**Vides DNS metodikas apraksts zivju, vēžu un nēģu monitoringā**

*Saskaņā ar līgumu Nr. 7.7/286/2019*

***Ūdens paraugu ņemšanas vietas izvēle***

Vides DNS nav vienmērīgi izplatīta visā ūdenstilpē, tāpēc parauga ievākšanas vieta ir svarīgs faktors zivju sugu DNS noteikšanai. Zināšanas par sugu ekoloģiju var tikt izmantotas, lai ievāktu ūdens paraugus no vietām, kur šī suga uzturas. Ja ir iespējams, vislabāk paraugus ievākt straumē. Visos gadījumos ūdens paraugi ir jāvāc pret straumi, lai netiktu ienesta kontaminācija no zābakiem, laivas vai cita paraugu ņemšanas aprīkojuma. Paraugi jāsāk ievākt vietā, kas atrodas vistālāk lejup pa straumi, un nākamie paraugi jāņem secīgi, pārvietojoties augšup (Goldberg and Strickler, 2017).

***Ūdens paraugu ievākšana***

Ūdens paraugus ievāc tīrās plastmasas pudelēs, piemēram0,5 l tilpuma polipropilēna pudelēs ar plašu atvērumu (FisherSci kat. Nr. 11987924).

Parauga ņemšana vēlākai filtrēšanai laboratorijā.

1. Paraugus ievācot, jāizmanto vienreizlietojamie cimdi, lai samazinātu parauga piesārņošanās risku ar svešu DNS. Katrai parauga ņemšanas pudelei uz vāciņa uzraksta ievākšanas datumu, vietu un laiku, cikos paraugs tiek ievākts.
2. Pirms ūdens parauga ņemšanas trīs reizes izskalo paraugu ņemšanas pudeli ar ūdeni no paraugu ņemšanas vietas, katru reizi uzliekot vāku un kārtīgi sakratot. Skalošanas ūdeni izlej lejup pa straumi, pēc iespējas tālāk no vietas, kur tiks ievākts testējamais ūdens paraugs.
3. Piepilda paraugu ņemšanas pudeli ar ūdeni tā, lai tas būtu pēc iespējas tālāk prom no vietas, kur tika veikta pudeles skalošana. Jāizvairās no sedimentu vai nogulumu ieplūšanas pudelē.
4. Katrā paraugu ņemšanas vietā iesmeļ 4 pudeles pa 0,5 L (2 pudeles uz 0,7 µm filtra, 2 pudeles uz 1,2 µm filtra). Uz vienu filtru 1 L ūdens (2 pudeles = 2 filtri). Pudeles maksimāli glabā aukstumā līdz filtrēšanai.
5. Stingri aizskrūvē pudeli un ievieto aukstuma kastē.
6. Filtrē pēc iespējas ātrāk (24 stundu laikā), izmantojot tālāk aprakstīto metodiku. Ūdens paraugi tiek uzglabāti ledusskapī vai pēc iespējas vēsākā vietā līdz filtrēšanai.

***Ūdens paraugu filtrēšana***

1. Filtrēšanai izmanto vakuuma sūkni kopā ar saderīgu filtrēšanas sistēmu un membrānfiltriem (poru izmērs 0.7 µm un 1.2 µm), piemēram, Millipore Microfil filtrēšanas galva ar šī paša ražotāja vienreizējas lietošanas piltuvēm un filtriem.
2. Vienas paraugu ņemšanas vietas paraugiem var izmantot to pašu filtrēšanas piltuvi. Starp dažādas izcelsmes paraugiem piltuves atkārtoti neizmanto, lai izvairītos no kontaminācijas.
3. Apdedzina filtrēšanas galvas, filtra adapteri (ko liek zem filtra), pincetes galus pirms un pēc katra parauga (pinceti var arī tīrīt ar 1% nātrija hipohlorītu un 70% spirtu).
4. Ar notīrītu vai apdedzinātu pinceti no iepakojuma izņem filtru un novieto uz filtrēšanas galvas ar rūtiņām uz augšu.
5. Uzliek pa virsu jaunu piltuvi (var izmantot lietotu tikai tad, ja filtrē ūdeni no tās pašas vietas).
6. Ieslēdz vakuuma sūkni, saskalo pudeli, ielej piltuvē līdz 250 ml atzīmei ūdeni.
7. Papildina ūdeni piltuvē, līdz viss pudeles saturs ir izfiltrēts.
8. Izslēdz vakuuma sūkni, uzmanīgi noņem piltuvi (iekšējās malās vēl būs ūdens, kas var izlīt).
9. Ar divām tīrām pincetēm sarullē filtru un ieliek to 15 ml stobriņā, uzraksta virsū parauga datus un filtrēšanas parametrus (poru izmērs, izfiltrētais tilpums).
10. Noslauka filtrēšanas galvu ar 96% spirtu un aizdedzina, notīra arī pincetes un filtra adapteri, izmazgā vakuuma kolbu, dekontaminē darba vietu.
11. Stobriņus ar filtriem var ilgstoši uzglabāt -20 °C temperatūrā.

***DNS izdalīšana no filtriem***

DNS izdalīšanai no filtriem izmanto DNeasy® PowerWater® reaģentu komplektu (Qiagen) vai līdzvērtīgu. Cita ražotāja DNS izdalīšanas reaģentiem var atšķirties lietošanas instrukcija.

Svarīgi punkti pirms sākuma:

* Šķīdums PW1 jāsasilda 55°C 5–10 minūtes, lai izšķīdinātu nogulsnes.
* Ja šķīdums PW3 ir nogulsnējies, karsēt 55°C temperatūrā 5–10 minūtes, lai izšķīdinātu nogulsnes.
* Pirms lietošanas PW4 kārtīgi jāsakrata.
* Visas centrifugēšanas darbības tiek veiktas istabas temperatūrā (15–25°C).

1. Izmantojot divas sterilas pincetes, paņem balto filtra membrānu pretējās malās un saritina filtru cilindrā ar augšējo pusi uz iekšu.
2. Ievieto filtru 5 ml PowerWater DNA Bead Tube stobriņā.
3. Pievieno 1 ml šķīduma PW1.
4. Nostiprina cauruli horizontāli pie “vortex” tipa maisītāja un krata 30 minūtes ar ātrumu 1500 rpm. Kratīšanas ilgums un ātrums atkarīgs no maisītāja tehniskajiem parametriem.
5. Pārnes supernatantu uz tīru 2 ml stobriņu. Sagaidāms, ka iegūs 600–650µl supernatanta.
6. Stobriņu ar supernatantu centrifugē ar ātrumu 13 000 x g 1 min.
7. Izvairoties no lodīšu piejaukuma, pārnes supernatantu uz tīru 2 ml stobriņu.
8. Pievieno 200 µl Solution IRS, samaisa, izmantojot vorteksu.
9. Inkubē 2–8°C 5 minūtes.
10. Centrifugē stobriņus ar ātrumu 13 000 x g 1 min.
11. Pārnes supernatantu uz tīru 2 ml stobriņu.
12. Pievieno 650 µl šķīduma PW3 un īsi samaisīa ar vorteksu.
13. Pārnes 650 µl supernatanta uz MB kolonnas. Centrifugē ar 13 000 x g 1 min. Izlej ārā izfiltrēto supernatantu. Atkārto, līdz viss supernatants ir apstrādāts.
14. Ievieto MB kolonnas filtru tīrā 2 ml savākšanas mēģenē.
15. Pievieno 650 µl šķīduma PW4 (pirms lietošanas sakratīt). Centrifugē ar ātrumu 13 000 x g 1 minūti.
16. Izlej izfiltrēto šķidrumu un pievieno 650 µl etanola un centrifugē pie 13 000 x g 1 min.
17. Izlej izfiltrēto šķidrumu un vēlreiz centrifugē ar ātrumu 13 000 x g 2 minūtes.
18. Ievieto MB kolonnu tīrā 2 ml stobriņā.
19. Pievieno 100 µl šķīduma EB.
20. Centrifugē pie 13 000 x g 1 min.
21. Izmet MB kolonnu.
22. DNS līdz turpmākajām analīzēm tiek uzglabāta sasaldēta (–90°C līdz –15°C).

***Reālā laika PĶR konkrētu sugu klātbūtnes noteikšanai***

Katras mērķa sugas DNS klātbūtni filtrētajos ūdens apraugos nosaka ar reālā laika polimerāzes ķēdes reakciju (rlPĶR), kas izmanto sugai specifiskus praimerus un fluorescentu zondi, mērķētus uz citohroma oksidāzes (*COI*) gēnu (1. tabula).

**1. tabula.** Zivju un vēžu sugu vides DNS monitoringa rlPĶR praimeri un zondes.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Suga** | **Avots** | **Praimeri, zondes** | **Praimeru/zonžu\* sekvences** | **Amplikons**  **bp** |
| Platspīļu  upesvēzis | Agersnap  et al.,  2017 | Astast\_COI\_F0336 | GATTAGAGGAATAGTAGAGAG | 65 |
| Astast\_COI\_R0397 | CTGATGCTAAAGGGGGATAA |
| Astast\_COI\_P0357 | FAM-AGGAGTAGGGACAGGATGAACT-BHQ-1 |
| Amerikas  signālvēzis | Agersnap  et al.,  2017 | Paclen\_COI\_F0336 | AACTAGAGGAATAGTTGAAAG | 65 |
| Paclen\_COI\_R0397 | CCGCTGCTAGAGGAGGATAA |
| Paclen\_COI\_P0357 | FAM-AGGAGTGGGTACTGGATGAACT-BHQ-1 |
| Dzeloņvaigu  vēzis | Mauvisseau  et al.,  2018 | Paclen\_COI\_F0336 | CCTCCTCTCGCTTCTGCAAT | 78 |
| Paclen\_COI\_R0397 | AACCCCTGCTAAATGCAACG |
| Paclen\_COI\_P0357 | FAM-CTCATGCAGGGGCATCAGTGG-BHQ-1 |
| Kaze | BIOR,  2021 | Pel-cul-COI-fw  Pel-cul-COI-rev  Pel-cul-COI-pr | AATGATCGGAGCACCCGATA  TACACTGTTCACCCTGTT  FAM-ATTAGCCTCCTCTGGTGTCG-BHQ1 | 132 |
| Rotans | Roy  et al.,  2017 | Paclen\_COI\_F0336 | CTTTTGACTTCTTCCTCCTTCACTA | 87 |
| Paclen\_COI\_R0397 | GGATAAACAGTTCAACCTGTACCC |
| Paclen\_COI\_P0357 | FAM-ACTCTTATCCTCCTCAGGAG-BHQ1 |
| Pīkste | Brys  et al.,  2020 | Paclen\_COI\_F0336 | CCCCCGACATAGCATTTCCG | 119 |
| Paclen\_COI\_R0397 | AACTGTTCAGCCTGTCCCAG |
| Paclen\_COI\_P0357 | FAM-CTCGTTCCTCCTTCTGCTGG-BHQ1 |
| Alata | BIOR,  2021 | Paclen\_COI\_F0336 | AATTATGATCGGCGGGTT | 123 |
| Paclen\_COI\_R0397 | AAGAGAAGAAGAAAGGACGGG |
| Paclen\_COI\_P0357 | FAM-ATGATTGGTGCCCCTGACAT-BHQ1 |
| Ziemeļu  zeltainais  akmeņgrauzis | BIOR,  2021 | Paclen\_COI\_F0336 | GACTATTTTCTCCCTGCACTTA | 73 |
| Paclen\_COI\_R0397 | GATTGTCGTGGTAATAAAGTTGATG |
| Paclen\_COI\_P0357 | FAM-CCGGTGTCTCATCCATCCTA-BHQ1 |
| Salate | BIOR,  2021 | Paclen\_COI\_F0336 | AAACACCCCTCTTTGTATGA | 114 |
| Paclen\_COI\_R0397 | TAGTGTTGAGATTACGATCTGTA |
| Paclen\_COI\_P0357 | FAM-TAGCTGCCGGAATTACAATGC-BHQ1 |
| \* Visām zondēm pievienota fluorescentā iezīme FAM (karboksifluoresceīns) un BHQ-1 (angļu val. *Black Hole Quencher-1*) nefluorescentais dzēsējs. | | | | |

Kā PĶR reaģentu izmanto Luminaris Color Probe Low ROX qPCR Master Mix gatavo divkārtīgo reakcijas maisījumu (ThermoFisher Scientific kat. nr.) vai līdzvērtīgu. Otrajā tabulā dots reakcijas maisījuma pagatavošanas paraugs. Katra reaģenta nepieciešamo tilpumu aprēķina, reizinot paraugu skaitu ar vienam paraugam nepieciešamo tilpumu. Reakciju skaitā ierēķina arī pozitīvo un negatīvo kontroles. Kā pozitīvo kontroli var izmantot no konkrētās sugas audiem izdalītu DNS vai atšķaidītu konvencionālās PĶR produktu. Kā negatīvo kontroli var izmantot no DNS un no nukleāzēm brīvu destilētu ūdeni, bet ieteicams ir izmantot DNS, kas izdalīta no filtra, caur kuru filtrēts destilēts ūdens. Paraugu skaitam pievieno apmēram 10% rezervi, lai nodrošinātos, ka pipetēšanas kļūdu un neprecizitātes dēļ nepietrūks maisījuma visiem paraugiem.

**2. tabula.** Reakcijas maisījuma pagatavošanas paraugs.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Reaģents/viela** | **Izejas**  **koncentrācija** | **Koncentrācija**  **vienā reakcijā** | **Tilpums vienā**  **reakcijā (µl)** |
| PĶR piemērots H2O |  |  | 2 |
| Luminaris Color Probe Low ROX qPCR Master Mix (2x) | 2x | 1x | 10 |
| F praimeris | 6-24 µM\* | 0,3-1,2 µM\* | 1 |
| R praimeris | 6-24 µM\* | 0,3-1,2 µM\* | 1 |
| Zonde | 4 µM | 0,2 µM | 1 |
| Kopā (µl): |  |  | 15 |
| DNS (µl): |  |  | 5 |

\*katrai sugai optimālo praimeru koncentrāciju skatīt 3. tabulā

Katrai mērķa sugai tika individuāli noteikta optimālā praimeru un zondes koncentrācija, kas jāņem vērā reakcijas maisījuma pagatavošanā (3. tabula).

**3. tabula.** Reālā laika PĶR praimeru un zondes koncentrācijas.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Suga** | **Praimeri un zondes** | **Koncentrācija (µM)** | |
| **Praimeri** | **Zonde** |
| Platspīļu upesvēzis | Astast\_COI\_F0336, Astast\_COI\_R0397, Astast\_COI\_P0357 | 1,2 | 0,2 |
| Amerikas signālvēzis | Paclen\_COI\_F0336, Paclen\_COI\_R0397, Paclen\_COI\_P0357 | 1,2 | 0,2 |
| Dzeloņvaigu vēzis | CO1-Ol-01-F, CO1-Ol-01-R, CO1-Ol-01-Probe | 1,2 | 0,2 |
| Kaze | Pel-cul-COI-Fw, Pel-cul-COI-Rev, Pel-cul-COI-pr | 0,9 | 0,2 |
| Rotans | Per-gle-279F, Per-gle-365R, Per-gle-Pr309F | 0,6 | 0,2 |
| Pīkste | Mf-COI-F, Mf-COI-R, Mf-COI-P | 0,3 | 0,2 |
| Alata | Thy-thy-COI-fw, Thy-thy-COI-rev, Thy-thy-COI-pr | 0,3 | 0,2 |
| Ziemeļu zeltainais akmeņgrauzis | Sab-balt-COI-fw, Sab-balt-COI-rev, Sab-balt-COI-pr | 0,3 | 0,2 |
| Salate | Leu-asp-COI-fw, Leu-asp-COI-rev, Leu-asp-COI-pr | 0,3 | 0,2 |

Reakcijas maisījuma pagatavošana jāveic atsevišķā telpā vai zonā, kas ir atdalīta no telpām vai zonām, kurās veic DNS izdalīšanas un elektroforēzes darbības. Tas nepieciešams, lai samazinātu kontaminācijas un viltus pozitīvu rezultātu risku. Pagatavoto rlPĶR reakcijas maisījumu sadala optiskajos stobriņos vai 96 bedrīšu optiskās plates bedrītēs, tad nogādā uz DNS izdalīšanas zonu, kur pievieno 2. tabulā norādīto DNS tilpumu. Stobriņus vai plati aizvāko, nocentrifugē, lai atbrīvotos no burbuļiem, un ievieto rlPĶR iekārtā, piemēram, QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems™) vai ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™). Visām sugām reakcijas apstākļi jāiestata atbilstoši Luminaris reaģenta protokolā ieteiktajiem: 50°C 2 min // 95°C 10 min // 50 cikli: 95°C 15 sec, 60°C 1 min // 60°C 30 sec, vienīgi salatei 60°C vietā izmanto 62°C temperatūru, lai palielinātu reakcijas specifiskumu.

Reakcijas beigās novērtē iegūtās amplifikācijas līknes. Pirmkārt, jāpārliecinās, ka ir amplificējusies pozitīvā kontrole un ka nav amplificējusies negatīvā kontrole, kas attiecīgi ļauj pārliecināties, ka nav gaidāmi viltus negatīvi vai viltus pozitīvi rezultāti. Paraugs uzskatāms par pozitīvu (filtrētā ūdens paraugā konstatēta konkrētās sugas DNS klātbūtne), ja amplifikācijas līknei ir eksponenciāli augoša forma un ja tā šķērso sliekšņa fluorescences līmeni līdz ciklam, kas norādīts 4. tabulas LOD Ct kolonnā.

**4. tabula.** Mērķa sugu rlPĶR LOD (detekcijas limits).

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Suga** | **LOD**  **kopijas/reakcijā** | **LOD Ct**  **vidējā vērtība** |
|
| Platspīļu upesvēzis | 0,1 | 40,17 |
| Amerikas signālvēzis | 1 | 43,13 |
| Dzeloņvaigu vēzis | 1 | 34,93 |
| Kaze | 0,1 | 36,43 |
| Rotans | 1 | 38,93 |
| Pīkste | 1 | 35,94 |
| Alata | 0,1 | 36,23 |
| Ziemeļu zeltainais akmeņgrauzis | 1 | 36,01 |
| Salate (62 °C) | 1 | 39,01 |

Izmantotā literatūra:

Agersnap S, Larsen WB, Knudsen SW, Strand D, Thomsen PF, Hesselsøe M, Mortensen PB, Vrålstad T, Møller PR. Monitoring of noble, signal and narrow-clawed crayfish using environmental DNA from freshwater samples. PLoS One. 2017 Jun 27;12(6):e0179261.

Brys R, Halfmaerten D, Neyrinck S, Mauvisseau Q, Auwerx J, Sweet M, Mergeay J. Reliable eDNA detection and quantification of the European weather loach (Misgurnus fossilis). J Fish Biol. 2021 Feb;98(2):399-414.

Goldberg C., Strickler K. eDNA protocol sample collection. Washington State University. 2017. 2-8.

Mauvisseau Q, Coignet A, Delaunay C, Pinet F, Bouchon D, Souty-Grosset C. Environmental DNA as an efficient tool for detecting invasive crayfishes in freshwater ponds. Hydrobiologia. 2018, 805: 163-175.

Roy M, Belliveau V, Mandrak NE, Gagné N. Development of environmental DNA (eDNA) methods for detecting high-risk freshwater fishes in live trade in Canada. Biol Invasions. 2018, 20:299-314.