



DNA på FORKANT

Velkommen til DNAlab

STATENS
NATURHISTORISKE
MUSEUM

novo nordisk
foundation



Program kl. 09:00–15:30

Tid	Tidsforbrug	Aktivitet
09:00	15 min	Velkomst og praktisk introduktion til lokaler.
09:15	45 min	Rengøring + Pipettetræning .
10:00	60 min	DNA-ekstraktion af miljøDNA-prøve (8 grupper) . Efterfulgt af min. 60 min. inkubation.
11:00	10 min	Pause
11:10	5 min	Rengøring.
11:15	30 min	Opsætning af qPCR-analyser (24 analyser). Stilles på køl efter forberedelse.
11:45	5 min	Rengøring.
11:50	45 min	DNA-ekstraktion af miljøDNA-prøve (fortsat).
12:35	10 min	Måling af DNA-koncentration . (kan forberedes tidligere)
12:45	15 min	Opsætning af qPCR-analyser (fortsat). MiljøDNA-prøve tilsættes til qPCR-analyser.
13:00	130 min	qPCR-analyse analyseres vha. AriaMx-maskine i 2 timer og 5 minutter.
		Frokostpause
		Aktivitet valgt af lærer
		Pause
		Oprydning i laboratoriet
15:10	15 min	AriaMx-maskine er færdig. Hent resultater fra qPCR-analyse
15:25	5 min	Afslutning og farvel

Det er vigtigt at:

- Overholde tidsplanen.
- Alle grupper følges ad i protokollen.
- I aftaler hvornår pauser begynder og slutter

Forslag til gruppeinddeling

Ekstraktion af filter 1, nr: DL20xx_ _ _	qPCR-analysenr.	Elevnavne i gruppen
Gruppe 1	1, 9, 17	
Gruppe 2	2, 10, 18	
Gruppe 3	3, 11, 19	
Gruppe 4	4, 12, 20	
DNA-koncentration (ng/μL):		

Ekstraktion af filter 2, nr: DL20xx_ _ _	qPCR-analysenr.	Elevnavne i gruppen
Gruppe 5	5, 13, 21	
Gruppe 6	6, 14, 22	
Gruppe 7	7, 15, 23	
Gruppe 8	8, 16, 24	
DNA-koncentration (ng/μL):		

Forslag til opgavefordeling

Klassen har fælles ansvar for at I komme bedst i mål med laboratoriearbejdet.

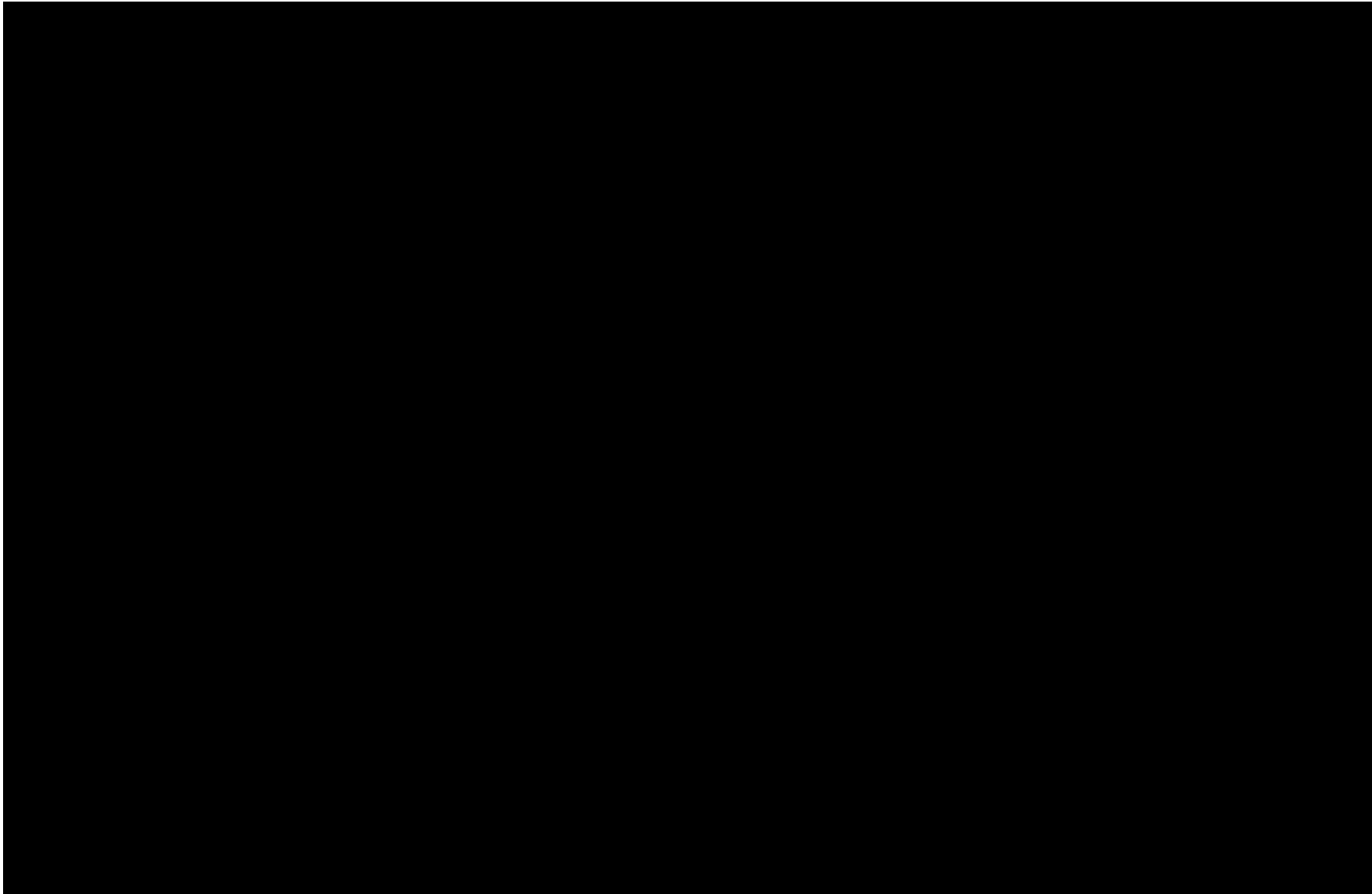
I kan evt. fordele følgende opgaver imellem jer:

1. Tidsansvarlig – sørger for at klassen holder tiden og for at klassen kommer tilbage fra pauserne.
2. Reagensansvarlig ved DNA-ekstraktion – sørger for at uddele reagenser til grupperne under ekstraktionen.
3. Reagensansvarlig ved qPCR-analyse – sørger for at uddele reagenser til grupperne under qPCR-analysen.
4. Ansvarlig for opskæring af filter 1.
5. Ansvarlig for opskæring af filter 2.
6. Ansvarlig for måling af DNA-koncentration for begge miljøDNA-prøver.
7. Ansvarlig for miljøDNA-prøven der udvælges til qPCR-analyse. Sørger for at den bliver fortyndet, og at alle grupper efterfølgende får samme miljøDNA til deres qPCR-analyser.
8. Ansvarlig for at begge miljøDNA-prøver bliver opbevaret på frys, med korrekt prøvenummer, ved dagens afslutning.
9. Ansvarlig for qPCR-maskinen – opsætning af filer og starte maskinen (kan evt. være læreren).

Rengøring

1. Ifør dig kittel og engangshandsker.
2. Rengør alle overflader og pipetter med 5% klor.
3. Rengør efterfølgende alle overflader og pipetter med 70% ethanol.

Pipettetræning



Afspil video:

1. Tryk på firkant med video.
2. Eller brug dette link:

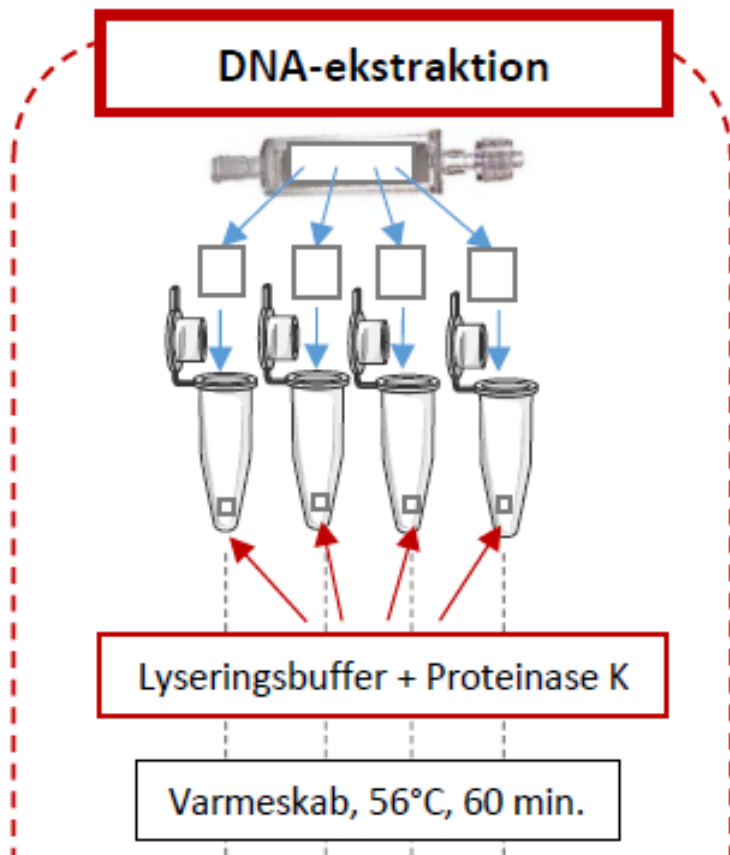
https://www.youtube.com/watch?v=kUgWmtv4VYo&list=PL_6anAeCkXYj54297f_-AEE2ylyq8yNaz&index=3

OBS!: Brug et bærgerglas med postevand til hvert bord istedet for at tage vand fra et Eppendorf-rør.

Materialer:

Klor (5%)
Ethanol (70%)
Køkkenrulle
Pipetter
Pipettespidser
Bærgerglas med vand
1,5 ml rør (tomme)
Rør-holder (grå)

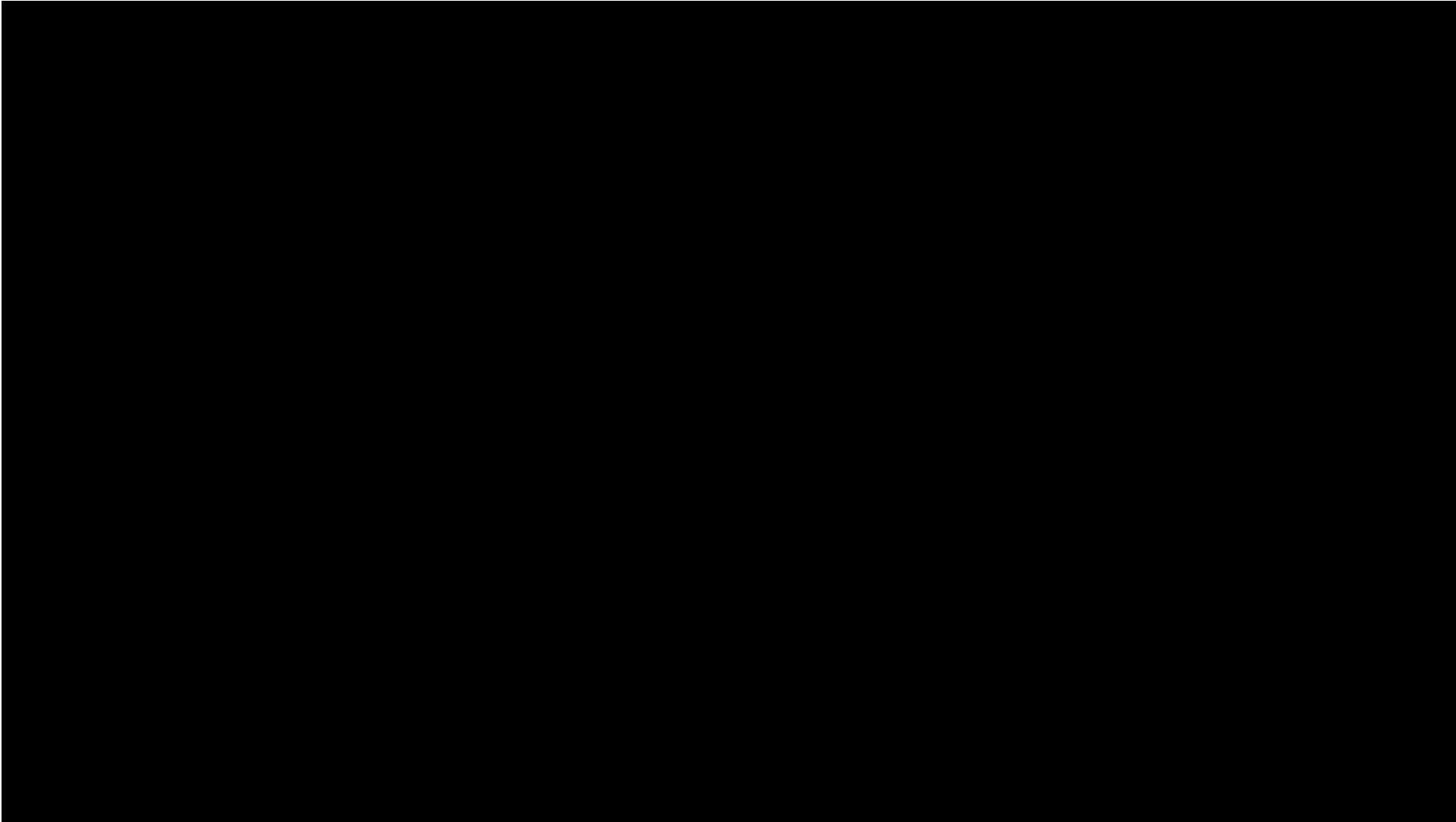
DNA-ekstraktion af miljøDNA-prøve



Hvert sterivex-filter (miljøDNA-prøve) åbnes, og hver filtermembran opdeles i 4 stykker.

Der udføres identiske DNA-ekstraktioner for hvert membran-stykke.

Åbning af Sterivex-filter

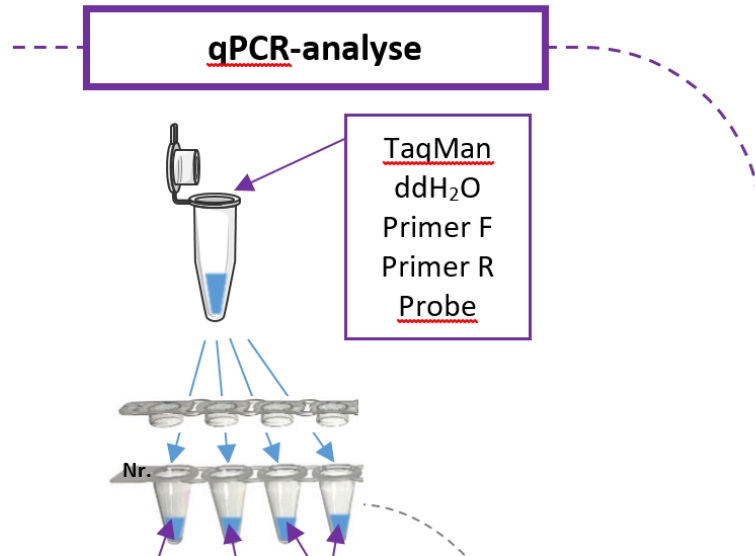


Afspil video:

1. Tryk på firkant med video.
2. Eller brug dette link:

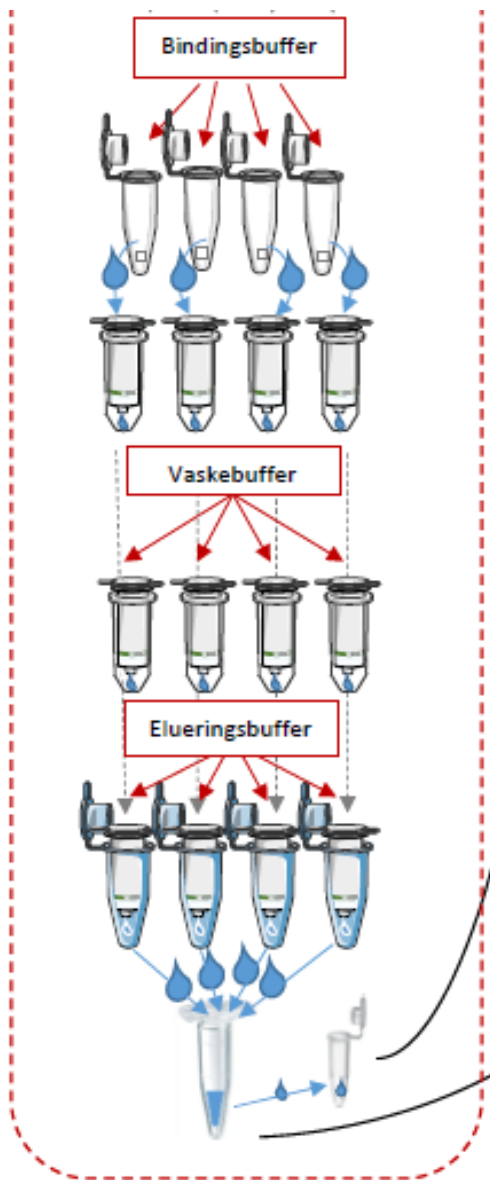
https://www.youtube.com/watch?v=ufWPuR50I10&list=PL_6anAeCkXYj54297f_-AEE2ylyq8yNaz&index=4

Opsætning af qPCR-analyser



Der laves mastermix til 24 qPCR-analyser med 12 forskellige arter. Mastermix består af TaqMan, ddH₂O og artsspecifikke primers og probe. Mixen fordeles i PCR-rør. Alle 24 analyser opbevares på køl indtil videre brug.

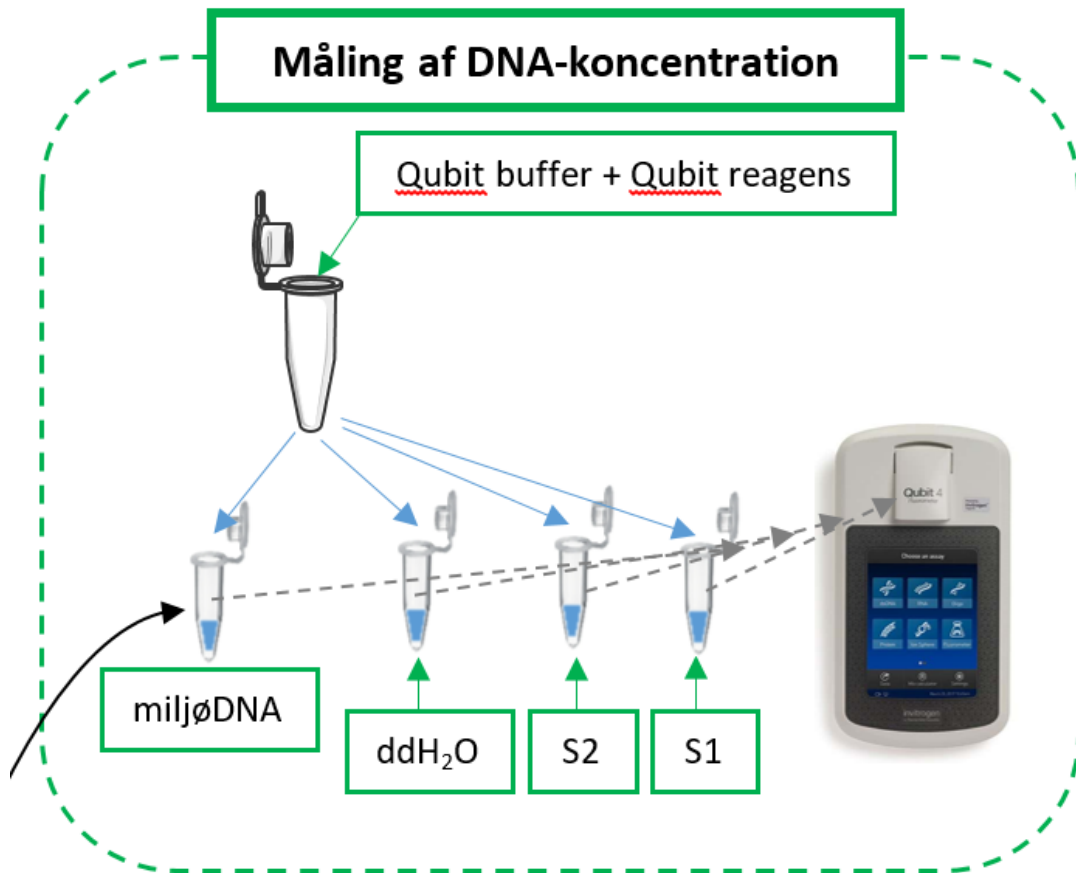
DNA-ekstraktion af miljøDNA-prøve



Der fortsættes med udførelse af fire identiske DNA-ekstraktioner for hver miljøDNA-prøve, som til sidst samles igen i én færdig-ekstraheret prøve.

Inden fortyndning udtages 10 μL af hver miljøDNA-prøve til koncentrationsmåling.

Koncentrationsmåling af miljøDNA



Der måles DNA-koncentration på de 10 μ L udtaget fra hver miljøDNA-prøve vha. Qubit-protokollen.

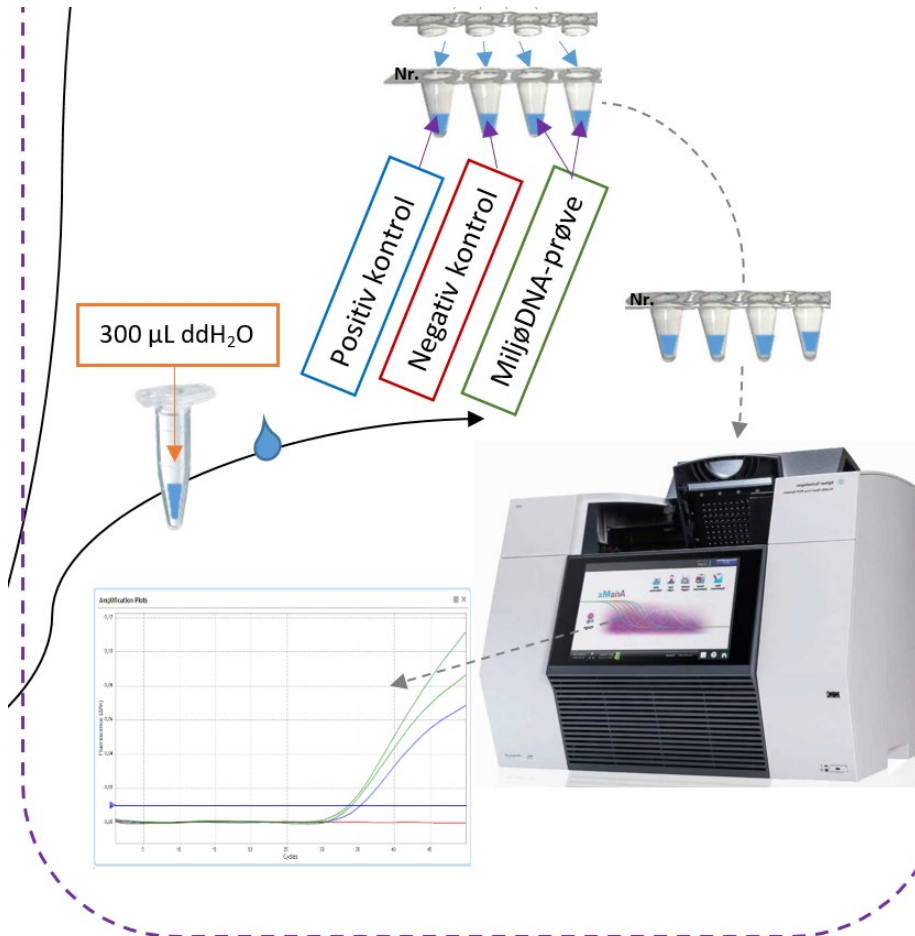
Koncentrationsmåling af miljøDNA

Afspil video:

1. Tryk på firkant med video.
2. Eller brug dette link:

https://www.youtube.com/watch?v=HLtxkgClr9A&list=PL_6anAeCkXYj54297f_-AEE2ylyq8yNaz&index=5

Opsætning af real-time PCR-analyser

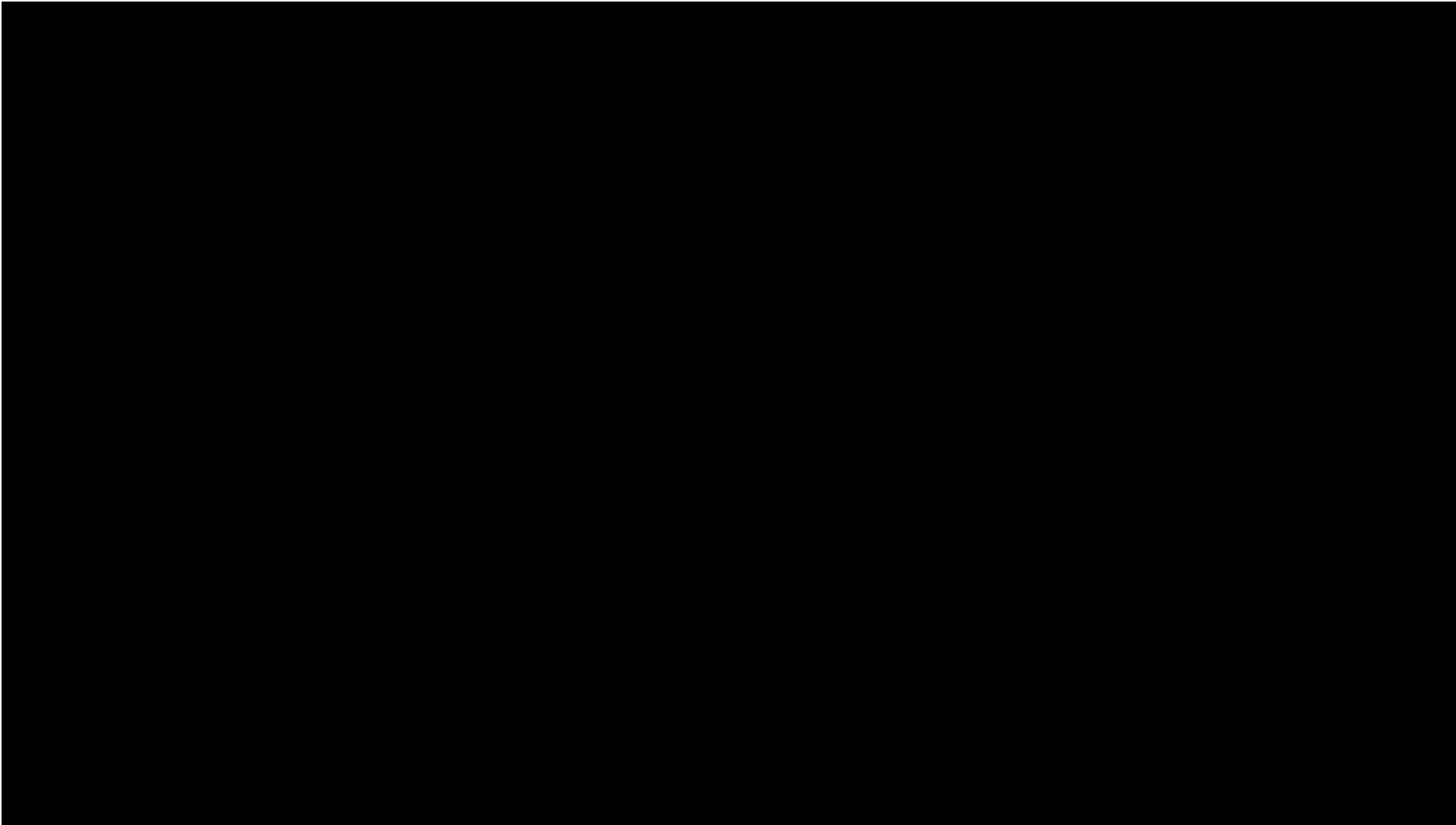


Hver miljøDNA-prøve fortyndes med 300 µL ddH₂O inden brug.

Klassen vælger én af de to miljøDNA-prøver til videre qPCR-analyse.

Der tilføjes positive kontrol, negative kontrol (ddH₂O) og miljøDNA-prøve til PCR-rørene inden de sættes ned i qPCR-maskinen.

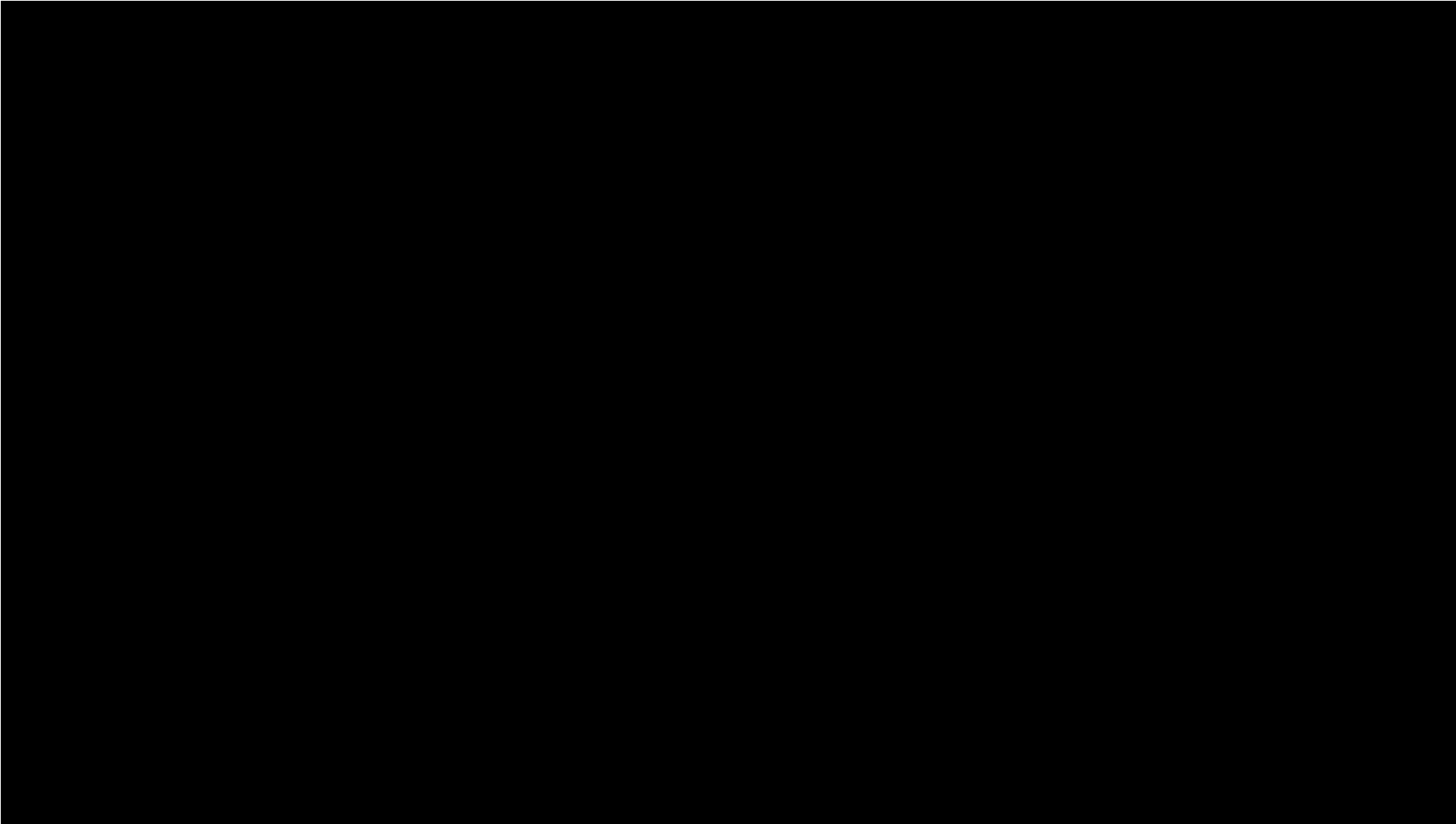
Håndtering af real-time PCR-maskine



Afspil video:

1. Tryk på firkant med video.
2. Eller brug dette link:
https://www.youtube.com/watch?v=DpqZLmn_KwI&list=PL_6anAeCkXYj54297f_-AEE2ylyq8yNaz&index=1

Real-time PCR-data til grafer



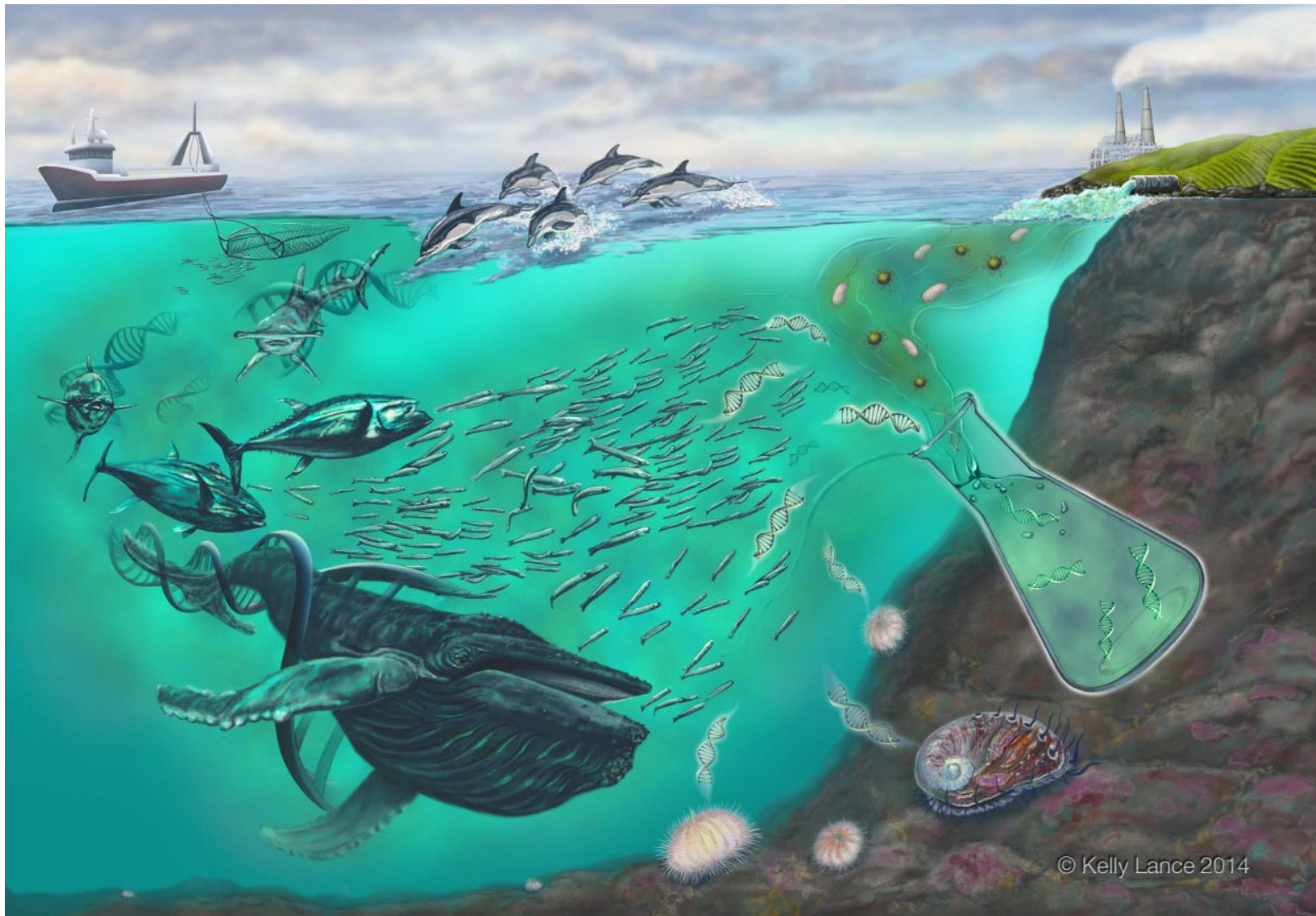
Afspil video:

1. Tryk på firkant med video.
2. Eller brug dette link:

https://www.youtube.com/watch?v=2JzbtPkC8jw&list=PL_6anAeCkXYj54297f_-AEE2ylyq8yNaz&index=2

Teori

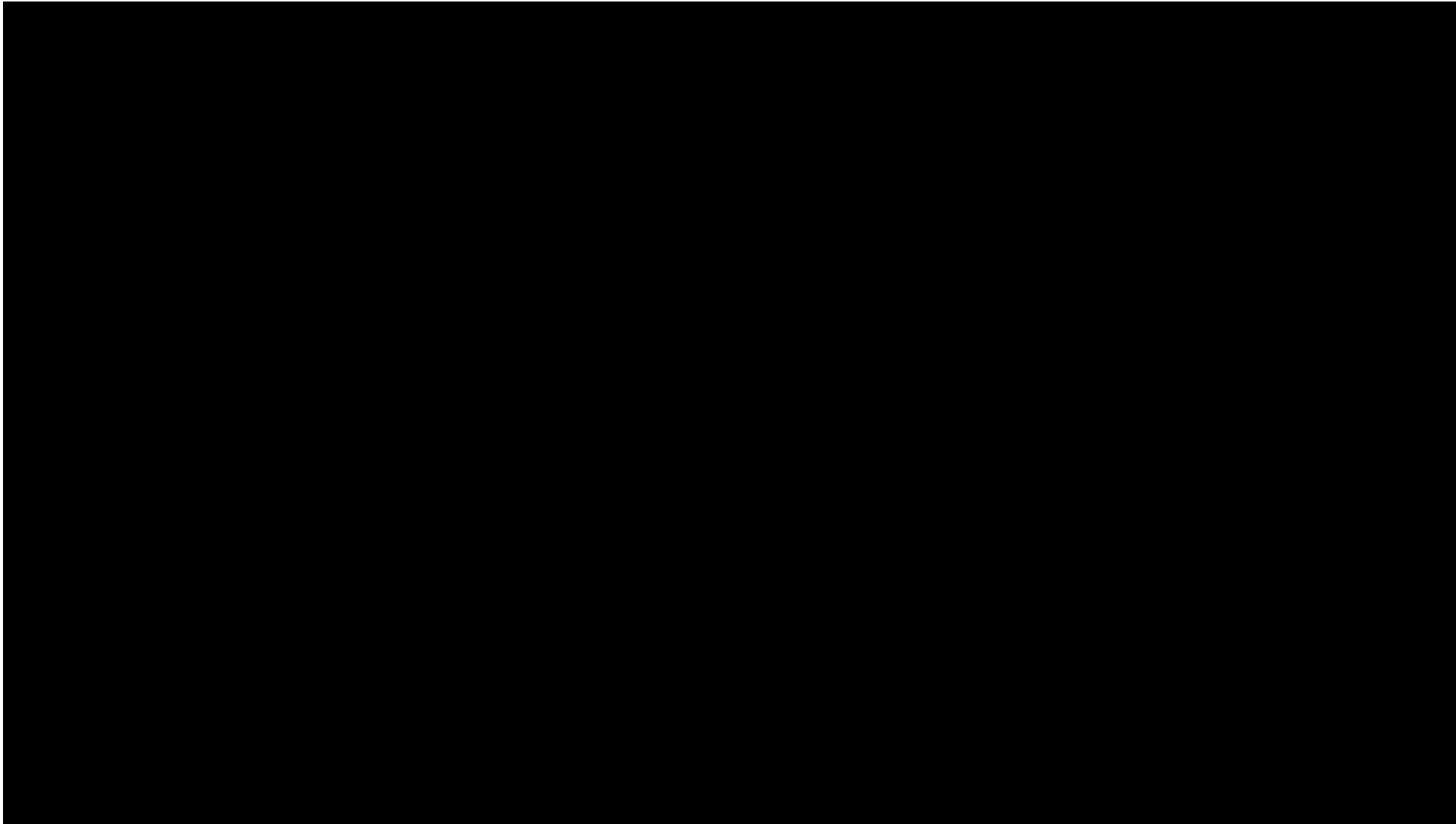
- MiljøDNA
- PCR
- Real-time PCR (qPCR)
- Arter til real-time PCR-analyse af miljøDNA-prøven
- Eksempler på real-time PCR-resultater
- Forskere som skal bruge dine resultater



MiljøDNA er en betegnelse for DNA udvundet fra et bestemt miljø. Oftest bruges betegnelse eDNA (environmentalDNA) om samme begreb.

MiljøDNA kan bruges til at påvise organismers tilstedeværelse på baggrund af deres DNA-spor, idet alle levende organismer udskiller DNA.

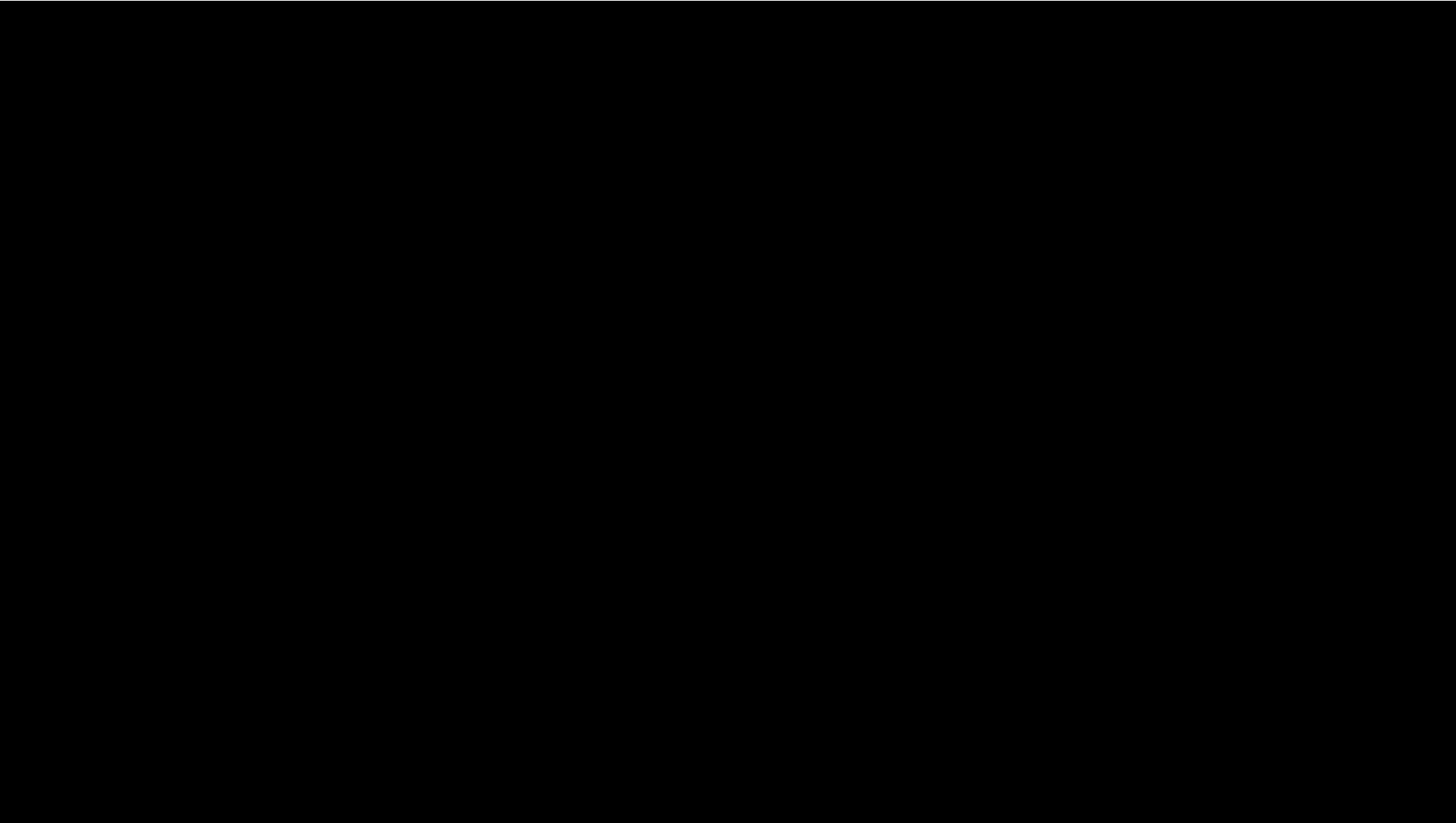
MiljøDNA-metoden har været brugt til at undersøge mange forskellige miljøer heriblandt luft, jord, vand, is, sedimenter, husstøv og afføring.



1. Tryk på firkant med video.
2. Eller brug dette link:
<https://www.youtube.com/watch?v=2KoLnIw0ZKU&t=2s>

Real-time PCR (qPCR)

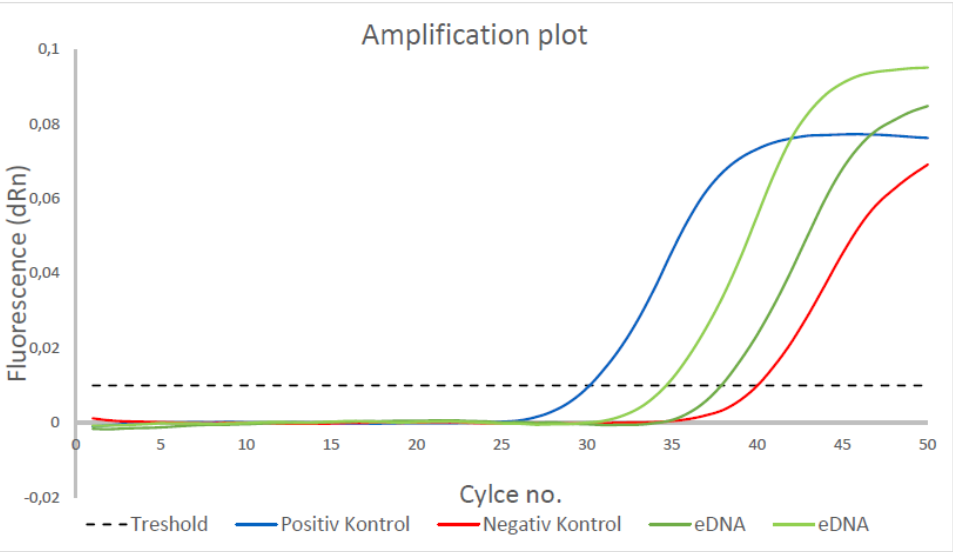
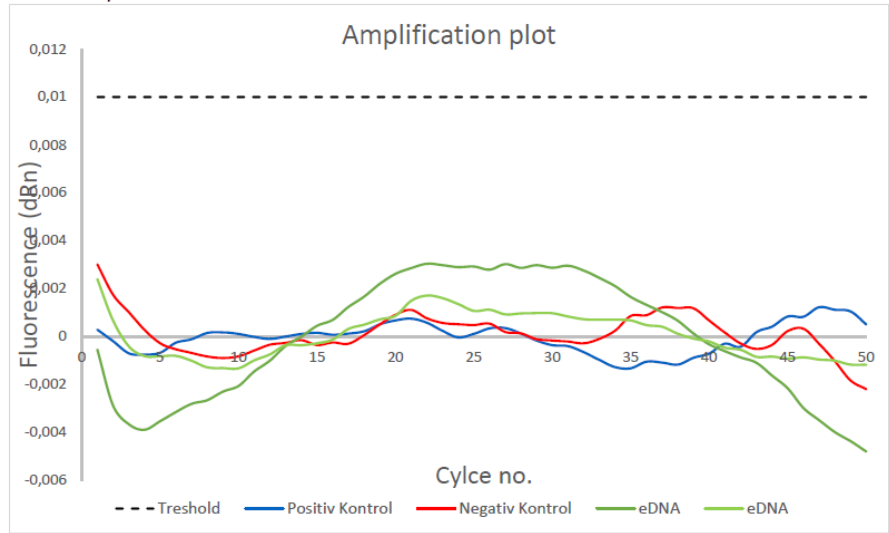
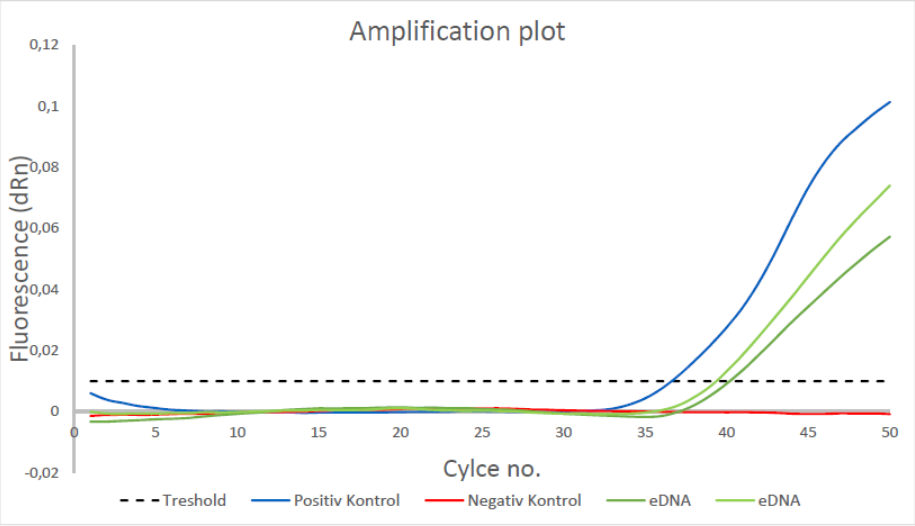
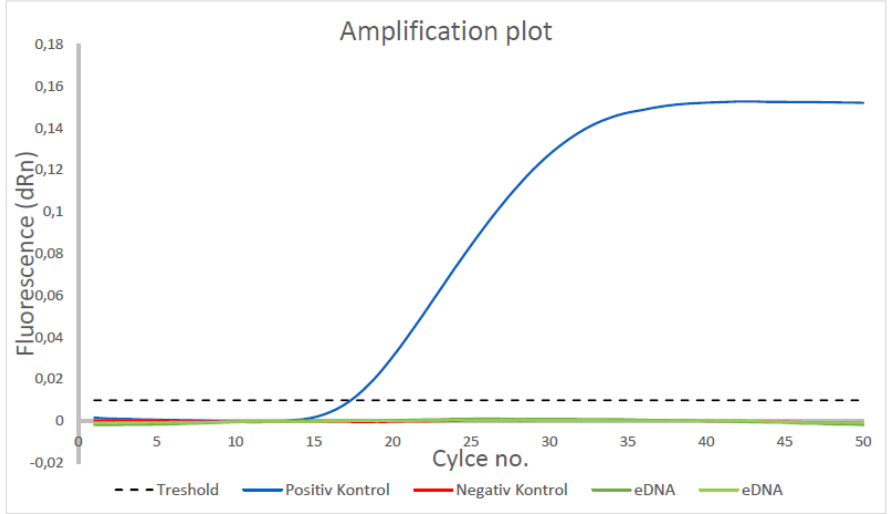
Tilbage til
Teori-oversigt



1. Tryk på firkant med video.
2. Eller brug dette link:
<https://www.youtube.com/watch?v=VK-CD4MDsto>

I qPCR-analyserne bruges en FAM-probe.

Eksempler på real-time PCR-resultater



Arter til qPCR-analyse af miljøDNA-prøven

Tilbage til
Teori-oversigt

Havvandsprøver



Aborre
Perca fluviatilis



Trepigget hundestejle
Gasterosteus aculeatus



Europæisk ål
Anguilla anguilla



Asiatisk strandkrabbe
Hemigrapsus penicillatus



Pensel-klippekrabbe
Hemigrapsus takanoi



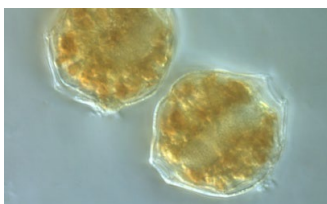
Blå svømmekrabbe
Callinectes sapidus



Sortmundet kutling
Neogobius melanostomus



Stilkalge
Prymnesium parvum



Furealge
Alexandrium ostenfeldii



Amerikansk ribbegople
Mnemiopsis leidyi



Marsvin
Phocoena phocoena



Spættet sæl
Phoca vitulina

Ferskvandsprøver



Aborre
Perca fluviatilis



Trepigget hundestejle
Gasterosteus aculeatus



Europæisk ål
Anguilla anguilla



Flodkrebs
Astacus astacus



Signalkrebs
Pacifastacus lenisimus



Galizisk sumpkrebs
Astacus leptodactylus



Løgfrø
Pelobates fuscus



Grønbroget tudse
Bufo viridis



Stilkalge
Prymnesium parvum



Stor vandsalamander
Triturus cristatus



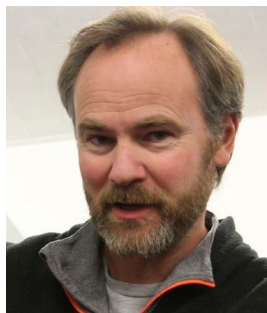
Lille vandsalamander
Lissotriton vulgaris



Bred vandkalv
Dytiscus latissimus

Forskere som skal bruge resultaterne

Tilbage til
Teori-oversigt



Peter Rask Møller

Lektor og kurator ved Statens Naturhistoriske Museum. Forsker inden for et bredt felt af fisk og akvatisk biologi.



Jørgen Olesen

Lektor og kurator ved Statens Naturhistoriske Museum. Forsker i diversitet, evolution og slægtskab af krebsdyr.



Morten Tange Olsen

Lektor ved Københavns Universitet. Forsker i marine pattedyrs økologi og evolution, samt påvirkning af klimaforandringer.



Nina Lundholm

Lektor og kurator ved Statens Naturhistoriske Museum. Forsker i genetisk diversitet af mikroalger.



Anders Tøttrup

Forskningschef og leder af citizen science-gruppen på Statens Naturhistoriske Museum.



Aborre
Perca fluviatilis



Blå svømmekrabbe
Callinectes sapidus



Marsvin
Phocoena phocoena



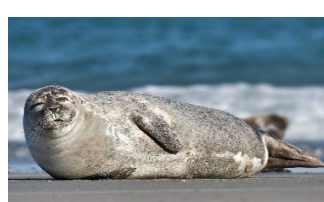
Stilkalge
Prymnesium parvum



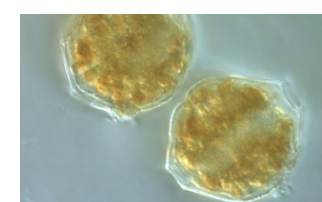
Sortmundet kutling
Neogobius melanostomus



Signalkrebs
Pacifastacus



Spættet sæl
Phoca vitulina



Furealge
Alexandrium ostenfeldii

