

Analysuppdrag: 217145

LIMS-nummer: 23-0279

Uppdrag: Torsboda – Inventering av amfibier med eDNA

Uppdragsgivare: IVL Svenska Miljöinstitutet

Projektledare: Tage Vowles

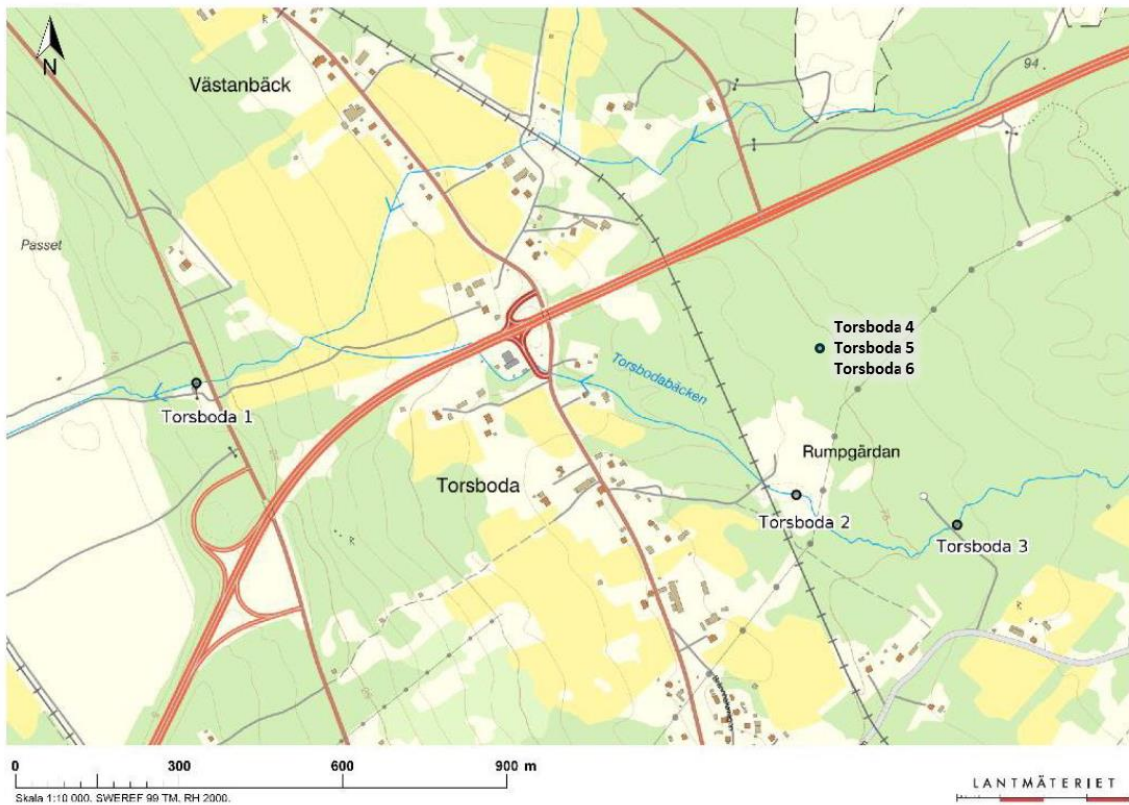
Ankomstdatum (prov): 2023-09-05, 2023-10-26 och 2024-10-24

Analysdatum och utförare: Extraktion: 2023-09-12 och 2023-10-31 Omneya Osman,
2024-10-25 Magdalena Grudzinska-Sterno. PCR: 2024-10-17 och 2024-10-30
Magdalena Grudzinska-Sterno. Sekvensering: 2024-11-01 och 2024-11-04 Omneya
Osman.

Uppdragets omfattning

Analys av miljö-DNA prov tagna i en bäck och en göl för detektion av amfibier med DNA-sekvensering och metabarkodning.

Tre punkter i Torsbodabäcken provtogs (Figur 1). Provtagning i bäcken skedde vid två tillfällen (2023-09-04 och 2023-10-19) och utfördes av Aquaticus Miljökonsulter AB. Vid första provtagningen filtrerades det mellan 2000 - 2500 ml vatten genom filtren och vid andra provtagningen filtrerades 3500 ml vatten genom varje filter (Tabell 1). En göl provtogs vid ett tillfälle (2024-10-23) och utfördes av personal från IVL Svenska Miljöinstitutet. Vid provtagningen filtrerades 1500ml vatten genom filtren (Tabell 1).



Figur 1. Karta över provtagningsområdet. Torsboda 1, Torsboda 2 och Torsboda 3 hänvisar till de tre provtagningslokalerna i Torsbodabäcken som provtogs 2023.

Torsboda 4, Torsboda 5 och Torsboda 6 hänvisar till tre provtagningsningar i gölen som provtogs 2024.

Tabell 1. Provöversikt med ID, volymmängder och provtagningsdatum. Notera att prover tagits vid två olika tillfällen år 2023 och att prover endast tagits vid ett tillfälle år 2024. Prover tagna 2024 analyserades två gånger där två olika PCR-protokoll använts, detta notera "O" och "N" i Prov ID (IVL).

Prov ID (Kund)	Prov ID (IVL)	LIMS-nr. (IVL)	Volym (ml)	Provtagningsdatum	Provtagningslokal
TORSBODA1	TORS1	326907	2500	2023-09-04	Torsboda 1
TORSBODA2	TORS2	326908	2400	2023-09-04	Torsboda 2
3	TORS3	326909	2000	2023-09-04	Torsboda 3
Torsboda 1	TB1.2	332442	3500	2023-10-19	Torsboda 1
Torsboda 2	TB2.2	332443	3500	2023-10-19	Torsboda 2
Torsboda 3	TB3.2	332444	3500	2023-10-19	Torsboda 3
Torsboda 1.1	TB4O	376790	1500	2024-10-23	Torsboda 4
Torsboda 1.2	TB5O	376791	1500	2024-10-23	Torsboda 5
Torsboda 2	TB6O	376792	1500	2024-10-23	Torsboda 6
Torsboda 1.1	TB4N	376790	1500	2024-10-23	Torsboda 4
Torsboda 1.2	TB5N	376791	1500	2024-10-23	Torsboda 5
Torsboda 2	TB6N	376792	1500	2024-10-23	Torsboda 6

Samtliga prover skickades till IVLs laboratorium i Stockholm efter provtagning. Totalt analyserades 12 prover för amfibier.

Resultat och slutsatser

DNA från amfibier detekterades i åtta av tio prover. Vid sekvensanalysen matchades detekterat DNA till tre amfibiearter: Vanlig groda (*Rana temporaria*), vanlig padda (*Bufo bufo*) och mindre vattensalamander (*Lissotriton vulgaris*) (Tabell 2).

Tabell 2. Provöversikt som visar vilka prover som DNA från amfibier detekterats samt matchande art vid sekvensering.

Prov ID (Kund)	Prov ID (IVL)	Vanlig groda <i>Rana temporaria</i>	Vanlig padda <i>Bufo bufo</i>	Mindre vattensalamander <i>Lissotriton vulgaris</i>
TORSBODA1	TORS1			
TORSBODA2	TORS2	X		
3	TORS3	X		
Torsboda 1	TB1.2	X	X	
Torsboda 2	TB2.2		X	
Torsboda 3	TB3.2	X		
Torsboda 1.1	TB4O	X		
Torsboda 1.2	TB5O			
Torsboda 2	TB6O			
Torsboda 1.1	TB4N	X		
Torsboda 1.2	TB5N			X
Torsboda 2	TB6N	X		

Rapport utförd av

Natalie Danielsson

Rapporten granskad av

Mikael Olshammar

Stockholm, 2024-11-25, IVL Svenska Miljöinstitutet AB

Utdrag från denna rapport får endast återges om IVL Svenska Miljöinstitutet AB tydligt anges som källa och data inte förändras.

Provhantering/upparbetning

Vattenproven från Torsbodabäcken filterades genom 0,45 µm Sylphium-filter, konserverades med ATL-buffert. Vattenproven från gölen filterades genom 0.8 µm Sylphium-filter, konserverades med ATL-buffert. Efter provtagning skickades proverna till IVL Svenska Miljöinstitutets laboratorium i Stockholm.

DNA-analysmetod

Extraktion och PCR prover tagna i Torsbodabäcken 2023:

DNA extraherades med DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Cat. No. / ID: 69504) med ett protokoll anpassat för Sylphium-filter.

Extraherat DNA renades med Agencourt AMPure XP-kulor (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) och koncentrationerna mättes med Qubit Flex Fluorometer (Tabell 3; ThermoFisher, USA) innan vidare analys.

Tabell 3. Prover som analyserats i projektet samt koncentrationer som uppmätts efter DNA-extraktion. Kvoten A260/A280 avser extraktionens renhet där ~1.8 anses vara ett rent prov.

Provnamn (kund)	Provnamn (IVL)	LIMS-nummer (IVL)	DNA [ng/µl]	A260/A280
TORSBODA1	TORS1	326907	98.600	1.857
TORSBODA2	TORS2	326908	55.750	2.057
3	TORS3	326910	25.450	2.424
Torsboda 1	TB1.2	332442	193.50	1.712
Torsboda 2	TB2.2	332443	38.850	1.778
Torsboda 3	TB3.2	332444	185.10	1.610

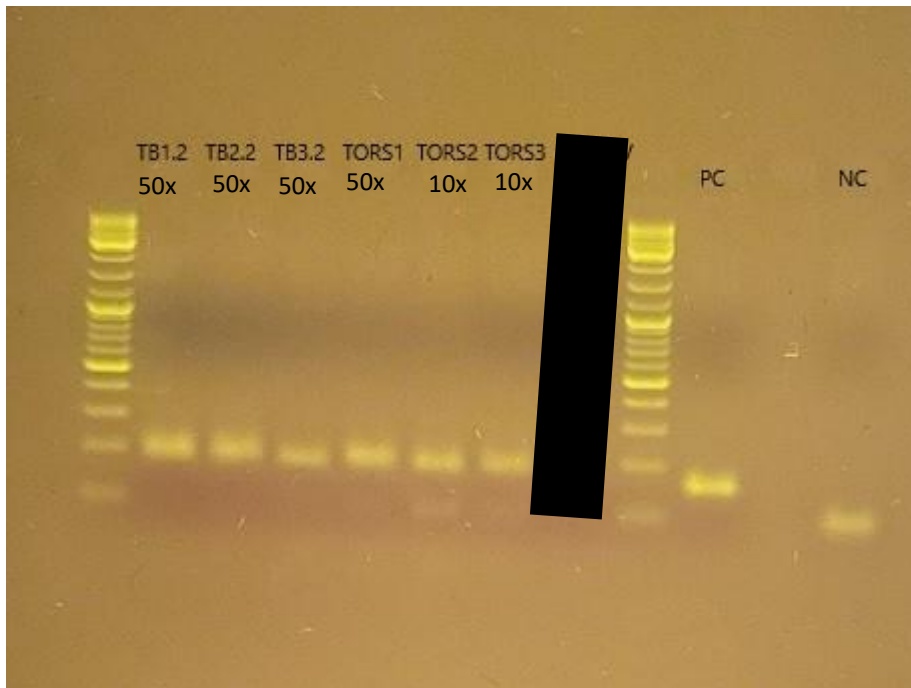
Seriell spädning av extraherat DNA användes för PCR (för att undvika effekter av potentiella inhibitorer i proverna).

DNA-amplifiering utfördes i en slutlig volym av 20 µl innehållande 1X Q5 High Fidelity 2X MasterMix (New England Biolabs), 0,2 µM batra primers (Tabell 4), 4 µM batra human blocking primer, 0,5 mg/ml BSA, 3µl DNA och 4,1 ml DNA free water.

Tabell 4. Primersekvenser som använts för PCR-reaktionerna (Valentini et al. 2015).

Namn	Sekvens (5'-3')
batra_F	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACACCGCCCGTCACCCT
batra_R	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTAYACTTACCATGTTACGACTT
batra_blk	TCACCCTCCTCAAGTATACTTCAAAGGCA-SPC3I

PCR-programmet bestod av: 30 sec 98°C; 35 cykler av [20 s. 98°C, 30 s. 57°C, 60 s. 72°C]; 7 min. 72 °C. PCR-produkternas storlek visualiserades med Invitrogen™ SYBR™ Safe DNA Gel Stain på en 2% agarosgel (Figur 2).



Figur 2. Resultat av gelelektrofores utförd av IVL för prover samlade i 2023. DNA-stege, TB1.2, TB2.2, TB3.2, TORS 1, TORS 2, TORS 3, DNA-stege, PC (positiv kontroll), NC (negativ kontroll, innehållande endast vatten). "PC" visar resultatet av amplifiering av referens-DNA från Blåprickig mullvadssalamander (*Ambystoma laterale*).

Extraktion och PCR för prover tagna i gölen 2024:

DNA extraherades med Genfind V3 Reagent Kit (Beckman Coulter, Cat. No. / ID: C34881) med protokoll anpassat för Sylphium-filter. Koncentrationerna mättes med Implen Nanophotometer N60 (Tabell 5).

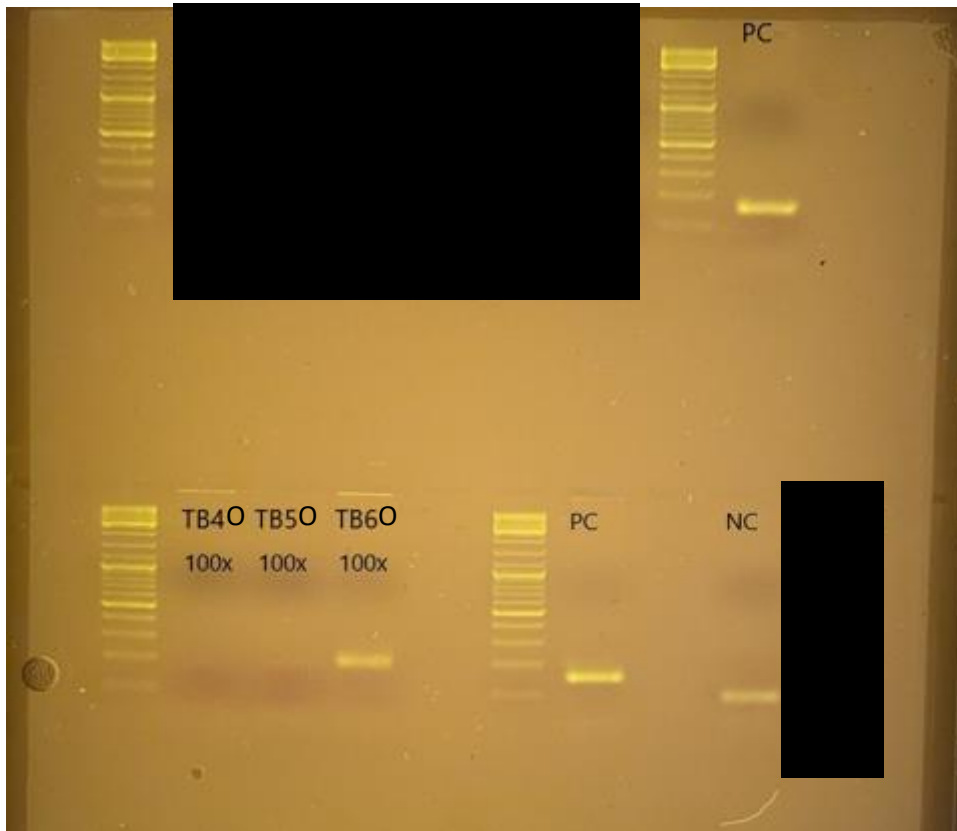
Tabell 5. Prover som analyserats i projektet samt koncentrationer som uppmätts efter DNA-extraktion. Kvoten A260/A280 avser extraktionens renhet där ~1.8 anses vara ett rent prov.

Provnamn (kund)	Provnamn (IVL)	LIMS-nummer (IVL)	DNA [ng/μl]	A260/A280
Torsboda 1.1	TB4O	376790	2696.5	1.501
Torsboda 1.2	TB5O	376791	253.15	1.576
Torsboda 2	TB6O	376792	502.50	1.645
Torsboda 1.1	TB4N	376790	2696.5	1.501
Torsboda 1.2	TB5N	376791	253.15	1.576
Torsboda 2	TB6N	376792	502.50	1.645

Seriell spädning av extraherat DNA användes för PCR (för att undvika effekter av potentiella inhibitorer i proverna).

DNA-amplifiering utfördes i en slutlig volym av 20 μl innehållande 1X Q5high fidelity 2X mastermix (New England Biolabs), 0,2 μM batra primers (Tabell 4), 4 μM batra human blocking primer, 0,5 mg/ml BSA, 3μl DNA och 4,1 ml DNA free water.

Proverna analyserades initialt med samma PCR-protokoll som användes 2023 (Figur 3).



Figur 3. Resultat av gelelektrofores utförd av IVL för prover från 2024 analyserade med samma protokoll som för prover från 2023. DNA-stege, PC (positiv kontroll), NC (negativ kontroll innehållande endast vatten), TB4O, TB5O, TB6O. "PC" visar resultatet av amplifiering av referens-DNA från Blåprickig mullvadssalamander (*Ambystoma laterale*).

Efter utvärdering analyserades proverna ytterligare med ett modifierat PCR-protokoll: 3 min 98°C; 35 cykler av [30 s. 98°C, 30 s. 57°C, 45 s. 72°C]; 7 min. 72 °C. PCR-produkternas storlek visualiserades med Invitrogen™ SYBR™ Safe DNA Gel Stain på en 2% agarosgel (Figur 4). Prover analyserade med samma protokoll från 2023 är märkta "O" och prover analyserade med nytt protokoll är märkta "N" (Tabell 1).



Figur 4. Resultat av gelelektrofores utförd av IVL för prover från 2024 analyserade med modifierat PCR-protokoll. DNA-stege, PC (positiv kontroll), NC (negativ kontroll innehållande endast vatten), TB4N, TB5N, TB6N. "PC" visar resultatet av amplifiering av referens-DNA från Blåprickig mullvadssalamander (*Ambystoma laterale*).

Rening av samtliga prover (2023 och 2024):

Extraherat DNA renades med Agencourt AMPure XP-kulor (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) och koncentrationerna mättes med Qubit Flex Fluorometer innan vidare analys.

Biblioteksförberedelser och sekvensering

Ett sekvenseringsbibliotek skapades från de renade PCR-produkterna med Native Barcoding kit V14 (SQK-NBD114.24) enligt tillverkarens instruktioner (Oxford Nanopore Technologies). Bibliotek sekvenserades sedan i 24 timmar med Oxford Nanopore MinION-plattformen på en MinION Flongel Flow Cell (R10.4.1).

Sekvensanalys

Rådata analyserades sedan med MinKNOW v23.07.12 och FLO-MIN114/FLO-PRO114/M DNA Kit 14 (400bps) – Super Accurate basecalling vilket resulterade i 193059 sekvenser (Tabell 6). Dessa jämfördes sedan med referenssekvenserna i databasen *Swedish_amphibians_reference_v0.2.fasta* som innehåller referenssekvenser från samtliga svenska amfibier. Resultatet för varje prov kontrollerades sedan manuellt.

Tabell 6. Antal DNA-sekvenser som genererades per prov.

Provnamn (kund)	Provnamn (IVL)	LIMS-nummer (IVL)	Antal DNA-sekvenser
TORSBODA1	TORS1	326907	16877
TORSBODA2	TORS2	326908	17588
3	TORS3	326910	16129
Torsboda 1	TB1.2	332442	15372
Torsboda 2	TB2.2	332443	18105
Torsboda 3	TB3.2	332444	13354
Torsboda 1.1	TB4O	376790	1594
Torsboda 1.2	TB5O	376791	2841
Torsboda 2	TB6O	376792	28030
Torsboda 1.1	TB4N	376790	4069
Torsboda 1.2	TB5N	376791	17468
Torsboda 2	TB6N	376792	20652

Referenser

Valentini, Alice & Taberlet, Pierre & Miaud, Claude & Civade, Raphaël & Herder, Jelger & Thomsen, Philip & Bellemain, Eva & Besnard, Aurélien & Coissac, Éric & Boyer, Frédéric & Gaboriaud, Coline & Jean, Pauline & Poulet, Nicolas & Nicolas, Roset & Copp, Gordon & Geniez, Philippe & Pont, Didier & Argillier, Christine & Baudoin, Jean-Marc & Dejean, Tony. (2015). Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular ecology*. 25. 10.1111/mec.13428.