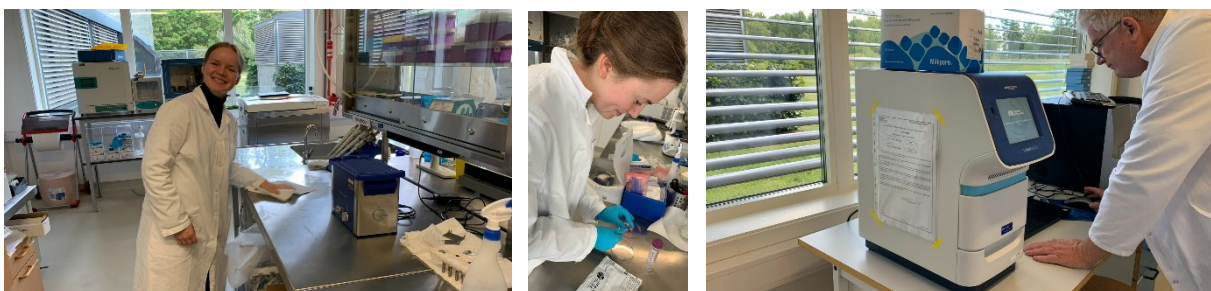


Er det mulig å automatisk overvåke organismer i norske vassdrag? / Is it possible to automatically monitor organisms in Norwegian waters?



Junior vannpris 2023

Av Mari Brevik Lien, Isabel Eie, Kirsti Einang og Aleksandra Madzelewska

Horten Videregående skole & Universitetet i Sørøst-Norge

Forord og hjelp mottatt

Først og fremst takker vi Universitetet i Sørøst-Norge (USN) for utlån av deres BioMEMS-laboratorier som var på forhånd utstyrt med alt vi kunne trenge til å gjennomføre dette prosjektet. Takk til Frank Karlsen (professor i mikro- og nanoteknologi, USN), Lars E. Roseng (førsteamanuensis, USN), og Karoline Krogstad (Avdelingsingeniør og laboratorieansvarlig, USN) for god veiledning, spesielt når vi gjennomførte tester med den nye og ukjente teknologien FORDETECT. Vi vil allikevel understreke at vi har utført alt praktisk arbeid og utarbeiding av hypotese på egenhånd. Vi vil også rette en takk til våre lærere i TOF, Lars Kristian Asbjørnsen og Jan Kåre Trandem Qvam, for å ha tipset oss til å delta i «norsk junior vannpris».

Sammendrag

Miljødirektoratet la i 2019 frem et ønske om utvikling av ny teknologi som på en helautomatisk måte kontinuerlig kan detektere eDNA i norske elver og vassdrag (Miljødirektoratet, 2023). Ønsket er utstedt med hensikten å få innsyn i hvilke arter som befinner seg i vannet for å kunne regulere uønskede arter og kartlegge opprinnelige arter. Den revolusjonerende teknologien FORDETECT er utviklet for å bidra til dette. Teknologien er norsk og har vært utviklet av institutt, universitet og firma over hele Europa de siste 22 årene. Teknologien er en Lab-on-chip-teknologi som kan bruke molekylærbiologiske metoder detektere mikroskopiske eDNA/eRNA-rester fra vannprøver. Prosjektet vårt går derfor ut på å sammenligne den automatiske FORDETECT-teknologien med to manuelle laboratoriemetoder, PCR og LAMP. Dette ble gjennomført ved å påvise eDNA fra den sterkt truede ålen i innhentede vannprøver fra vårt lokale vann, Borrevannet. Prøvene ble filtrert og ekstrahert. Etter nærmere undersøkelse av resultatene fra PCR og LAMP, i tillegg til FORDETECT, konkluderer vi med at FORDETECT teknologien i nær fremtid kan bli mye mer effektiv og økonomisk bærekraftig enn de tradisjonelle manuelle laboratoriemetodene. Teknologien er derimot fortsatt i en tidlig utviklingsfase, som gjør at den ennå ikke har nådd sitt fulle potensiale. Vi ser likevel de store fordelene en slik teknologi kan gi for overvåking av biologisk aktivitet, og oppmuntrer sterkt til videre utvikling av FORDETECT. I nærmeste fremtid kan denne teknologien sikre og opprettholde en høy livskvalitet for skapninger i vann over hele verdenen ved å i større grad unngå utbredelsen av uønskede og skadelige organismer.

Hensikt

Miljødirektoratet har utstedt et ønske om ny teknologi som på en helautomatisk måte kan detektere eDNA i norske elver og vann. Hensikten er blant annet å overvåke forekomsten av vannbårne skadelige organismer. For å kunne bevare økosystemene og ikke minst øke livskvaliteten til arter i norske vann, er det derfor viktig å utvikle teknologi som kan overvåke og kartlegge de artene som lever der. Horten kommune har utarbeidet klare mål om langsiktig bruk og forvaltning av vannforekomster som skal sikre at naturverdiene bevares (Horten kommune, 2022). Blant annet ønsker de å bevare ålen *Anguilla Anguilla* som er sterkt truet (per 2023) i Borrevannet.

USN er en av deltakerne i Miljødirektoratets prosjekt, og de har lokalt utviklet en lab-on-a-chip-teknologi med navnet FORDETECT. Denne teknologien kan på sikt benyttes til å automatisk overvåke eDNA i vann på en mer effektiv og mindre resurskrevende måte en dagens tradisjonelle manuelle metoder. Derfor er målet for dette prosjektet å sammenligne manuelle og tidskrevende molekylærbiologiske metoder som LAMP og PCR med den nye automatiske teknologien FORDETECT, for å undersøke om det er realistisk å automatisk overvåke eDNA i innsjøer og vassdrag (Littlefair, et al., 2022). En oppblomstring av en uønsket art kan ved hjelp av FORDETECT raskere og mer bærekraftig detekteres slik at det kan settes inn tiltak som sikrer god regulering før det går utover opprinnelige artene i vannet. Hoved-hypotesen for dette prosjektet blir derfor følgende; kan FORDETECT-teknologien bidra til økt livskvalitet for livet i vann?

Utstysrliste

Filtrering av vann:

- Elektrisk pumpe med to slanger
- Deionisert DI-vann
- Filter (Sterivex filter, Whatman filter papir eller AcroCap)

Manuell ekstrahering av eDNA

- Stativ for mikrosentrifugerør
- Magnetisk stativ
- Inkubator
- 1.5 ml mikrosentrifugerør
- 1.5 ml RNase/DNase frie rør
- Mikropipetter
- Sterile pipette tupper med filter (volum: 50 – 1000 µL)
- Hansker
- Ferdig filtrerte vannprøver
- Kittet «(NUCLISENS magnetic Extraction Reagents (ref. 200293))» utviklet av Biomerieux i Lyon, Frankrike.

Fortynning av positivkontroll

- Kit (VWR, Norge)
- Bio-masher
- Lysisbuffer

PCR og LAMP

- PCR Kit (Eurogentec, Belgia)
- Warmstart LAMP Kit (Bio Nordica, Norge):
- RNase-fritt vann

FORDETECT

- FORDETECT maskin og programvare
- LOC brett
- Programmet: ASILOG (Qiagen, Tyskland)
- Programmet: FLDigital
- Programmet: DNA example tool (Mectro, Norge)

Metode

Innsamling av vannprøver

Vannprøvene ble hentet fra Borrevannet i Horten kommune den 11. september 2022.

Prøvebeholderne, altså 1-1,5 liter flasker, ble rengjort med drikkevann før bruk.

Prøvene ble hentet fra de forskjellige stedene ved følgende klokkeslett (se figur 1):

- Vassdrag (VD): kl. 13:00
- Båthavn (BH): kl. 14:20
- Siv (SS): kl. 14:50
- Speiderhytte (SH): kl. 15:10

Da prøvebeholderne var fylt med

vann, ble de markert med to

bokstaver og et nummer som

tilsvarer prøvested og antall. Videre ble prøvene transportert fra Borrevannet til USN, hvor de

ble oppbevart i kjøleskap frem til filtrering. Dette var for å unngå eventuell nedbrytning av

eDNA. Totalt ble samlet inn 43 vannprøver i prosjektet.

Filtrering

Vannprøver:

Vannprøvene hentet fra Borrevannet ble deretter filtrert for å få ut de ønskede eDNA restene

fra vannet. Filtreringen startet med at to vannslangene ble rensert med DI-vann og koblet opp

til den elektriske pumpen. I enden av en av vannslangene ble det montert et microfilter (< 1

micrometer; Sterivex, Whatman eller AcroCap) og den andre vannslangen ble plassert i en

vannprøve. Pumpen ble slått på og vannet ble sakte filtrert gjennom filteret. Det tok mellom

5min-20min per prøve, avhengig av både vannkvalitet og filtere brukt. Når det ikke kom mer

vann gjennom filteret, og pumpa tydelig begynte å slite ble filtreringen av den bestemte

prøven stoppet. Filteret ble fjernet fra slangen og markert med navn, dato og filternummer.

Annen nyttig data, som tid, mengde ml filtrert og eventuelle problemer, ble notert ned.

Prosessen ble gjentatt for alle vannprøvene.



Figur 1. topografisk bilde av borrevannet, med prøvetakingsplassene markert med tall. 1:VD, 2:BH, 3:SS, 4:SH. Foto: Statens kraftverk (NLOD)

Prøve nr. 1 – 7: filtrert
med Sterivex

Prøve nr. 8 – 18: filtrert
med Whatman

Prøve nr. 19 – 43: filtrert
med AcroCap

Positiv kontroller - Munnhuleslim og overflateslim fra ål:

For å kunne konkludere med at resultatene fra vannprøvene var positive eller negative var det nødvendig med positive kontroller som vi klart visste inneholdt ål-DNA. Til dette ble det brukt munnhuleslim og overflateslim fra en levende ål *Anguilla Anguilla* under godkjennelses system til Norske skog i Halden. 500µL metanol ble tilsatt til 1ml av prøvemateriale med overflateslimet og munnhuleslimet. I hvert sitt RNase-frie mikrosentrifugerør ble det tilsatt 1500µL slim løst i metanol og sentrifugert i 2 minutter. Deretter ble 500 µL metanol fjernet fra topplaget av væsken og så mye lysisbuffer som mulig, ca. 1 mL, tilsatt. Positivkontrollene ble satt på dypfrys (-148°C), ettersom de ikke skulle ekstraheres umiddelbart.

Positiv kontroller - Vevsprøve:

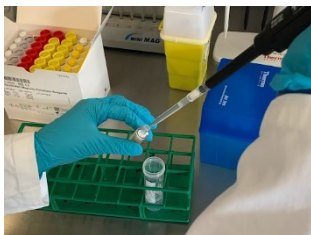
Det ble i tillegg laget to positivkontroller fra ål-vev. En liten bit (ca. et knappenålshode) ål-vev ble fjernet fra død ål (etter godkjennelse fra Statsforvalter i Vestfold) og plassert i et rør tilhørende et biomasher-kit. Ålen ble samlet inn og drept av organisasjonen NINA etter godkjennelse fra myndigheter. Deretter ble det tilsatt lysisbuffer (ca. 1mL) og vev-prøven ble most ved hjelp av kitet. Deretter ble prøvene ekstrahert og satt på dypfrys(-148°C).

Bestilling av oligomer

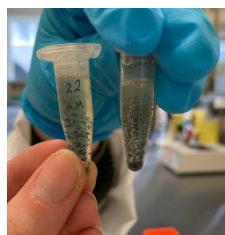
For å finne de mest hensiktsmessige husholdningsgenene hos ål brukte vi National Library of Medicine sin PubMed® database og applikasjonen Blastn. RNA polymerase sekvensene polr2j og polr1h ble vurdert som mest fremtredende av applikasjonen ettersom ålens celler må ha disse RNA polymerase-sekvensene for å overleve. Vi søkte opp «*Anguilla Anguilla* RNA polymerase I subunit H (polr1h), mRNA» og «*Anguilla Anguilla* RNA polymerase II subunit J (polr2j), mRNA» i Nukleotid-databasen MeSH, i NCBI. For å finne ut hvilke primere som skulle bestilles komponenter til brukte vi beacon design for PCR, og LAMP designer for LAMP. Fasta-sekvensen for denne begrensede delen av genomet ble kopiert inn i applikasjonen beacon design og LAMP designer. Resultatet ble forslag til primere for både PCR og LAMP. De viste også og hvordan de er bygd opp. Disse primerne fikk de forkortede navnene PII (polr2j) og PIH (polr1h) og består av ulike oligomer. Oligomene skulle fremstilles syntetisk for å kunne detektere RNA polymerase sekvensene PII og PIH, og ble bestilt hos eurofins gjennom Professor Frank Karlsen, og ved ankomst fortynnet i henhold til en gitt standard protokoll.

Manuell ekstrahering av DNA/RNA

Kittet som ble brukt til ekstraheringen av prøvene var «NUCLISENS magnetic Extraction Reagents (ref 200292) fra selskapet Biomerieux i Lyon, Frankrike. Før ekstraheringen derimot kunne skje måtte filtrene som ble satt i kjøleskap først bli tint. Hansker ble tatt på for å unngå kontaminering. Etter at filtrene hadde oppnådd romtemperatur ble det først tilsatt 500µL lysisbuffer i hvert filter, og deretter plassert på benken slik at de kunne bli inkubert i romtemperatur for 5 minutter (se figur 2). Etter dette ble den lyserte væsken pumpet ut av filtrene ved hjelp av sprøyte og overført over i nye 1.5 ml mikrosentrifugerør. Hvert rør ble plassert i et stativ sammen med 50µL silica magnetiske kuler fra kitet (se figur 3). Rørene ble inkubert i romtemperatur i 2 minutter samtidig som de ble forsiktig ristet på. Rørene ble plassert i et magnetisk stativ og den lyserte væsken ble fjernet fra røret med en mikropipette med tilsvarende pipette tipper (se figur 4). Rørene ble fjernet fra det magnetiske stativet og tilsatt 400µL av vaskebuffer 1. Vaskebuffer 1 ble inkubert i omtrent 2 min, samtidig som røret igjen ble ristet forsiktig på. Rørene ble plassert i det magnetiske stativet og vaskebuffer 1 ble så fjernet, men en mikropipette. Den samme prosessen ble gjennomført to ganger til, men nå en gang med 500µL vaskebuffer 2 og en siste gang med 400µL vaskebuffer 3. Deretter ble det tilsatt 100µL elueringsbuffer i hvert rør. Rørene med elueringsbuffer og magnetiske kuler med tilbudet arvemateriale ble plassert i en inkubator på 65°C i 2 min (se figur 4). Deretter ble rørene plassert i det magnetiske stativet for siste gang, og elueringsbufferen med arvemateriale ble fjernet fra rørene og overført til nye RNase-frie rør. Halvparten av det ferdig ekstraherte væsken ble plassert på dypfrys (-147°C) for å kunne bruke den i senere forsøk.



Figur 2: tilsetning av lysisbuffer, Foto: Privat



Figur 3: magnetiske kuler, Foto: Privat



Figur 4: magnetisk stativ, Foto: Privat



Figur 4: Inkubator, Foto: Privat

Mastermix for LAMP og PCR

Samme fremgangsmåte ble fulgt for både LAMP og PCR. Først ble det satt opp en utregning over hvor mange prøver som skulle testes. Samtidig ble det satt opp en tabell/disposisjon i programvaren StepOne™ over hvilke brønner som skulle inneholde hva. Totalt skulle 52 prøver testes og det ble derfor laget Mastermix til 55 reaksjoner, for å ha noen ekstra til eventuelt svinn under pipettering. For å blande komponentene til Mastermix ble alle de nødvendige reagensene tint mens resten satt på tørris for å unngå en nedbrytning av eDNA før det var ønskelig. Deretter

ble komponentene til Mastermix blandet i et RNase-fritt rør i henhold til tabeller (se figur 5 og 6). Det ble tilsatt 24µL Mastermix i brønnene markert i StepOne og 1µL ekstrahert DNA fra hver enkelt prøve i hver sin brønn. I negativekstraheringskontrollen ble det tilsatt 1µL RNase-fritt vann, og i negativkontrollen ble det tilsatt 25µL RNase-fritt vann. Mellom hver gang en prøve ble pipetert over til sin plass i brønnene ble de andre prøvene dekket med et papir for å unngå eventuell kontaminering. Til slutt ble hele brettet dekket med parafilm og plassert i StepOnePlus™ maskinen. Ved bruk av programvaren StepOne™ ble det valgt å kjøre enten PCR eller LAMP som target.

Komponenter	25µL reaksjon	10x reaksjon	55x reaksjon
WarmStart LAMP 2X Master Mix	12,50µL	125,0µL	687,5µL
LAMP Primer AA PII	2,500µL	25,00µL	137,5µL
LAMP fluoriserende farge	0,500µL	5,000µL	27,50µL
Ekstrahert arvemateriale	1,000µL	10 * 1,000µL	55 * 1,000µL
RNase-fritt H ₂ O	8,500µL	85,00µL	467,5µL
Totalt:	25,00µL	250,0µL	1375µL

Figur 5: Tabell for blandingsforhold til Mastermix for LAMP

Komponenter	25µL reaksjon	10x reaksjon	55x reaksjon
Takyon™ ROX Probe 2X Mastermix	10,00µL	100,0µL	550,0µL
<i>Anguilla Anguilla</i> A PCR primer	4,000µL	40,00µL	137,5µL
PCR fluoriserende farge	0,500µL	5,000µL	27,50µL
Ekstrahert arvemateriale	2,500µL	10 * 2,500µL	55 * 2,500µL
RNase-fritt H ₂ O	10,50µL	105,0µL	577,5µL
Totalt:	25,00µL	250,0µL	1375µL

Figur 6: Tabell for blandingsforhold til Mastermix for PCR

Deteksjon av *Anguilla Anguilla* med FORDETECT teknologien

Borrevannprøve nr. 21 ble tatt ut av fryseren (-148°C) og tint til romtemperatur ettersom den viste tidligst vekst i LAMP testen. Samtidig ble alle enhetene på FORDETECT instrumentet kalibrert i forhold til LOC kassetten som skulle brukes med programmet «DNA example tool». Alle de nødvendige autoscriptene ble hentet fra task manageren i samme program. Deretter ble FORDETECT kassetten fjernet fra instrumentet og det ble tilsatt 50µL silicakuler til EX chamber. Når dette var gjort ble lokket til EX chamber skrudd godt på og det ble forsikret at kammeret var tett. I tillegg ble det tilsatt 2,5µL primer mix og 0,5µL fluorescent dye (fra LAMP-kit) i hvert av de 8 micro reaksjons kamre i kassetten inkubert. Hele microRX-området ble så dekket med PCR-film. Kassetten ble så plassert tilbake inn i

instrumentet for å teste hver av ventilene individuelt. Når den ferdig filtrerte og lyserte prøven var ferdig tint ble 500µL av den tilsatt i V4. I tillegg ble det tilsatt 400µL vaskebuffer 1 i V, 400µL vaskebuffer 2 i V2, 400µL vaskebuffer 3 i V3 og 150µL LAMP WarmStart elueringsbuffer i V8.

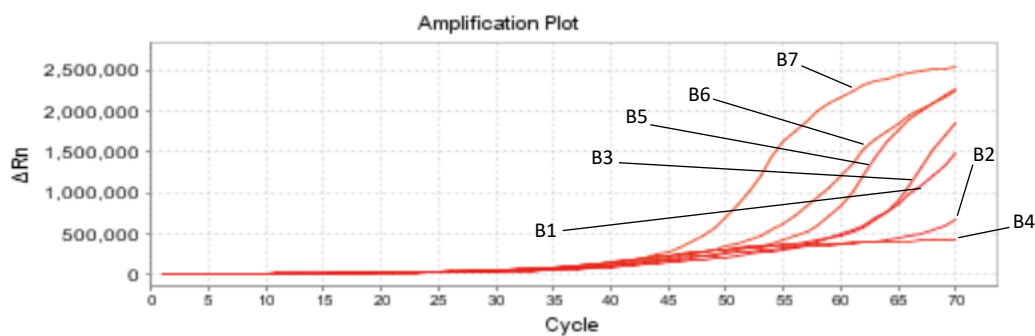
Først etter at alle de tidligere nevnte forberedelsene ble gjennomført startet selve ekstraheringen av prøven. Dette ble gjort ved å kjøre ferdiglagde autoscript som kunne føre væsken frem og tilbake mellom ønskede kammer i FORDETECT kassetten. Til slutt ble den eluerte vannprøven overført til reaksjonskammerne RX. Her ble det valgt ut en av de åtte reaksjonskammerne som hadde mest jevn fordeling av prøven (RX7 – FORDETECT kassetten). Detektoren på FORDETECT instrumentet, ESElog, som er i stand til å detektere endringer i fluorescent dye ble derfor kalibrert til å holde seg over kammer RX7. Programmet FLDigital ble startet og rådata ble samlet inn. Kurvene ble presentert i det digitale regnearket til FLDigital.

Resultater

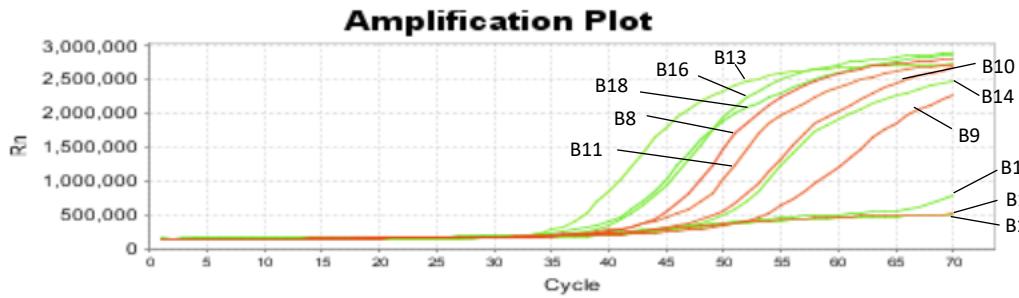
Prøvene er navngitt med bokstaven B, P og N, som står for borrevann-prøve, positiv kontroll og negativ kontroll. I tillegg til et korresponderende prøvenummer. Tabellene er delt opp basert på type filter og for negativ og positiv kontroll.

LAMP resultater

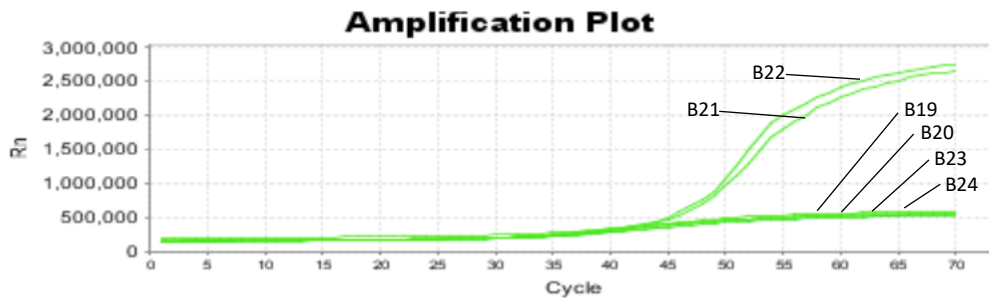
Prøve 1-7, filtrert med Sterivex:



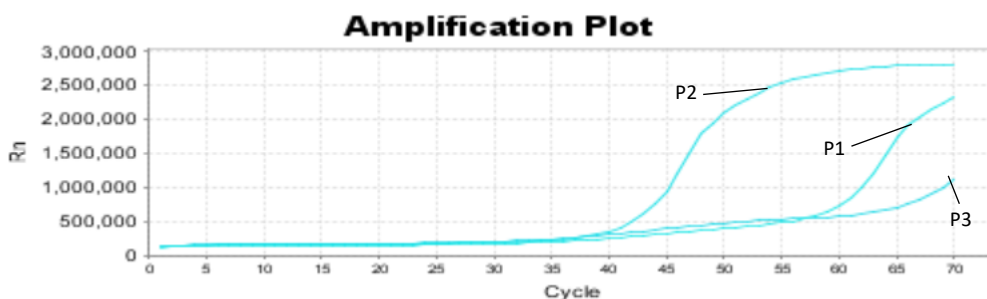
Den mest klart positive prøven filtrert med Sterivex er B7 ettersom man kan observere en tidlig stigning ved rundt CT-50. Dette betyr at ålen *Anguilla Anguilla* har blitt påvist i Borrevannet selv om den ikke ble sett mens dette prosjektet ble gjennomført. B5 og B6 har også en klart positiv stigning, men denne kommer ikke like tidlig som hos B7. B1 og B3 har en enda senere stigning over CT-60, som betyr at de med stor sannsynlighet er negative. B2 og B4 er klart negative.

Prøve 8 til 18, filtrert med WhatMan:

I prøve 8 til 18 filtrert med WhatMan er det langt flere klart positive prøver med en tidlig stigning før Ct-60 (prøve B8, B9, B10, B11, B13, B14, B16, og B17). Prøve B12, B15 og B17 er derimot klart negative.

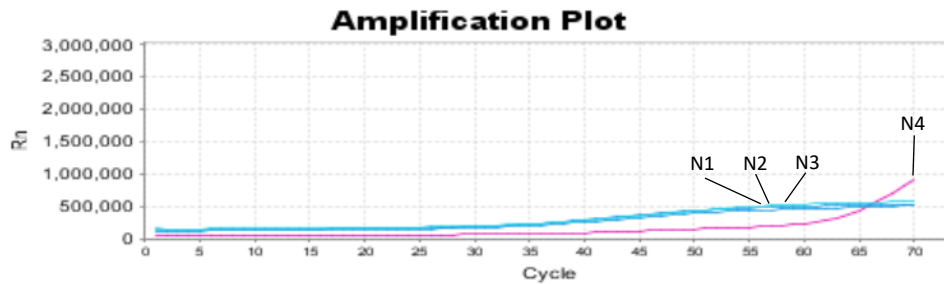
Prøve 19-24, filtrert med AcroCap:

Resten av prøvene (19- 43) ble filtrert med AcroCap filter, der bare de første 6 prøvene har graf etter feil med StepOnePlus™ maskinen. Bare B21 og B22 er klart positive med en klar stigning før Ct-50, mens B19, B20, B23, B24 er klart negative.

Positiv kontroll 1-3:

Alle positiv kontrollene opplever en viss stigning, men bare P2 kan bli ansett som klart positiv, men en stigning før Ct-60.

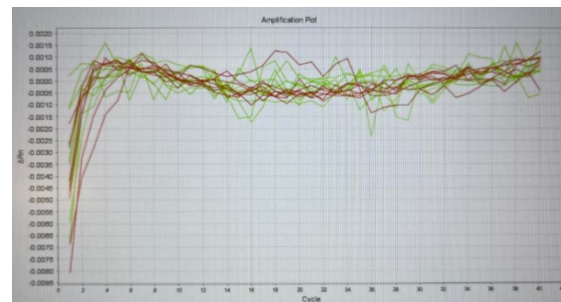
Negativ kontroll 1-4:



Alle negativ kontrollene er klart negative.

PCR resultater

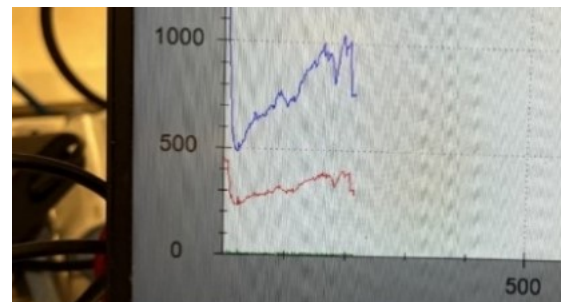
Resultatene fra PCR analysene viste at primerne som ble laget ikke virket. Som et resultat av dette viste grafen ingen fornuftige kurver; for eksempel hadde grafene en svært lav CT-verdi, som ikke stemmer overens med hvordan en typisk PCR graf ser ut. Resultatene kan dermed ikke brukes til videre analyse og diskusjon.



Figur 7: PCR resultater, Foto: Privat

FORDETECT resultater

Vår oppgave var å demonstrere at FORDETECT teknologien virket. Vi kjøre den lyserte prøven etter filtrering fra Borrevann prøve 21 (B21). Denne vannprøven var testet på laboratoriet på forhånd til å være positiv mot Ål. En vellykket test med de automatiske funksjonene på



Figur 8: FORDETECT resultater, Foto: Privat

FORDETECT instrument og kassett ble gjennomført inkludert rensing av RNA/DNA og automatisk amplifisering og deteksjon. Figur 8 viser vellykket automatisk deteksjon av *Anguilla Anguilla* RNA polymerase. Figuren viser et typisk positivt resultat av relative mengde-økning med fotoner fra en bakgrunn på 700 til et totalt resultat på 1000.

Diskusjon

LAMP

Prøve 1-7 var de første prøvene som ble filtrert og løst i lysisbuffer. Det er også hos disse prøvene man kan observere flere stigninger etter Ct-60. Dette kan forklares med at når en prøve blir positiv etter Ct-60 kan det være større sannsynlighet for feil og eventuelt dannelse av en falsk positiv eller negativ primer-dimer. Det er også mulighet at prøvene faktisk

inneholder eDNA, men at den høye Ct verdien skyldes nedbryting av arvematerialet. Dette kan komme av at de første syv prøvene sto lenge i fryser med lysisbuffer (91 dager, 16.september - 16.desember 2022) før de ble testet med LAMP. I den lange perioden mellom ekstrahering og testing kan det ha skjedd en nedbrytningsprosess av eDNA i prøvene, spesielt ettersom de har blitt tint til romtemperatur flere ganger. Med FORDETECT som i fremtiden kan være i stand til å automatisk ekstrahere prøver kan slike vente perioder bli unngått, som kan sikre klarere resultater.

Prøve 8-18 og 19-25 viser mer positive resultater som kommer relativt tidlig. Det kan komme fra den kortere tiden mellom ekstrahering og gjennomkjøring av LAMP, i motsetning til prøve 1-7.

Andre LAMP tester

Det er viktig å nevne at det ble gjennomført flere LAMP tester, men at ikke alle hadde brukelige resultater. Et gjentakende problem var at alle prøvene ble positive, samt begge negative kontrollene, som gjør det umulig å trekke noen konklusjoner. Hovedteorien om hvorfor resultatene ble slik på daværende tidspunkt var at prøvene ikke var tilstrekkelig tildekt under pipettering og at aerosoler med eDNA hadde forurenset prøvene underveis. Det er også sannsynlighet at det RNase-frie vannet som ble tilsatt til hver prøve allerede var kontaminert.

FORDETECT

FORDETECT er en prototype teknologi som enda ikke er standardisert. En av utfordringene var å få ventilene i kassetten til å fungere hver gang. Et annen utfordring var å sikre at alle reaksjonskammerne ble fylt hver gang. Dette førte til en reparasjonsperiode gjennom høsten og vinteren 2022. Kassetten som vi skulle bruke ble ikke klare fra Tyskland eller fra USN før juø. Derfor fikk vi kun muligheten til å teste én prøve med FORDETECT (B21), noe som gir et generelt dårlig grunnlag til sammenligning med de manuelle metodene.

Heldigvis gikk testingen av prøve B21 nesten feilfritt. Fra mengden data som ble samlet ved testingen viser grafen starten på en klart positiv prøve. En av hovedprobleme med testen var temperaturen i Rx kammeret. Som vi vet krever både LAMP og PCR høy temperatur for å lykkes med å detektere gen sekvensen vi er ute etter. Ved høy temperatur kan derimot væsker fordampe, og det skjedde med prøve B21 slik at den ikke steg over 1000. Som man ser på grafen for prøve B21 blir stigningen brått avbrutt etter bare noen minutter. Dette er fordi væsken i kammeret hadde fordampet. Likevel, rakk ESElog detektoren å registrere det knekkpunktet mellom relativ photonverdi på 700 og relativ photonverdi på 1000 som vi skulle

ha for å registrere positive prøver. Når Fordetect kassetten blir fullstendig standardisert og produsert i sin helhet med sprøytestøp og ikke inkludert freste områder vil avdampingen ikke skje. Dette fordi sprøytestøping støtter laserbonding og gjøre hele reaksjonsområde tett.

Konklusjon

I dette prosjektet har vi påvist eDNA/eRNA fra ål i vann med både manuelle molekylærbiologiske metoder som LAMP og PCR, og med bruk av prototypen for den nye automatiske lab-on-chip teknologien FORDETECT. Det var ikke mulig for oss å sammenligne godt nok FORDETECT mot de manuelle metodene som LAMP eller PCR brukt på laboratoriet med StepOnePlus™ maskinen. Dette fordi det ikke var tilgang på nok ferdige kassetter. FORDETECT vil de neste månedene blir prøveprodusert og klargjort for reell validering. Derfor ser vi helt klart mulighetene som teknologien representerer for samfunnet når den ferdigstilles som et produkt. Vi har i dette prosjektet brukt dagens mest nøyaktige og effektive prosesser for detektering av DNA og eDNA og tror at dette vil sikre at vi får bevart livskvaliteten til arter i vann over hele verdenen. Å kunne plassere maskiner som automatisk kan lete etter arter eller skadedyr i vann kan både gi oss mer forståelse for økosystemet, men også for hvilke tiltak som eventuelt må iverksettes for å bevare en god livskvalitet. Under prosjektet erfarte vi også at selv om de manuelle metodene for detektering av eDNA gir gode resultater, tar det tid før prøven blir tatt til den blir fraktet til labben og så undersøkt manuelt der. Det vil si at når FORDETECT-teknologien er ferdig utviklet, så kan denne brukes ute i felt til automatisk overvåkning av norske vassdrag «on-site in real-time». Dette vil være langt mer økonomisk bærekraftig i forhold til bruk av manuelle metoder som PCR og LAMP der resultatene foreligger etter en uke. Dette er en vesentlig grunn til å bruke FORDETECT framfor de manuelle metodene.

FORDETECT har stort potensiale innenfor blant annet miljøovervåkning og vi gleder oss til å følge utviklingen av denne nyskapende teknologien, og samfunnsnyttene denne teknologien vil få.

Referanser

Akerbæk, E. & Skiphamn, S. S., 2021. *10 spørsmål og svar om PCR-testene*. [Internett]
Available at: <https://www.faktisk.no/artikler/jy235/10-sporsmal-og-svar-om-pcr-testene>
[Funnet 27 januar 2023].

Anon., 2009. *nuclisens-easymag - biomerieux nordic*. [Internett]
Available at: <https://www.biomerieux-nordic.com/product/nuclisensr-easymagr>
[Funnet 12.11 2022].

Artsdatabanken, 2021. *Ål Anguilla Anguilla*. [Internett]
Available at: <https://artsdatabanken.no/taxon/Anguilla%20anguilla/42580>
[Funnet 30.11 2022].

centre for digital life norway, 2022. *digitallifenorway.org*. [Internett]
Available at: <https://www.digitallifenorway.org/research/lab-on-a-chip/>

Fossøy, F., u.d. *NINA*. [Internett]
Available at: <https://www.nina.no/miljo-DNA>
[Funnet 30 november 2022].

Havforskningsinstituttet, 2022. *havforskningsinsituttet*. [Internett]
Available at: <https://www.hi.no/hi/temasider/arter/al>
[Funnet 20 november 2022].

Horten Kommune, 2022. *Borrevannet*. [Internett]
Available at: <https://www.horten.kommune.no/kommunalomrader/kultur-og-samfunnsutvikling/natur-og-miljo/naturvern/borrevannet/>

Kaleta, C., 2022. *What are housekeeping genes? - National library of medicine*. [Internett]
Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9312424/>
[Funnet 12.11 2022].

Karlsen, F., 2011. *BioMEMS*. Borre: USN.

Karlsen, F., 2021. *Generell beskrivelse av teknologi*. Borre: USN.

kilobaser, 2022. *The Pain of Primer Dimer*. [Internett]
Available at: <https://kilobaser.com/the-pain-of-primer-dimer/>
[Funnet 29 januar 2023].

Kumarasami, S., 2020. *Automatic Detection of e-RNA using Point Of Care Lab-On Chip and Nucleic Acid Detection / Diagnosis device.*, Horten: University of South-Eastern Norway.

Laustsen, I., 2020. *En månelanding innen miljøovervåking*. [Internett]
Available at: <https://innovativeanskaffelser.no/blogg/en-manelanding-innen-miljoovervaking/>
[Funnet 16 september 2022].

Littlefair, J. E., Rennie, M. D. & Cristescu, M. E., 2022. *Environmental nucleic acids: A field-based comparison for monitoring freshwater habitats using eDNA and eRNA*, s.l.: Molecular ecology resources .

Miljolare, 2014. *Miljolare.no*. [Internett]
Available at: https://www.miljolare.no/artstre/?side=funn&land=578&or_id=795&orgkat=
[Funnet 30 November 2022].

Miljødirektoratet, 2023. *Automatisk miljøovervåking*. [Internett]
Available at: <https://innovativeanskaffelser.no/automatisk-miljoovervaking/>
[Funnet 2 februar 2023].

Naturvernforbundet, 2011. *naturvernforbundet.no*. [Internett]
Available at: <https://naturvernforbundet.no/dyr-og-planter/al/>
[Funnet 18 november 2022].

Norsk Helseinformatikk, 2020. *DNA og RNA*. [Internett]
Available at: <https://nhi.no/kroppen-var/fosterets-utvikling-embryologi/dna-og-rna/>
[Funnet 21 11 2022].

R Boom, C. J. S. M. M. S. C. L. J. P. M. W.-v. D. J. v. d. N., 1990. *Rapid and simple method for purification of nucleic acids.*, Amsterdam.: Journal of clinical microbiology.

ThermoFisher Scientific, 2022. *Thermo Fisher, StepOnePlus Real-Time PCR System*. [Internett]
Available at: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4376600>
[Funnet 27 januar 2023].

Vrålstad, T. & Strand, D. A., u.d. *veterinærinsittet*. [Internett]
Available at: <https://www.vetinst.no/fagomrader/miljo-dna>
[Funnet 18 november 2022].

Ying-Ying Li, X. C. J.-X. Y. Q. C. T.-Y. S. J.-Q. G., 2022. *Evaluation of housekeeping genes as references for quantitative real-time PCR analysis of European eel, Anguilla anguilla*, Fujian, Kina: National library of medicine.