

Reagenser til DNA på FORKANT

Færdige elev-reagenser

Reagens	Mængde i elev-røret (µL)	Combi Tip (setting)	Rør	Antal pr. dag	Opbevaring (efter udpipettering)	Mærkning
RLY-buffer	45 µL	0,5 mL (4.5)	1,5 ml - klar	8	Køl	Lyseringsbuffer
Proteinase K	3 µL	0,1 mL (1.5)	1,5 ml - klar	8	Køl	Proteinase K
RLB-buffer	125 µL	2,5 mL (2.5)	1,5 ml - klar	8	Køl	Bindingsbuffer
RLW-buffer	250 µL	5 mL (2.5)	1,5 ml - klar	8	Køl	Vaskebuffer
RLE-buffer	30 µL	0,5 mL (3)	1,5 ml - klar	8	Køl	Elueringsbuffer
ddH2O (fortynding)	700 µL	10 mL (3.5)	1,5 ml - klar	1	Stuetemperatur	ddH2O (evt. fortynding)
ddH2O	60 µL	1 mL (3)	1,5 ml - klar	26	Stuetemperatur	ddH2O
TaqMan Master Mix	50 µL	1 mL (2.5)	1,5 ml - klar	24	Køl	TaqMan
For hver unik art:			1,5 ml - klar			
Primer F	6 µL	0,1 mL (3)	1,5 ml - klar	2	Frost	Primer F, "art"
Primer R	6 µL	0,1 mL (3)	1,5 ml - klar	2	Frost	Primer R, "art"
Probe	6 µL	0,1 mL (3)	1,5 ml - brun	2	Frost	Probe, "art"
Positiv kontrol	4 µL	0,1 mL (2)	1,5 ml - klar	2	Frost	Positiv kontrol, "art"

Kasser

Kasse-navn:	STOCKs	
Opbevaring:	FROST	
Reagens (for hver art)	Rør	Mærkning
Opløste oligos (Primer F, Primer R, Probe)	Rør med flad bund og rødt låg (fra producent)	Label med art, oligo-type og '100 µM'.
Positiv kontrol (stock)	1,5 ml klart rør	Label med art + PK stock
Primer F (brugsopløsning)	1,5 ml klart rør	Label med art + Primer F
Primer R (brugsopløsning)	1,5 ml klart rør	Label med art + Primer R
Probe (brugsopløsning)	1,5 ml brunt rør	Label med art + Probe
Positiv kontrol (brugsopløsning)	1,5 ml klart rør	Label med art + Positiv kontrol

Kasse-navn:	Klassesæt - Køl
Opbevaring:	KØL
Antal rør	Reagens
8	RLY-buffer
8	RLB-buffer
8	Proteinase K
8	RLW-buffer
8	RLE-buffer
2	Fortyndingsbuffer (ddH2O)
32	Vand (postevand)
24	ddH2O
24	TaqMan

Kasse-navn:	Klassesæt - FROST
Opbevaring:	FROST
Antal rør (for hver unik art)	Reagens (for hver unik art)
2	Primer F (brugsopløsning med 6 µL)
2	Primer R (brugsopløsning med 6 µL)
2	Probe (brugsopløsning med 6 µL)
2	Positiv kontrol (brugsopløsning med 4 µL)

Andre forberedelser

- Sørg for at PCR-rør og låg er klippet halv over, så hvert sæt består af en række med 4 rør sat sammen med en række med 4 låg.
- De farvede PCR-racks (rør-holdere med forskellige hul-størrelser) skal være mærket fra nr. 1-24.
- Det er en fordel at forberede til flere klasse besøg ad gangen.

Generelt om håndtering af PCR-reagenser

- Når der laves ny brugsopløsning af reagenser skal det for hver art ske i følgende rækkefølge: primer F, Primer R, Probe og positiv kontrol. Det er meget vigtigt at være opmærksom på, at den positive kontrol ikke kontaminerer de andre reagenser, og derfor håndteres denne til sidst.
- Der efterstræbes at reagenserne udsættes for så få optøninger som muligt.
- Det er vigtigt, at alle rør med reagenser bliver mærket med en label der angiver **art** og **reagens** type. Er man i tvivl om indholdet i et rør, så kasseres dette rør straks.
- Ved opfyldning af elev-rør tilsættes et større volumen end protokollen kræver, da der forventes et vist spild ved hver elev-pipettering.

Klargøring af Oligos (Primer og Prober)

Modtagelse

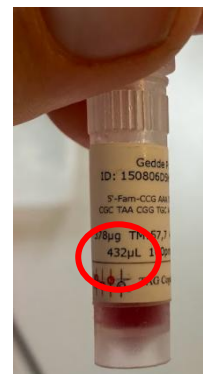
- Når oligos modtages fra leverandør skal de hurtigst muligt opbevares på **køl**. Oligos afsendes som et pulver.
- Rørene mærkes med en label på låget, som angiver **arten** samt **type** af reagens, og opbevares på **køl**.

Opløsning af pulver

- På røret er der skrevet et volumen i mikroliter. Dette angiver volumen af ddH₂O som skal tilsættes pulveret for at opnå en koncentration på **100 µM**. Dette volumen er forskelligt fra de forskellige sendinger af oligoer.
- Tilsæt det volumen ddH₂O som giver en koncentration på 100 µM. Skriv "**100 µM**" på lågets label.
- Opløsningen opbevares nu på **frost** i **stock-kassen** indtil der laves en brugsopløsning.

Brugsopløsning

- Til opsætning af qPCR-analyser skal oligos fortyndes til en **brugsopløsning**, hvor koncentrationen er specifik for den enkelte art og den enkelte reagens. Tabellen med arter og oligo-sekvenser angiver den specifikke brugsopløsning.
- Brugsopløsning laves i et 1,5 ml **klart rør for primer** og i et 1,5 ml **brunt rør for prober**. Rørene mærkes med en label på låget, som angiver **arten** samt **type** af reagens.



- For at opnå en brugsopløsning på fx 10 µM skal forholdet mellem stock og ddH₂O være: 10 µL stock + 90 µL ddH₂O = samlet brugsvolumen på 100 µL. Hvis der ønskes et brugsvolumen på 500 µL er forholdet således: 50 µL stock + 450 µL ddH₂O.
- Skriv den specifikke brugsopløsningskoncentration på lågets label, og opbevar dette rør på **frost** i **stock-kassen**.
- Denne brugsopløsning udportioneres til elev-rør. Elev-rørene opbevares på **frost** i en **klassesæt-kasse**.

Klargøring af positiv kontrol

- Rør med positiv kontrol lavet ud fra et PCR-amplikon fortyndes fra 10⁶ DNA kopier/µL til 10⁵ DNA kopier/µL og til sidst til 10⁴ DNA kopier/µL, som er den optimale brugsopløsning, og bruges til elev-rør.
- Rør med positiv kontrol lavet ud fra vævsekstraktion fortyndes 1:10, og denne brugsopløsning bruges til elev-rør.
- For positiv kontrol skal der 4 µL i hvert elev-rør, selvom eleven kun skal bruge 3 µL, da der forventes et vist spild ved hver pipettering.
- Håndtering af positive kontrol-prøver må ikke ske før håndtering af primer/prober eller ekstraktion af eDNA-prøver.

Arter til analyse

Art				Brugsopløsning (µM)			Navn på reagens		
Gruppe	Dansk navn	Latinsk navn	Forkortelse	Primer F	Primer R	Probe	Primer F	Primer R	Probe
Alge (furealge)		<i>Alexandrium ostenfeldii</i>	Aleost	20	10	5	AO352-F	AO493-R	AO377-P
Alge (stilkalge)		<i>Prymnesium parvum</i>	prypar	20	10	5	PrymF	PrymR	PrymP
Fisk	Aborre	<i>Perca fluviatilis</i>	Perflu	5	25	7,5	PFT-PerfluCBL	PFT-PerfluCBR	PFT-PerfluCB.probe
ribbegoble	amerikansk ribbegoble	<i>Mnemiopsis leidyi</i>	Mnelei	10	25	7,5	Mnelei_its2_F04	Mnelei_its2_R06	Mnelei_its2_P06
Krebsdyr	Asiatisk strandkrabbe	<i>Hemigrapsus sanguineus</i>	Hemsan	10	20	5	Hemsan_co1_F01	Hemsan_co1_R01	Hemsan_co1_P01
Krebsdyr	Blå svømmekrabbe	<i>Callinectes sapidus</i>	Calsap	10	20	5	Calsap_co1_F01	Calsap_co1_R01	Calsap_co1_P01
Fisk	Europæisk ål	<i>Anguilla anguilla</i>	Angang	20	30	7,5	Angang_F10571	Angang_R10676b	Angang_P10595
Fisk	Makrel	<i>Scomber scombrus</i>	Scosco	10	20	5	Scosco_CYBF14517	Scosco_CYBR14597	Scosco_CYBP14541
Pattedyr	Marsvin	<i>Phocoena phocoena</i>	Phopho	8	8	3	Ppho_Cytb-F	Ppho_Cytb-R	Ppho_Cytb-P2
Pattedyr	Odder	<i>Lutra lutra</i>	lutlut	10	10	2,5	Lutlut_F	Lutlut_R	Lutlut_P
Krebsdyr	Penselklippekrabbe	<i>Hemigrapsus takanoi</i>	Hemtak	10	20	5	Hemtak_co1_F05	Hemtak_co1_R05	Hemtak_co1_P05
Fisk	sortmundet kutling	<i>Neogobius melanostomus</i>	Neomel	5	15	2,5	Neomel_COI_F01	Neomel_COI_R01	Neomel_COI_P01
Fisk	Trepigget hundestejle	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	gasacu	10	10	2,5	GaacCB-L	GaacCB-R	GaacCB-probe
Pattedyr	Spættet sæl	<i>Phoca vitulina</i>	PhoVit	10	10	4	Pv_NADH4_F03	Pv_NADH4_R01	Pv_NADH4_P02
Padde	Stor vandsalamander	<i>Triturus cristatus</i>	tricri	5	25	3,125	TricriCB-L	PFT-TricriCBR	PFT-TricriCB.probe
Padde	Løgfrø	<i>Pelobates fuscus</i>	pelfus	25	30	6,25	PFT-PelfusCBL	PFT-PelfusCBR	PFT-PelfusCB.probe
Padde	Grønbroget tudse	<i>Bufo viridis</i>	bufvir	25	5	12,5	BufvirCBL_0653	BufvirCBR_0752	BufvirCB.prob0718

Padde	Lille vandsalamander	<i>Lissotriton vulgaris</i>	Lisvul	10	20	7,5	Lisvul_cytb_F01	Lisvul_cytb_R01	Lisvul_cytb_P01
Krebs	Flodkrebs	<i>Astacus astacus</i>	astast	30	30	2,5	astast_CO1_F0336	astast_CO1_R0397	astast_CO1_P0357
Krebs	Signalkrebs	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	paclen	30	30	2,5	paclen_CO1_F0336	paclen_CO1_R0397	paclen_CO1_P0357
Krebs	Galizisk sumkrebs	<i>Astacus leptodactylus</i>	Ponlep	30	30	2,5	Ponlep_CO1_F03	Ponlep_CO1_R03	Ponlep_CO1_P03
Insekt	Bred vandkalv	<i>Dytiscus latissimus</i>	dytlat	15	5	2,5	DytlatCO1_F1720	DytlatCO1_R1817	Dytlat_pbF1793
Musling	Vandremusling	<i>Dreissena polymorpha</i>	drepol	10	10	2,5	Dre_pol_CO1_F01	Dre_pol_CO1_R01	Dre_pol_CO1_P01
Fisk	Solaborre	<i>Lepomis gibbosus</i>	lepgib	20	10	5	lepgib_F	lepgib_R	lepgib_P
Krybdyr	Røddøret terrapin	<i>Trachemys scripta elegans</i>	trasce	10	10	2,5	Tse-Kako-A-F	Tse-Kako-A-R	Tse-Kako-A-P

Kvalitetssikring

Når der arbejdes med DNA i laboratoriet er det vigtigt at være særligt opmærksom på risikoen for krydskontaminering. DNA-spor kan nemt forvirle sig over i de forkerte prøver og reagenser, hvis ikke man er omhyggelig med adskillelse af laboratorieprocedure og rengøring. En evt.

krydskontaminering også være meget svær at spore i selve resultaterne. Denne vejledning giver et overblik og de vigtigste forbehold ved arbejde med DNA-prøver, og hvilke greb der er opstillet i protokollerne til at sikre den bedste mulig datakvalitet.

Herunder er der opstillet særlige gode tips til hvert af elementerne i forbindelse med feltarbejdet, laboratoriearbejdet og dataanalyse.

Feltarbejde

Indsamling af miljøDNA-prøver. Husk at:

- Bruge handsker ved håndtering af sterivex-filteret.
- Bruge det samme indsamlede vand til filtrering med begge filtre.
- Udfylde alle datapunkter på dataarket.

Laboratoriearbejde

DNA-ekstraktion. Husk at:

- Rengøre bordplade og alle materialer med 5% klor og 70% ethanol inden hvert laboratoriearbejde.
- Bruge handsker ved håndtering af DNA-prøver og reagenser.
- Følge hver af protokollens dele.
- Vortexe og centrifugere prøver efter tilsætning af reagens, eller inden brug af reagens/prøve.
- Få al væske fra prøven med igennem hele protokollen. Særligt når væsken skal over filterkolonnerne.

qPCR-analyse. Husk at:

- Rengøre bordplade og alle materialer med 5% klor og 70% ethanol inden hvert laboratoriearbejde.
- Bruge handsker ved håndtering af DNA-prøver og reagenser.
- Reagensen for den positive kontrol må ikke bliver mixet i andre rør.
- Bruge den rigtige rækkefølge for PCR-rørene og ikke at skrive andet sted på låget end på snippen/udhænget.

qPCR-data

Hver artsanalyse består af fire reaktionsbrønde, og hver reaktion indeholder en blanding af TaqMan polymerase, nukleotider, vand, buffer samt de tilhørende artsspecifikke forward/reverse primere og probe. Denne blanding udgør PCR-mixet, som er fælles for de fire reaktionsbrønde. I første reaktionsbrønd tilsættes yderligere DNA-positiv kontrol (fortyndet ekstraktion af DNA fra væv fra arten). I anden reaktionsbrønd tilsættes ddH₂O (dobbeltdestilleret H₂O) som negativ kontrol. I tredje og fjerde brønd tilsættes ekstraheret, koncentreret miljøDNA. For hver miljøDNA-prøve udføres to

analyser (med hver fire reaktionsbrønde som beskrevet i dette afsnit) for hver art svarende fire brønde med analyse af miljøDNA for hver art.

Hvert real time PCR-resultat holdes op imod en tærskelværdien af threshold fluorescens der giver mulighed for at standardisere på tværs af flere kørsler. Det betyder, at hver real time PCR-kørsel kan udføres med mange forskellige assays (primer/probe-system) på én gang uden brug af standardkurver for det enkelte assay. Tærskelværdien er et objektive kriterie til vurdering af, om der har været amplificerbart DNA i prøven. Giver en reaktionsbrønd signal over tærskelværdien anses den som positiv og det konkluderes, at der er DNA fra den pågældende art tilstede. Er signalet under tærskelværdien, anses prøven som værende uden DNA fra den pågældende art.

Cycle threshold (ct)-værdien kan bruges som et udtryk for mængden af DNA tilstede i den pågældende prøve inden påbegyndt amplificering. Jo lavere ct-værdi, jo højere DNA-koncentration har der været fra start. Efter et generelt forsigtighedsprincip bruges en cut off for ct-værdi på 41, så positive signaler med en ct-værdi over 41 betragtes som upålidelige og anses som 'ikke detekteret'/'Absent'¹. Resultater med ct-værdi over 41 vil stadig rapporteres til brug som indikation af signal, hvis værdien er over cut off.

¹ Agersnap S, Larsen WB, Knudsen SW, Strand D, Thomsen PF, Hesselsøe M, et al. (2017) Monitoring of noble, signal and narrow-clawed crayfish using environmental DNA from freshwater samples. PLoS ONE 12(6): e0179261. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179261>

Guide: Bestil primersekvenser

For at kunne analysere efter artsspecifikke DNA-spor i miljøDNA-prøver er det nødvendigt at bruge primere, som er udviklet specifikt til den pågældende art. Vi har samlet en liste med arter og tilhørende primersekvenser som bl.a. bruges i projektet DNA på FORKANT.

Vi har inkluderet en probesequens til hver art. Proben er et reporter-molekyle der sidder på artens DNA-sekvens imellem Forward Primer og Reverse Primer.

Indkøb af primer (oligos)

Du kan købe primerne hos dine lokale primer-købmand. Vi viser her, hvordan du køber via Tag Copenhagen, www.tagc.dk. Primer bruges til PCR-reaktion hvor prober kun er nødvendige hvis man bruger en metode efterfølgende eller i forbindelse med PCR-reaktionen hvor det er muligt at farve efter probens tag. Dette er fx gældende i real time PCR (qPCR).

Indkøbsguide

1. Log in på www.oligo.tagc.com/shop
2. I venstremenu, vælg: Single Oligo Entry
3. Giv din primer et navn
4. Vælg *Type*: DNA
5. Vælg *Synthesis scale*: 0,04 µmol (RPC)
6. Vælg *Delivery form*: solid
7. Indtast sekvensen i *Sequence (5'-3')*
8. Tryk *Add to order*

Single Oligo

Add a Single Oligo to your order

Name Perca_fluviatilis_F Required, Max 20 characters (incl. spaces).	Type DNA Required	Synthesis scale 0.04 µmol (RPC) Required	Delivery from Solid Required
5'-modification None	3'-modification None	Internal modification None	
Sequence (5'-3') ACGCTCGATTCCAACAAAC Required		Mark the position with an X in the sequence Basecount 20	

9. Lav en oligos/primer ad gangen, og udfyld skemaet for hver enkelt oligos.
10. Eksempel på fluorescerende probe for arten aborre (*perca fluviatilis*):

Single Oligo

Add a Single Oligo to your order

Name Perca_fluviatilis_P Required, Max 20 characters (incl. spaces).	Type DNA Required	Synthesis scale 0.04 μmol (RPC) Required	Delivery from Solid Required
5'-modification Fam	3'-modification 3'-BHQ-1	Internal modification None	
Sequence (5'-3') GCCTTACTTGCCTCCATCCTGGTTC Required		Mark the position with an X in the sequence Basecount 25	

11. Når alle ønskede oligos er listet, tryk Current Order i øverste menubjælke.
12. Her kan du se dine oligos, og indtaste betalingsoplysninger.

Håndtering af oligos

1. Når pakken fra Tag Copenhagen ankommer, skal oligos opbevares på køl.
2. Inden hver enkelt primer/probe skal i brug første gang, skal pulveret i røret opløses.
3. På røret er der angivet, hvor meget vand der skal tilsættes. Sørg for at bruge RNase og DNase frit vand (fx Molecular Biology Grade Water UltraPure). På billedet er et eksempel, hvor der skal tilsættes 432 μL vand.



4. Når pulveret er opløst vil koncentrationen af opløsningen i røret være 100 μM .
5. Herefter opbevares røret med væske på frost.

Brug af oligos

For at bruge den vandige opløsning af primer/probe skal denne fortyndes til en god brugsopløsning. Som udgangspunkt kan du bruge følgende opløsninger:

- Forward Primer og Reverse Primer: 20 μM
- Probe: 5 μM

For at få den rette brugsopløsning på fx 20 μM tager du 20 μL fra opløsningen og tilsætter 80 μL RNase & DNase frit vand. Denne brugsopløsning opbevares også på frost. Sørg for at have overblik over hvilke primere der er opløst og hvilken art det er.

Når du skal bruge primerne til klassens laboratoriearbejde, skal de blot optøs kort tid inden brug.

Primer- og Probesekvenser

Art	Latinsk navn	Forward Primer	Reverse Primer	Probe (bruges til real-time PCR/qPCR)	Reference
Aborre	<i>Perca fluviatilis</i>	ACGCTCGATTCC AAACAAAC	GTGTGAAGGAT GGGGACAAC	FAM- GCCTTACTTGCCTCCATCCTGG TTC-BHQ1	Spens, J. et al (2017)
Amerikansk ribbegøple	<i>Mnemiopsis leidyi</i>	ACGGTCCCTTG AAGTAGAGC	TCTGAGAAGGC TTCGGACAT	FAM- GTGCCTCTCGGTGTGGTAGCA ATATCT-BHQ1	Andersen, J. et al. (2018)
Asiatisk strandkrabbe	<i>Hemigrapsus sanguineus</i>	CCTGGGCCGGT ATAGTAGGT	GGGGCTCCGAG TATAAGTGG	FAM- CGAGCAGAATTAAGACAACCA GGAAGC-BHQ1	Andersen, J. et al. (2018)
Blå svømmekrabbe	<i>Callinectes sapidus</i>	GGGCCTCAGTT GATCTTGGT	GTAGAGAACAG GGTCGCCTC	FAM- ATACCTCATTCTTCGACCCAGC TGGAG-BHQ1	Andersen, J. et al. (2018)
Europæisk ål	<i>Anguilla anguilla</i>	ATCTAGCAACG GACCCCTTA	TTGGTTGGTTCT AGCCGCA	FAM- ACACCACTACTAGTTTTATCTT GCT-BHQ1	Knudsen, S. W. et al. (2019a)
Flodkrebs	<i>Astacus astacus</i>	GATTAGAGGAA TAGTAGAGAG	CTGATGCTAAA GGGGGATAA	FAM- AGGAGTAGGGACAGGATGAA CT-BHQ1	Knudsen, S. W. et al. (2019b)
Galizisk sumpkrebs	<i>Astacus leptodactylus</i>	TTTGGGACTTG AGCAGGAAT	CTGGTTGTCCG AGTTCAACA	FAM- TGGGAACCTCTTTAAGAATAA TTATTCG-BHQ1	Knudsen, S. W. et al. (2019b)
Grønbroget tudse	<i>Bufo viridis</i>	AAATCCCATTCC ATGCTTACTACT	AAGAGGTTGGG GGCAAATGT	FAM- AGAAGGCTAGTATGAGTGCAA ATCCA-BHQ1	Knudsen S. W. et al. (2023)
Lille vandsalamander	<i>Lissotriton vulgaris</i>	TTACCCGATTCT TCGCATTC	CGGTTTGGTGA AGGAACAGT	FAM- ATTCCCTTTCTTATTGCCGGG- BHQ1	Knudsen S. W. et al. (2023)
Makrel	<i>Scomber scombus</i>	TTCCCTGCTTGG TCTCTGTT	GGCGACTGAGT TGAATGCTG	FAM- TTCCCAAATCCTCACAGGACTA TTC-BHQ1	Knudsen, S. W. et al. (2019a).
Odder	<i>Lutra lutra</i>	AAAGCCACCCT GACACGATT	AGCAGGTGGAT TGTTGCTAGTG	FAM-TTCGCTTTCCACTTTAT- BHQ1	Thomsen, P.F. et al. (2012)
Pensel-klippekrabbe	<i>Hemigrapsus takanoi</i>	AGGTTTTGACTT CTTCCTCCTTCT	CTGCGAGTGGA GGGTAACG	FAM- TAGAAAGAGGTGTAGGTACA GGATGGA-BHQ1	Andersen, J. H. et al. (2018)
Rødspætte	<i>Pleuronectes platessa</i>	TAGGCTTCGCA GTCCTCCTC	TTGAGGCGTG AAGTTGTCT	FAM- CTAAAAGATTTGGGGAAAATA GGGCGAGT-BHQ1	Knudsen, S. W. et al. (2019a)

Signalkrebs	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	AACTAGAGGAA TAGTTGAAAG	CCGCTGCTAGA GGAGGATAA	FAM- AGGAGTGGGTACTGGATGAA CT-BHQ1	Knudsen, S. W. et al. (2019b)
Skrubbe	<i>Platichthys flesus</i>	TAGGCTTTGCA GTTCTCCTT	GCAGGCGTAAA GTTGTCCG	FAM- CACTGGCTTCGCTCGCCCTATT TTC-BHQ1	Knudsen, S. W. et al. (2019a)
Sild	<i>Clupea harengus</i>	CCCATTGTGAT TGCAGGGG	CTGAGTTAAGTC CTGCCGGG	FAM- TACTATTCTCCACCTTCTGTTCC TC-BHQ1	Knudsen, S. W. et al. (2019a)
Sortmundet kutling	<i>Neogobius melanostomus</i>	CTTCTRGCTCC TCTGGWGTG	CCCWAGAATTG ASGARATKCCG G	FAM- CAGGCAACTTRGCACATGCAG- BHQ1	Nevers, M. B. et al. (2018)
Stor vandsalamander	<i>Triturus cristatus</i>	GCAACACTCACC CGATTTTT	CCCCGTTTGGTG TAAGAAGA	FAM- TGCATTCCACTTCTGTTCCCA TTC-BHQ1	Knudsen S. W. et al. (2023)
Torsk	<i>Gadus morhua</i>	TTCGCACCTAAT TTACTCGGAG	TCGGGCTTAAC ATGAGGTGG	FAM- AGATAATTTACCCCTGCTAAC CCCATC-BHQ1	Eckford-Soper, L. K., Daugbjerg, N. (2015)
Trepigget hundestejle	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	CGCCACCTTAAC ACGTTTC	GAGCCTGTCTG GTGAAGGA	FAM- CTGGTGCCACACTTGTTCAC- BHQ1	Thomsen, P. F. et al. (2012)
Vandremusling	<i>Dreissena polymorpha</i>	CACCACTCATGG GCTTGTTA	ACCAATCAATTT CCGAATCC	FAM- TTTTTCTAGTAATACCTATAAT AATGGGG-BHQ-1	Andersen, J. H. et al. (2016)
Strandkrabbe	<i>Carcinus maenas</i>	AATATTGGGAG GGCCAGATATA G	AGGATCGAAGA ATGAGGTGTTT AG	6FAM-GGTTCT GATTACTTCTCCGTCTTTAAC CT-MGB	Danziger, A.M. et al. (2022)
Røddret terrapin	<i>Trachemys scripta elegans</i>	CCTCCAACATCT CTGCTTGA	ATTGTACGTCTC GGGTGATG	(FAM)- CGGAATTTTCTTGGCTATAC- MGB	Kakuda, A. et al. (2019)
Guløret terrapin	<i>Trachemys scripta</i>	GGGAACTGACT CGTGCCATTA	TGGGCTAAATTT CCGGCTAA	TAGCATCATCAGGAATTGA	Hernandez, C. et al. (2020)

Referencer

Andersen, J. H., Kallenbach, E., Thaulow, J., Hesselsøe, M., Bekkevold, D., Hansen, B. K., Jacobsen, L. M. W., Olesen, C. A., Rask Møller, P., & Knudsen, S. W. (2018). Development of species-specific eDNA-based test systems for monitoring of non-indigenous species in Danish marine waters. NIVA. NIVA Report No. 7204 - 2017 https://www.researchgate.net/publication/328243866_Development_of_species-specific_eDNA-based_test_systems_for_monitoring_of_non-indigenous_species_in_Danish_marine_waters

Andersen, J. H., Møller, P. R., Kallenbach, E., Hesselsøe, M., Knudsen, S. W., Bekkevold, D., Hansen, B. K., & Thaulow, J. (2016). Steps toward nation-wide monitoring of non-indigenous species in Danish marine waters under the Marine Strategy Framework Directive. NIVA.

Danziger, A.M., Frederich, M. Challenges in eDNA detection of the invasive European green crab, *Carcinus maenas*. *Biol Invasions* 24, 1881–1894 (2022). <https://doi.org/10.1007/s10530-022-02757-y>

Eckford-Soper LK, Daugbjerg N (2015) Examination of six commonly used laboratory fixatives in HAB monitoring programs for their use in quantitative PCR based on Taqman probe technology. *Harmful Algae* 42:52–59

Hernandez, C.; Bougas, B.; Perreault-Payette, A.; Simard, A.; Côté, G.; Bernatchez, L. 60 specific eDNA qPCR assays to detect invasive, threatened, and exploited freshwater vertebrates and invertebrates in Eastern Canada. *Environ. DNA* 2020, 2, 373–386.

Kakuda A, Doi H, Souma R, Nagano M, Minamoto T, Katano I. Environmental DNA detection and quantification of invasive red-eared sliders, *Trachemys scripta elegans*, in ponds and the influence of water quality. *PeerJ*. 2019 Dec 6;7:e8155. doi: 10.7717/peerj.8155. PMID: 31824768; PMCID: PMC6901006.

Knudsen, S. W., Ebert, R. B., Hesselsøe, M., Kuntke, F., Hassingboe, J., Mortensen, P. B., Thomsen, P. F., Sigsgaard, E. E., Hansen, B. K., Nielsen, E. E., & Møller, P. R. (2019a). Species-specific detection and quantification of environmental DNA from marine fishes in the Baltic Sea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 510, 31–45. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2018.09.004>

Knudsen, S. W., Agersnap, S., Møller, P. R., & Andersen, J. (2019b). *Development of species-specific eDNA-based test systems for monitoring of freshwater crayfish*. NIVA-rapport;7447

Knudsen S. W., Hesselsøe M., Rytter M., Lillemark M. R., Tøttrup A. P., Rahbek C., et al. (2023). Detection of environmental DNA from amphibians in Northern Europe applied in citizen science. *Environ. DNA* 5, 1–20. doi: 10.1002/edn3.462

Nevers MB, Byappanahalli MN, Morris CC, Shively D, Przybyla-Kelly K, Spoljaric AM, et al. (2018) Environmental DNA (eDNA): A tool for quantifying the abundant but elusive round goby (*Neogobius melanostomus*). *PLoS ONE* 13(1): e0191720. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191720>

Spens, J., Evans, A.R., Halfmaerten, D., Knudsen, S.W., Sengupta, M.E., Mak, S.S.T., Sigsgaard, E.E. and Hellström, M. (2017), Comparison of capture and storage methods for aqueous microbial eDNA using an optimized extraction protocol: advantage of enclosed filter. *Methods Ecol Evol*, 8: 635–645. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12683>

Thomsen PF, Kielgast J, Iversen LL, Møller PR, Rasmussen M, et al. (2012) 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 PF, Kielgast J, Iversen LL, Wiuf C, Rasmussen M, Gilbert MTP, Orlando L, Willerslev E (2012) Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology* 21(11): 2565–2573. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05418.x>