

Analysuppdrag: 219880

LIMS-nummer: 25-0171

Uppdrag: Groddjursanalys

Uppdragsgivare: Väg och Miljö

Projektledare: Natalie Danielsson

Ankomstdatum (prov): 2025-06-23

Analysdatum och utförare: Extraktion: 2025-06-25, PCR: 2025-06-25 och 2025-06-26,
Rengöring: 2025-07-01 Magdalena Grudzinska-Sterno

DNA-sekvensering utförd av: BMKGENE

Bioinformatisk analys: 2025-08-11, Mikael Dahl

Uppdragets omfattning

Analys av fyra miljö-DNA prov (Tabell 1) för detektion av amfibier (groddjur och salamandrar) med DNA-sekvensering och metabarkodning. Provtagning i fält utfördes av uppdragsgivaren 2025-06-10. Mellan 960-1220ml vatten filtrerades och proverna skickades sedan till IVL:s laboratorium i Stockholm.

Tabell 1. Provöversikt med ID, volymmängder, provtagningsdatum och provtagningslokal.

Provnamn (kund)	Provnamn (IVL)	Volym (ml)	Provtagningsdatum	Provtagningslokal
1896 upp	1K-U	960	2025-06-10	Karlskoga
1896 dam	2K-D	1220	2025-06-10	Karlskoga
1896 ned	3K-N	1050	2025-06-10	Karlskoga
1956 pöl	4K-P	1050	2025-06-10	Kristinehamn

Resultat och slutsatser

DNA från amfibier detekterades inte i något utav proven.

Rapport utfärdad av

Natalie Danielsson

Rapporten granskad av

Mikael Olshammar

Stockholm, 2025-08-19, 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

Vattenprovet filtrerades genom 0.8 µm Sylphium-filter, konserverades med ATL-buffert, och skickades till IVL Svenska Miljöinstitutets laboratorium i Stockholm.

DNA-analysmetod

DNA extraherades med Genfind V3 Reagent Kit (Beckman Coulter, Cat. No. / ID: C34881) med protokoll anpassat för Sylphium-filter. Koncentrationerna mättes med QubitFlex Fluorometer (Tabell 3).

Vid extraktion användes olika typer av kontrollprover utan DNA för att försäkra att extraktion gjordes utan kontamination. Kontroll innehållande endast vatten: WCK och NCEK. Kontroll innehållande endast buffer: BCK.

Tabell 3. Prover som analyserats i projektet samt koncentrationer som uppmätts efter DNA-extraktion.

Provnamn (kund)	Provnamn (IVL)	LIMS-nummer (IVL)	DNA [ng/µl]
1896 upp	1K-U	406227	6.99
1896 dam	2K-D	406228	43.5
1896 ned	3K-N	406229	9
1956 pöl	4K-P	406230	73.5

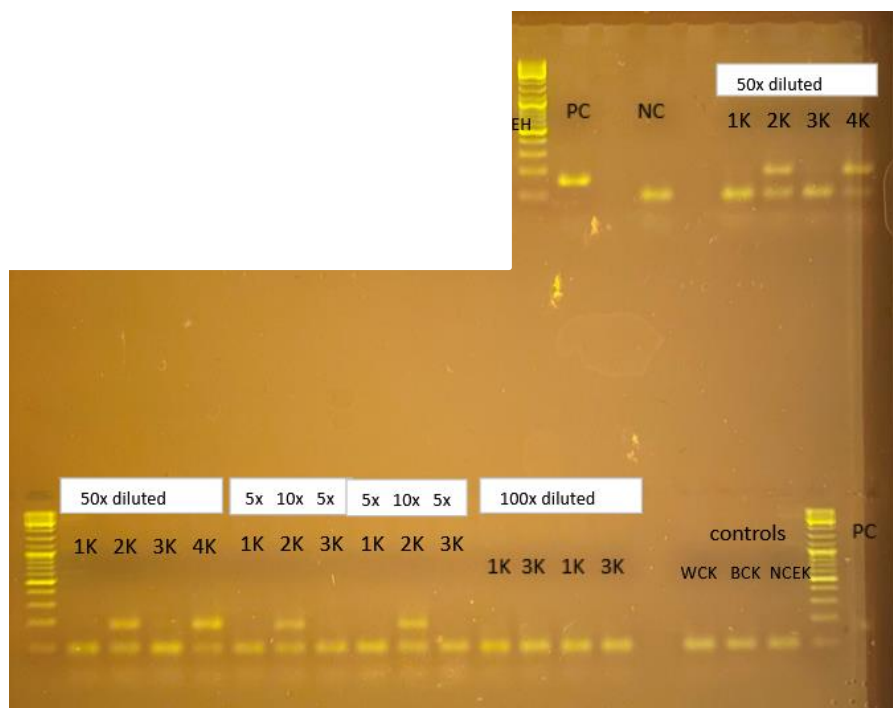
Seriell spädning av extraherat DNA användes för PCR (för att undvika effekter av potentiella inhibitorer i proverna).

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 µl DNA free water.

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

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

PCR-programmet bestod av: 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 1).



Figur 1. Resultat av gelelektrofores. DNA-stege, PC (positiv kontroll), NC (PCR negativ kontroll innehållande vatten istället DNA), analyserade prover: 1K-U, 2K-D, 3K-N, 4K-P, kontroll av extraktion med vatten: WCK, kontroll av extraktion med buffer: BCK, kontroll av extraktion med vatten: NCEK, DNA-stege, "PC" visar resultatet av amplifiering av referens-DNA från Blåprickig mullvadssalamander (*Ambystoma laterale*).

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

Biblioteksförberedelser och sekvensering

Proverna sekvenserades av BMKGENE med plattformen Illumina NovaSeq 6000, PE-250.

Bioinformatisk analys

Sekvensdata analyserades med nf-core/ampliseq v2.14.0 (<https://nf-co.re/ampliseq>) och en referensdatabas innehållande sekvenser från samtliga 13 svenska amfibiearter (Swedish_amphibians_reference_v0.2.fst) med följande inställningar:

```
nextflow run nf-core/ampliseq \
-r 2.14.0 \
-c nextflow.config \
-profile singularity \
--illumina_novaseq \
--input vag_och_miljo_samples.tsv \
--FW_primer ACACCGCCCGTCACCCT \
--RV_primer GTAYACTTACCATGTTACGACTT \
--double_primer \
--ignore_failed_trimming \
--dada_ref_tax_custom
/home/git/Reference_databases/Amphibians/Sweden/12S/Swedish_amphibians_reference_v0.2.fst \
--dada_ref_tax_custom_sp
/home/git/Reference_databases/Amphibians/Sweden/12S/SP_Swedish_amphibians_reference_v0.2.fst
--dada_assign_taxlevels Domain,Phylum,Class,Order,Family,Genus,Species \
--outdir "./results_219976_219880_amphibian_analysis1" \
--max_memory "45 GB" \
--max_cpus 10 \
```

Tabell 5. Resultatet av DNA-sekvenseringen och den bioinformatiska analysen.

Provnamn (kund)	Provnamn (IVL)	Råsekvenser	Antal ASV'er
1896 upp	1K-U	9119	7380
1896 dam	2K-D	74005	61004
1896 ned	3K-N	13099	10366
1956 pöl	4K-P	21925	18432

Tabell 6. Resultatet av DADA2-analysen rapporterad av nf-core/ampliseq till DADA2_stats.tsv.

Prov	DADA2 input	Filtrerade sekvenser	DenoisedF	DenoisedR	Sekvenser med överlapp	Icke-chimärer
AM1K-U	9119	8110	7935	7984	7419	7380
AM2K-D	74005	67618	66909	67185	63693	61004
AM3K-N	13099	11757	11640	11603	10826	10366
AM4K-P	21925	19948	19591	19691	18538	18432