling av miljø-DNA. Røde prikker viser de ulike stasjonene.....	36
Figur 14 Bilde av filtreringsutstyr.....	37
Figur 15 Multiple sequence alignment i clustal Omega, EMBL-EBI, med torske-probe 2 mot lyr (A), hvitting (B), sei (C), skrubbe (D), bergnebb (E), grønnngylt (F), sandkutling (G), svartkutling (H), berggylt (I) og ørret (J). Nukleotider markert med rødt indikerer sekvensen torske-probe 2 hybridiserte til. Stjerne indikerer lik nukleotide, og mellomrom indikerer forskjell.....	52
Figur 16 qPCR bilde av torske-probe 2 (A) og svartkutling-probe (B) mot fiske-DNA fra torsk, svartkutling, sei, bergnebb, grønnngylt, miljø-DNA og blank. Rød kurve er positivt utslag på, torske-DNA (A) og svartkutling-DNA (B). Grønn kurve er positivt utslag på miljø-DNA. Rette kurver er negative utslag. X-aksen viser C_T -verdi.....	53
Figur 17 qPCR bilde av svartkutling-probe (A) og torske-probe 2 (B) mot alle miljø-DNA-prøver (A=miljø-DNA fra stasjon 3, B= miljø-DNA fra stasjon 5, C= miljø-DNA fra stasjon 36, D= miljø-DNA fra stasjon 41, E= miljø-DNA fra stasjon 57, F= miljø-DNA fra stasjon 60, G= miljø-DNA fra stasjon 65, H= miljø-DNA fra stasjon 66. Gul linje uten utslag= blankprøve, røde linjen med lavest C_T = kontroll DNA). X-aksen viser C_T -verdi.....	54
Figur 18 qPCR bilde av torske-probe 2 (A) og svartkutling-probe (B) mot positiv kontroll (rød kurve), ufortynnet miljø-DNA (grønn kurve), fortynnet miljø-DNA og blank (de andre kurvene).....	56

Figur 19 Viser resultatet av alignment med sekvenseringsresultatet av torsk A2 og COI genet. Stjerne indikerer lik base. Nukleotider markert med blå viser Reverse og Forward primer. Røde nukleotider viser proben. 58

Figur 20 Gelbilde av universalprimere MiFish-U-F/MiFish-U-R (A), Fish2bCBR/Fish2CBL (B), Fish2degCBL/ Fish2CBR (C) og L2513-F/H2714-R (D) testet på, fra venstre mot høyre, torske-DNA, sei-DNA, svartkutling-DNA, miljø-DNA og blank. Første spor i A og D, og siste spor i C er størrelsesstandard 60

Figur 21 Gelbilde av universalprimere Ac12s testet på, fra venstre mot høyre, torske-DNA, sei-DNA, svartkutling-DNA, miljø-DNA (stasjon 41) og blank (første spor er størrelsesstandard)..... 61

Figur 22 Gelbilde av universalprimere Ac12 testet på, fra venstre mot høyre, torske-DNA, miljø-DNA fra stasjon 3, 36, 41, 57, 60, 65, 66, mellomrom og blank. (første spor er størrelsesstandard)..... 61

Figur 23 Gelbilde av universalprimere Ac12s, med adaptore og indekser, mot fiske-DNA. Fra venstre til høyre: Størrelsesstandard. Forward primer med reversprimer 01 mot torsk, sei-, svartkutling-, bergnebb- og grønngylt-DNA og blankprøve. Forward primer med reversprimer 02 mot torsk-, sei- og svartkutling-DNA og blank. Forward primer med reversprimer 03 mot torsk-, sei- og svartkutling-DNA og blank. Forward primer med reversprimer 04 mot torsk-, sei- og svartkutling-DNA og blank. Størrelsesstandard..... 63

Oversikt over formler

Formel 1 Utregning av DNA-konsentrasjon i PCR-reaksjonen med fortynnet torsk- og svartkutling-DNA..... 42

Formel 2 Utregning av DNA-konsentrasjon i PCR-reaksjonen med fortynnet miljø-DNA.... 42

Vedlegg

Vedlegg I: Blue-white screening

Blue-white screening går ut på å bruke et plasmid som inneholder et fragment en *lacZ* gen, den bakre delen. Det delvise genet inneholder en serie av unike restriksjonssteder hvor en DNA-bit kan bli satt inn og klonet. Bakterien som skal ta opp plasmidet er *lacZ*, det vil si at det mangler den bakre delen av genet. Uten plasmidet kan bakterien ikke syntetisere β -galaktosidase. Hvis fremmed DNA ikke blir satt inn i det delvise *lacZ* genet til plasmidet, vil den fremre delen av genet (levert av plasmidet) og den bakre delen av genet (levert av bakterien) jobbe sammen i bakterie cellen for å produsere β -galaktosidase. Hvis fremmed DNA er satt inn i restriksjon setet vil dette forstyrre den fremre ender av *lacZ* gener og β -galaktosidase blir ikke produsert. Plasmidet inneholder somregel også selektive markører, ofte et gen som gir resistens mot antibiotika, som ampicillin. Bakteriene blir derfor lagt på et medium som inneholder ampicillin, slik at kun bakterier som har tatt opp et plasmid overlever. Noen av disse bakteriene vil inneholde et intakt plasmid, mens noen vil inneholde et rekombinant plasmid. For å skille mellom disse blir det strykt X-gal på mediumet, som produserer ett blått substans når spaltet. β -galaktosidase, produsert av bakterier med et intakt plasmid, vil spalte X-gal, og bakteriekoloniene blir blå. Bakteriekolonier med rekombinant plasmid vil forbli hvite da disse ikke kan produsere β -galaktosidase. De hvite koloniene kan så bli plukket ut og for å formere seg, og replikere det innsatte DNAet (Pierce, 2014).

Vedlegg II: Oppskrift AE-buffer

1. 50 mM Sodium acetate (pH 5.2)
2. 10 mM EDTA (pH 8.0)

Vedlegg III: Oppgitt mengde AE-buffer (μl) til artsspesifikke primere

Primer-navn	Forward-primer	Reverse-primer
Torsk 1	334 μl	236 μl
Torsk 2	311 μl	220 μl
Sei	321 μl	218 μl
Svartkutling	269 μl	104 μl
Bergnebb	299 μl	250 μl
Grønngylt	307 μl	246 μl

Vedlegg IV: Oppskrift på S.O.C medium (1000 ml)

1. 900 ml destillert vann (H_2O)
2. 20 g Bacto Tryptone
3. 5 g Bacto Yeast Extract
4. 2 ml 5M NaCl
5. 2.5 ml 1M KCl
6. 10 ml 1M MgCl_2
7. 10 ml 1M MgSO_4
8. 2 ml 1M glukose
9. Juster til 1 L med destillert vann
10. Steriliser i autoklav

Vedlegg V: Oppgitt mengde AE-buffer (μl) til universalprimere

Primer-navn	Forward-primer)	Reverse-primer
MiFish-U-F/ MiFish-U-R	223 μl	272 μl
Fish2bCBR/ Fish2CBL	220 μl	284 μl
Fish2CBR/ Fish2degCBL	193 μl	318 μl
L2513/ H2714	379 μl	376 μl
Ac12s-F/ Ac12s-R	349 μl	224 μl

Vedlegg VI: Oppskrift på 1 X TAE

For å lage 50 X TAE bland sammen:

1. 242 g Tris-base
2. 57.1 ml Acetate (100% acetic acid)
3. 100 ml 0,5M sodium EDTA
4. Destillert H₂O opptil en L.

For å lage 1 X TAE ta 20 ml av denne blanding og bland med 980 ml destillert H₂O.

Vedlegg VII: Oppskrift på 25 ml Loading dye (50% glyserol, bromphenol blått)

1. 6.25 g 25% ficoll
2. 1 ml 40 mM Tris pH 8
3. 2.5 ml 20 mM EDTA
4. 12.5 mg 0.05% BPB

