



OPTIMALISATIE DORPPOLDER

E-DNA ONDERZOEK NOORDSE WOELMUIS

Opdrachtgever:	Hoogheemraadschap van Delfland
Projectnr:	HHD015-001
Datum:	5 juli 2017

OPTIMALISATIE DORPPOLDER

E-DNA ONDERZOEK NOORDSE WOELMUIS

Opdrachtgever:	Hoogheemraadschap van Delfland
Projectnr:	HHD015-001
Rapportnr:	HHD015-FFDNA-Def01
Status:	Definitief
Datum:	5 juli 2017

T 088 - 33 66 333
F 088 - 33 66 099
E info@kragten.nl



© 2014 Kragten
Niets uit dit rapport mag worden veeleevoudigd en/of openbaar gemaakt door middel van druk, fotokopie, microfilm of op welke andere wijze dan ook zonder voorafgaande toestemming van Kragten. Het is tevens verboden informatie en kennis verwerkt in dit rapport ter beschikking te stellen aan derden of op andere wijze toe te passen dan waaraan in de overeenkomst toestemming wordt verleend.



VOORWOORD

Het onderliggende document beschrijft de resultaten van het e-DNA onderzoek ten behoeve van het project Optimalisatie Dorppolder. Het onderzoek heeft plaats gevonden ter plaatse van de Dorppolderweg, ten westen van Schipluiden (afbeelding 1). De monsternamen van het e-DNA is uitgevoerd op 22 juni 2017 door een werknemer van Datura en de ecooloog van Kragten.

Een uitgebreide beschrijving van het plangebied en effectbepaling ten aanzien van de overige aanwezige natuurwaarden is opgenomen in de rapportage van de veldinventarisatie flora en fauna¹.

Afbeelding 1: Ligging van het plangebied (rode lijn) (bron luchtfoto: Bing Kaarten).



¹ Janssen, R. (RJA), 2017. Optimalisatie Dorppolder, Veldinventarisatie flora en fauna en bomeninventarisatie. Rapportnummer: HHD015-FF-Def01. Kragten, 20 april 2017, 's Hertogenbosch.

DNA onderzoek naar noordse woelmuis



Colofon

Titel	DNA onderzoek naar noordse woelmuis
Tekst, foto's en samenstelling	K. van Bochove en J. Rook
In opdracht van	Bureau Kragten
Naam opdrachtgever	R. Janssen
Rapportnummer	RA2017242
Datum oplevering rapport	1 juli 2017
Aantal pagina's	7
Wijze van citeren	van Bochove K., Rook J. 2017. DNA onderzoek naar noordse woelmuis. Rapport RA2017242, Datura, Wageningen.
Laboratorium analist	J. Rook



Datura Molecular Solutions BV

Gevestigd te:
Johan Buziastraat 55
6708 NR Wageningen
Nederland

Postadres laboratorium:
t.a.v. Datura (NCB)
Sylviusweg 72
2333 BE, Leiden
Nederland

0031(0)629455328
keesvanbochove@datura.nl
www.datura.nl

Inhoudsopgave

1. Doelstelling.....	4
2. Methode.....	4
2.1 Sampling	4
2.2 Laboratorium analyse	4
2.3 Kwaliteitswaarborging	5
2.3.1 Hoe vals positieve waarnemingen voorkomen worden	5
2.3.2 Hoe vals negatieve waarnemingen voorkomen worden	6
3. Resultaten	7

1. Doelstelling

Vaststellen van de aan- of afwezigheid van DNA van noordse woelmuis (*Microtus oeconomus*) in keutels in opdracht van Bureau Kragten.

2. Methode

2.1 Sampling

De bemonstering is uitgevoerd door Bureau Kragten in samenwerking met Datura.

2.2 Laboratorium analyse

De uitwerpselen zijn geanalyseerd op de aanwezigheid van DNA van noordse woelmuis. Het analyseren van een keutel vindt plaats in drie stappen. Eerst wordt het DNA uit te keutel geconcentreerd en gezuiverd. Vervolgens wordt een controle analyse uitgevoerd om te testen of DNA detectie in een sample eventueel geïnhibereerd wordt door storende stoffen. Tenslotte wordt het DNA gedetecteerd met behulp van een real-time quantitative PCR.

1. Het DNA is geëxtraheerd met behulp van de QIAamp DNA stool mini kit van Qiagen. Gedurende de extractie wordt de keutel opgelost waardoor DNA vrij komt. Storende stoffen als humuszuren kunnen detectie van het DNA inhiberen wat kan leiden tot vals negatief resultaat. Gedurende de extractie zijn deze inhiberende stoffen zo veel mogelijk verwijderd.
2. Er is een controle uitgevoerd om na te gaan of DNA detectie in een sample geïnhibereerd wordt. Dit is gedaan door een bekende hoeveelheid van een fragment artificieel DNA toe te voegen. Vervolgens is de concentratie van dit fragment artificieel DNA gemeten. Dit is zowel gedaan in een reactie waar een hoeveelheid sample aan toegevoegd is, als in een reactie waar geen sample aan toegevoegd is. Als DNA detectie in een sample geïnhibereerd wordt, dan is de gemeten concentratie artificieel DNA in de reactie waarin sample toegevoegd wordt lager ten opzichte van de reactie waaraan geen artificieel DNA toegevoegd is.
3. Detectie van DNA uit keutels vindt plaats door middel van een real-time kwantitatieve PCR (qPCR). Het principe achter deze techniek is dat een specifiek deel van het DNA zeer vaak vermenigvuldigd (geamplificeerd) wordt. Datura maakt gebruik van soort-specifieke primers die uitsluitend DNA van de doelsoort vermenigvuldigen. Bovendien wordt een soort-specifieke probe gebruikt (een soort primer) die uitsluitend bindt aan DNA van de doelsoort. Binding van de probe aan het vermenigvuldigde DNA van de doelsoort veroorzaakt een fluorescent signaal. Dit signaal wordt gedetecteerd met behulp van een qPCR platform (CFX96 TouchTM van Bio-Rad). De qPCR detectie wordt uitgevoerd met 2 replica's. De qPCR detectie wordt uitgevoerd met de TaqMan[®] Environmental Mastermix 2.0 (Life Technologies[®]). Naast het DNA sample worden qPCR reacties uitgevoerd waaraan geen sample is toegevoegd. Deze moeten negatief zijn. Zodoende kan bevestigd worden dat de analyse schoon is uitgevoerd en er geen contaminatie optreedt. Tenslotte worden ook enkele reacties geanalyseerd waaraan een bekende concentratie DNA is toegevoegd. Deze reacties moeten positief zijn. Dit bevestigt dat de analyse juist is uitgevoerd.

2.3 Kwaliteitswaarborging

2.3.1 Hoe vals positieve waarnemingen voorkomen worden

Het optreden van zowel vals positieve als vals negatieve waarnemingen wordt tot het minimum beperkt. Vals positieve waarnemingen kunnen op drie manieren ontstaan:

- De gebruikte primers en de probe zijn niet specifiek;
- Er vindt contaminatie plaats in het laboratorium;
- Er vindt contaminatie plaats in het veld.

Hieronder wordt aangegeven hoe vals positieve waarnemingen voorkomen worden. Omdat de kans op vals positieve waarnemingen zeer klein is, kunnen we niet exact kwantificeren hoe groot de kans daadwerkelijk is. Datura kan daarom niet 100 % zeker garanderen dat vals positieve waarnemingen nooit optreden. In de praktijk (middels validatie studies) nemen we echter geen vals positieve waarnemingen waar. Het is daarom aannemelijk dat vals positieve waarnemingen niet optreden.

Het voorkomen van vals positieve waarnemingen door het ontwerp en validatie van specifieke primers en probes:

1. Er wordt gebruik gemaakt van een **2-staps** qPCR protocol, hetgeen de kans op aspecifieke detectie verkleint;
2. Gebruik van zeer **specifieke primers** waarmee uitsluitend eDNA van de doelsoort gedetecteerd kan worden. De primers zijn ontwikkeld met behulp van specialistische software;
3. Een qPCR detectie wordt uitgevoerd met behulp van een zeer specifieke **probe**. Deze probe hecht uitsluitend aan DNA van de doelsoort, hetgeen resulteert in een fluorescent signaal;
4. De primers en de probe zijn in het laboratorium getest. Eerst is getest of de qPCR detectie inderdaad negatief resultaat geeft na het toevoegen van DNA van (verwante) soorten;
5. Vervolgens is de methode **gevalideerd** door het testen van veldsamples. Er zijn eDNA samples verzameld op locaties waar de doelsoort niet voorkomt. Er werd geen eDNA gedetecteerd in deze samples. Zodoende kon aangetoond worden dat de methode niet resulteert in positieve detectie als de doelsoort niet aanwezig is.

Om vals positieve waarnemingen te voorkomen werkt Datura in een specifiek voor (e)DNA ingericht laboratorium omgeving en worden strikte procedures gevolgd:

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

Om contaminatie in het veld te voorkomen worden de volgende maatregelen genomen:

Het **sampling protocol** van Datura wordt gevolgd. Dit protocol schrijft een specifieke werkwijze voor. In de praktijk is gebleken dat er geen contaminatie plaats vindt als dit protocol gevolgd wordt;

2.3.2 Hoe vals negatieve waarnemingen voorkomen worden

Naast vals positieve waarnemingen kunnen ook vals negatieve waarnemingen optreden.

1. Een zeer gevoelige **qPCR detectie** wordt uitgevoerd met behulp van 2 replica's;
2. Gebruik van een **zeer korte merker** van maximaal 120 basepaar;
3. Van ieder sample wordt **vastgesteld of de qPCR detectie geïnhibeerd** wordt door storende stoffen. Indien dit het geval is wordt er een **extra zuiveringstap** uitgevoerd. Vervolgens wordt nogmaals getest of er inderdaad geen inhibitie meer optreedt (zie methode voor een uitgebreidere beschrijving);
4. Er wordt altijd een **positieve controle** reactie van doelsoort DNA meegenomen in de qPCR detectie. Deze controle reactie moet altijd resulteren in positieve detectie. Ook als alle samples negatief zijn, kan zodoende vastgesteld worden dat de detectie juist is uitgevoerd.

3. Resultaten

In geen van de samples is DNA van noordse woelmuis aangetroffen.

Er is geen amplificatie waargenomen in de negatieve controle reacties waar geen sample aan toe gevoegd is. De positieve controle reacties waar DNA uit weefsel van de noordse woelmuis aan toegevoegd is werd wel naar verwachting geamplificeerd. Dit geeft aan dat de analyse juist is uitgevoerd.

Humuszuren kunnen een qPCR reactie inhiberen wat kan leiden tot vals negatief resultaat. Daarom wordt altijd een interne controle mee geanalyseerd om vast te stellen of er sprake is van inhibitie. Er werd geen significante afwijking gevonden in de Cq-waarde van de interne controles waar een sample aan toegevoegd is ten opzichte van de reacties waar geen sample aan toegevoegd is. Er was in dit geval dan ook geen sprake van inhibitie.

Samenvattend, de DNA analyses zijn met succes uitgevoerd. In geen van de samples is DNA van noordse woelmuis aangetoond.

Tabel 1. Resultaten van de DNA analyse.

Sample nummer	Beschrijving	Aantal positieve reacties noordse woelmuis
4041	Keutelhoopje: 80.2146; 443.8211	0/2
4045	Losse keutel in gangetje: 79.8220; 443.6488	0/2
4235	Keutelhoopje: 80.3412; 443.9202	0/2