

Protokol za ne-destruktivno metabarkodiranje DNK vzorcev združb travniških nevretenčarjev

Protokol za nedestruktivno DNA metabarkodiranje uzoraka travnjačkih zajednica beskralješnjaka



V: 1.0 (2025)



NACIONALNI INŠTITUT ZA BIOLOGIJO
NATIONAL INSTITUTE OF BIOLOGY



**ŽUMBERAK
SAMOBORSKO
GORJE**
Park prirode
Nature Park

Hrvatski
prirodoslovni
muzej



Croatian
Natural History
museum

"Projekt je sofinanciran iz sredstev Evropskog sklada za regionalni razvoj v okviru Interreg programa Slovenija-Hrvaška
/ Projekt je sufinanciran sredstvima Evropskog fonda za regionalni razvoj u okviru Interreg programa Slovenija-
Hrvatska"

Protokol za ne-destruktivno metabarkodiranje DNA vzorcev združb travniških nevretenčarjev je nastal v okviru Interreg Slovenija Hrvatska projekta Carex (delovni paket 2) / [Protokol za nedestruktivno metabarkodiranje uzoraka DNA travnjačkih zajednica beskralješnjaka nastao je kao dio Interreg Slovenija Hrvatska projekta CarEx \(radni paket 2\).](#)

Protokol je dostopen samo v elektronski obliki / [Protokol može se dobiti samo u elektronskoj verziji.](#)

Tekst: dr. David Stanković

Prevod: Damjan Milošević, dr. Martina Podnar

Fotografije: Davorin Tome

Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana

Verzija 1.0, 2025

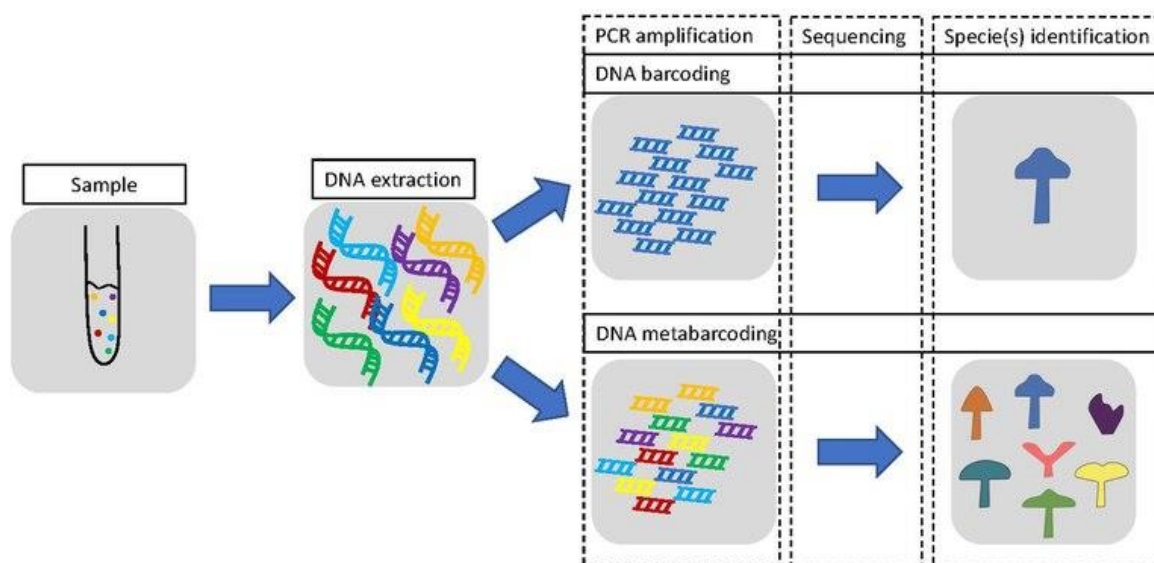
Uvod / Uvod

V genetiki barkoda imenujemo odsek na DNA ali RNA, ki nosi določeno informacijo / zapis. Zapis je vrstno značilen, podobno kakor se barkoda na izdelkih v trgovini nanaša na točno določen artikel. Metoda, s katero vrsto na osnovi DNA barkode določimo se imenuje DNA barkodiranje. DNA metabarkodiranje je okoli 20 let stara metoda, ki v proučevanem vzorcu hkrati analizira barkode vseh prisotnih taksonomskih enot in ne le ene, posamezne vrste (slika 1). Na ta način dokaj hitro in enostavno dobimo informacijo o združbi, ki smo jo analizirali.

Postopek DNA metabarkodiranja, ko je vzorec enkrat nabran, začne z izolacijo DNA iz organizmov v vzorcu. Naslednji korak je, da se pridobljeni deli DNA pomnožijo v zadostnem številu, da jih lahko v tretjem koraku zaznamo in z informacijskim orodjem določimo. Vse vrste v vzorcu na ta način določimo v enem »zamahu«. Postopek omogoča zaznavanje širokega spektra organizmov, vključno z mikroorganizmi, rastlinami, živalmi in glivami, s čimer ponuja globok vpogled v biotsko raznovrstnost in funkcionalnost ekosistemov. Metoda je še posebej uporabna pri preučevanju kompleksnih ekosistemov, kjer tradicionalne metode zbiranja in analize vrst pogosto niso učinkovite. Stopnjo natančnosti analize vzorca je odvisna tudi od razpoložljivih referenčnih sekvenčnih baz podatkov za posamezne vrste (vrstno specifične barkode).

S tradicionalno metodo do istega rezultata pridemo tako, da v nabranem vzorcu najprej ročno presortiramo taksonomske enote glede na sorodnost (npr. na polže, muhe, kobilice, ipd.), kar samo po sebi v nekoliko večjih vzorcih lahko pomeni nekaj dni dela. Nakar je treba vse izbrane in presortirane osebkke še določiti. Za zanesljivo določanje rabimo vrhunske strokovnjake - taksonome, za vsako širšo skupino svojega. Njihovo delo je povezano z bistveno večjimi stroški kakor so stroški metode izolacije in pomnoževanja pri DNA metabarkodiranju. Poleg tega so dobri taksonomski strokovnjaki pogosto zelo zasedeni, tako da bi rezultate o vrstni sestavi v nabrani združbi lahko najbolj optimistično pričakovali morda šele eno leto po tem, ko bi vzorec nabrali. V praksi se pogosto tudi izkaže, da za nekatere skupine v vzorcih niti ne bi dobili strokovnjakov, tako da bi bila analiza vrstne sestave združbe v vzorcu pomanjkljiva.

Prednost DNA metabarkodiranja pred klasičnim pristopom je torej v hitrosti pridobivanja rezultatov, v nižjih stroških in v tem, da je analiza biodiverzitete načeloma bolj popolna. Slabost metode je v tem, da je določanje vrst zaenkrat manj natančno, kakor, če vrste določajo strokovnjaki taksonomi. Z razvojem metode ocenjujemo, da se bo ta razlika zmanjševala.



Slika 1: Shema razlike med metodo DNA metabarkodiranja (spodnja polovica) in DNA barkodiranja (zgornja polovica; Sample= vzorec; DNA extraction = izolacija DNA, PCR amplification = PCR pomnoževanje; Sequencing = sekvencioniranje; Specie(s) identification = določene vrste. Avtor slike: David CasMor. / Shema razlike između metode DNA metabarkodiranja (donja polovica) i DNA barkodiranja (gornja polovica; Sample = uzorak; DNA extraction = izolacija DNA, PCR amplification = PCR amplifikacija; Sequencing = sekvenciranje; Specie(s) identification = određivanje vrste. Avtor slike: David CasMor ,

V tem delu predstavljamo protokol laboratorijskega dela za ne-destruktivno DNA metabarkodiranje, s katerim pridemo do rezultatov vrstne raznolikosti nevretenčarjev v vzorcih nabranih na travnikih in hkrati primerkov v vzorcih ne uničimo. Protokol ne vključuje postopkov bioinformacijskega dela določanja, ki običajno sledi laboratorijskemu delu. Namen protokola je, da bi z njim omogočili primerljivo določanje vrst, kar pomeni, da lahko kdorkoli, ki se bo držal protokola dobi rezultate, ki jih bo lahko neposredno primerjal z našimi. Cilj je, da bi se protokol uporabljal na čim več institucijah, saj bi na ta način pridobili ogromno pomembnih, primerljivih informacij o biodiverziteti nevretenčarske favne na travnikih. Metodo nabiranja nevretenčarjev na travnikih smo standardizirali v drugem protokolu, ki je dostopen na [www: https://www.nib.si/projektinib?view=project&id=486](https://www.nib.si/projektinib?view=project&id=486) in na https://www.hpm.hr/hr/EU_projekti.

U genetici, barkod predstavlja specifičnu DNA ili RNA sekvencu. Ta sekvenca ili slijed je specifičan za vrstu, slično kao što se barkod na proizvodima u trgovini odnosi na određeni artikl. Metoda kojom se vrste određuju na temelju DNA barkodova naziva se DNA barkodiranje. DNA metabarkodiranje je metoda stara oko 20 godina koja istovremeno analizira barkodove svih taksonomskih jedinica prisutnih u proučavanom uzorku, a ne samo jedne, pojedinačne vrste (slika 1). Na taj način možemo prilično brzo i jednostavno doći do informacija o biološkoj zajednici koju smo analizirali.

Proces DNA metabarkodiranja, nakon prikupljanja uzorka, započinje izolacijom DNA iz organizama prisutnih u uzorku. Sljedeći korak je umnažanje dobivenih fragmenata DNA u dovoljnom broju kopija kako bi im se mogao očitati slijed i odrediti pripadnost vrsti korištenjem bioinformatičkih alata. Na taj se način sve vrste u uzorku determiniraju u jednom "potezu". Proces omogućuje detekciju širokog spektra organizama, uključujući mikroorganizme, biljke, životinje i gljive, čime pruža dubok uvid u biološku raznolikost i funkcionalnost ekosustava. Metoda je posebno korisna u proučavanju složenih ekosustava, gdje su tradicionalne metode prikupljanja i analize vrsta često neučinkovite. Razina točnosti analize uzorka također ovisi o kompletnosti baza podataka DNA sekvenci za pojedine vrste (specifični barkodovi vrste).

Tradicionalnom metodom isti rezultat postizemo tako da organizme u prikupljenom uzorku najprije ručno razvrstamo po srodnosti u taksonomske skupine (npr. puževi, muhe, skakavci i sl.), što kod većih uzoraka može zahtijevati višednevni rad. Nakon toga još treba identificirati sve odabrane i predsortirane primjerke. Za pouzdanu determinaciju potrebni su nam vrhunski stručnjaci – taksonomi, po jedan za svaku širu skupinu. Njihov rad povezan je sa znatno višim troškovima od troškova metode izolacije i amplifikacije u DNA metabarkodiranju. Nadalje, dobri taksonomi često su vrlo zaposleni, tako da je i u najoptimističnijem slučaju rezultate o vrstnom sastavu prikupljenog uzorka moguće očekivati možda tek godinu dana nakon prikupljanja uzorka. U praksi se često pokaže da za neke skupine u uzorcima ne bismo niti pronašli stručnjake, pa bi analiza vrstnog sastava zajednice bila nepotpuna.

Prednost DNA metabarkodiranja u odnosu na klasični pristup je stoga brzina dobivanja rezultata, niži troškovi i činjenica da je analiza bioraznolikosti u načelu potpunija. Slabost metode je u tome što je determinacija vrsta trenutno manje precizna nego kada vrste determiniraju stručnjaci taksonomi. Kako se metoda bude razvijala, procjenjujemo da će se ta razlika smanjivati.

U ovom radu predstavljamo laboratorijski protokol za nedestruktivno DNA metabarkodiranje, koji nam omogućuje dobivanje rezultata o raznolikosti vrsta beskranješkaka u uzorcima prikupljenim s travnjaka bez uništavanja primjeraka u uzorcima. Protokol ne uključuje postupke bioinformatičke analize koja obično slijedi nakon rada u laboratoriju. Svrha protokola je omogućiti usporedivu determinaciju vrsta, odnosno osigurati da svatko tko slijedi protokol može dobiti rezultate koji se mogu izravno usporediti s našima. Cilj nam je je da se protokol koristi u što većem broju institucija, jer bi to pružilo obilje važnih, usporedivih

CarEx

informacija o bioraznolikosti faune beskrležnjaka na travnjacima. Način sakupljanja beskrležnjaka na livadama standardiziran je u drugom protokolu koji je dostupan na

<https://www.nib.si/projektinib?view=project&id=486> i

https://www.hpm.hr/hr/EU_projekti.

Uvod v protokol / Uvod u protokol

Protokol vsebuje navodila za metabarkodiranje DNK (*ang.* DNA metabarcoding), ki poteka v treh korakih:

1. ne-destruktivna izolacija DNK iz nesortiranih vzorcev travniških združb nevretenčarjev ;
2. priprava sekvenčnih knjižnic ;
3. NGS (next-generation sequencing) skevenciranje za hkratno določanje črtnih kod DNK različnih osebkov oz. za hkratno zaznavo prisotnosti mnogih taksonov v enem vzorcu.

Protokol je modifikacija protokola FAVIS (Iwaszkiewicz-Eggebrecht et al., 2023) in je optimiziran za visoko prepustno obdelavo nesortiranih vzorcev travniških združb, ki smo jih vzorčili s kečerjem. Aktivnosti v protokolu so razdeljene v štiri sekcije:

1. Priprava delovnega prostora;
2. Obdelava vzorcev – dekantiranje etanola, tehtanje mokre biomase, ne-destruktivna liza vzorcev in hramba materiala za nadaljnje delo;
3. Ekstrakcija in purifikacija DNK;
4. Priprava sekvenčnih knjižnic in NGS sekvenciranje.

Protokol sadrži upute za DNA metabarkodiranje koje se odvija u tri koraka:

1. nedestruktivna izolacija DNA iz nerazvrstanih uzoraka travnjačkih zajednica beskranješkijaka;
2. priprema knjižnica za sekvenciranje;
3. NGS (next-generation sequencing) sekvenciranje za istovremeno određivanje DNA barkodova različitih uzoraka odnosno za istovremeno otkrivanje prisutnosti više taksona u jednom uzorku.

Protokol je modifikacija FAVIS protokola (Iwaszkiewicz-Eggebrecht et al., 2023.) i optimiziran je za visokoproduktivnu obradu nesortiranih uzoraka travnjačkih zajednica uzorkovanih kečerom. Aktivnosti u protokolu podijeljene su u četiri dijela:

1. Priprema radnog prostora;
2. Obrada uzorka – dekantiranje etanola, vaganje mokre biomase, nedestruktivna liza uzoraka i skladištenje materijala za daljnji rad;
3. Ekstrakcija i pročišćavanje DNA;
4. Priprema knjižnica i NGS sekvenciranje.

Kazalo / Sadržaj

1. Material / Materijal	9
1.1. Seznam laboratorijske opreme / Popis laboratorijske opreme.....	9
1.2. Seznam kemikalij, laboratorijskih reagentov in potrošnega materiala / Popis kemikalija, laboratorijskih reagensa i potrošnog materiala	12
1.3. Priprava pufrov in drugih kemijskih raztopin / Priprema pufera I drugih kemijskih otopina	15
2. Priprava postaj / Priprema stanica	18
2.1. Pralna postaja / Stanica za pranje.....	18
2.2. Delovne postaje / Radne stanice	18
2.3. Postaja za dodajanje biološkega notranjega standarda (ang. biological spike-in) / Stanica za dodajanje internog biološkog standarda (engl. Spike-in).....	20
2.4. Postaja za dodajanje pufra za lizo in proteinaze K/ Stanica za dodajanje pufera za lizu i proteinaze K	20
2.5. Postaja za tehtanje / Stanica za vaganje	21
3. Postopek / Postupak	22
3.1. Segrevanje pufera za lizo / Zagrijavanje pufera za lizu	22
3.2. Dekantiranje etanola / Dekantiranje etanola	22
3.3. Tehtanje / Vaganje.....	23
3.4. Dodajanje notranjega biološkega standarda / Dodajanje internog biološkog standarda	24
3.5. Dodajanje pufera za lizo in proteinaze K / Dodajanje pufera za lizu i proteinaze K	25
3.6. Predhodno segrevanje vzorcev v vodni kopeli / Predgrivanje uzoraka u vodenoj kopeli	26
3.7. Inkubacija vzorcev na 56°C s stresanjem / Inkubacija uzoraka na 56°C uz miješanje.	26
3.8. Dekantiranje lizata in dolgoročno shranjevanje vzorcev / Dekantiranje lizata i dugotrajna pohrana uzoraka.....	27
3.9. Obarjanje DNK / Taloženje DNA	28
3.10. Ekstrakcija DNK / Ekstrakcija DNA	28
3.11. Priprava sekvenčnih knjižnic / Priprema knjižnica za sekvenciranje	29
3.12. Elektroforeza / Elektroforeza	31
3.13. Čiščenje PCR produktov / Pročišćavanje PCR produkata	32
3.14. Sekvenciranje / Sekvenciranje	32
4. VIRI / LITERATURA	33

1. Material / Materijal

1.1. Seznam laboratorijske opreme / Popis laboratorijske opreme

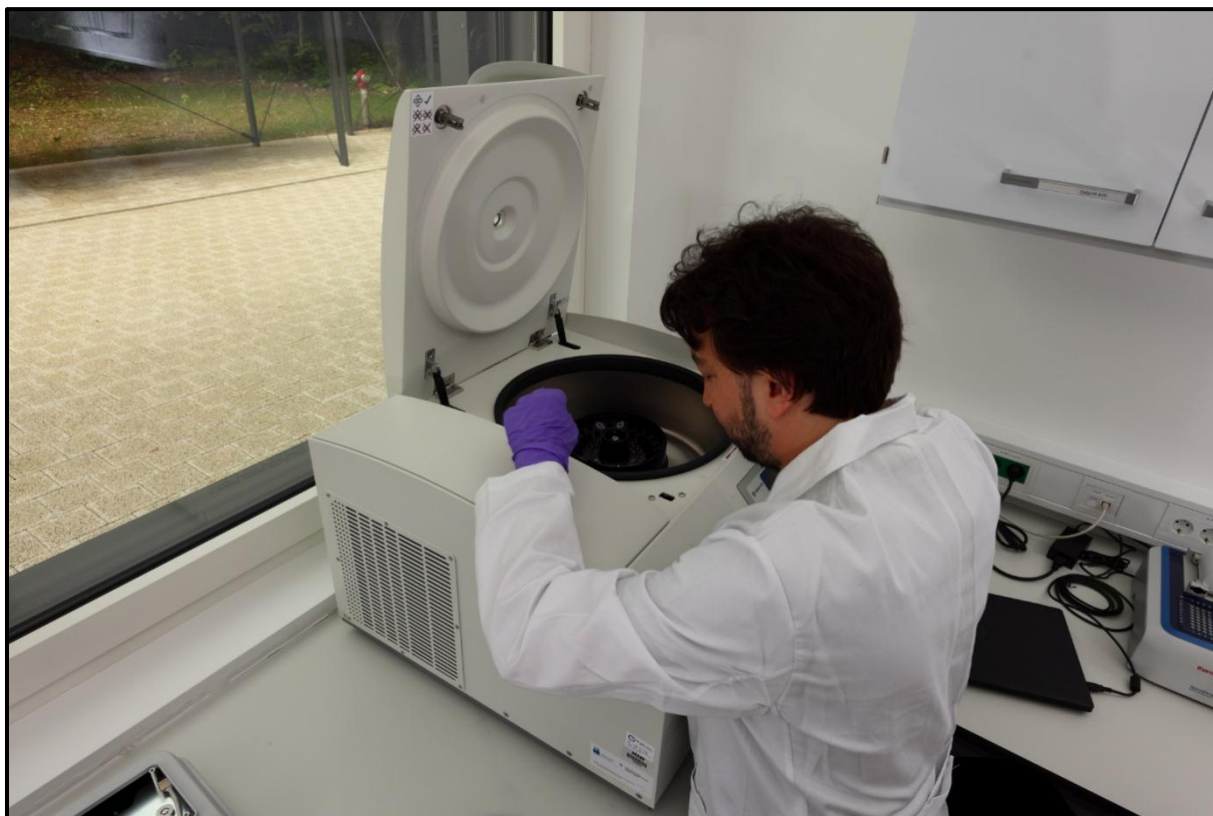
Oprema	Količina	Namen
Magnetno mešalo (z gretjem)		Priprava pufrov
pH meter		Priprava pufrov
Laboratorijska steklovina (čaše, liji, merilni valji, laboratorijske steklenice)		Priprava pufrov
Natančna laboratorijska tehtnica (tehtanje kemikalij)		Priprava pufrov
Velika plastična posoda (~40-50 L) za pomivanje in dekontaminacijo z raztopino varikine	2 kos / vzorec	Postaja za pomivanje in dekontaminacijo
Puhalka za 95% EtOH in za 10% raztopino varikine	2 kos / vzorec	Postaja za pomivanje in dekontaminacijo
Vodna kopel za predhodno segrevanje vzorcev (56°C) pred dodatkom liznega pufru	Dovolj velika za načrtovano število vzorcev	Postaja za segrevanje vzorcev
Natančna laboratorijska tehtnica za tehtanje vzorcev		Tehtalna postaja
Računalnik (za zapis tež)		Tehtalna postaja
Laboratorijska banjica za delovno postajo	1 kos / vzorec + neg. kontrola	Delovna postaja
500 mL nalgenska posodica z zamaškom – posodica naj ima široko grlo za odtekanje etanola	1 kos / vzorec + 2 kos neg. kontrola. (posodica naj bo enaka posodici za hrambo vzorcev)	Delovna postaja
Tesnilo za pritrditev mrežice na 500 ml posodice za delovno postajo – tesnilo lahko naredimo iz notranjega pokrova za tesno zapiranje tako, da v sredini izrežemo luknjo	1 kos / vzorec + neg. kontrola	Delovna postaja
Večji plastičen liji	1 kos / vzorec + neg. kontrola	Delovna postaja
Velike pincete (~200 mm) za delovno postajo	1 kos / vzorec + neg. kontrola	Delovna postaja
Manjši steklen laboratorijski liji	2 kos / vzorec	Postaja za dodajanje pufru za lizo
Merilni valji	Različni volumni (50 to 500 mL)	Postaja za dodajanje pufru za lizo
Pipeti za dodajanje proteinaze K	20-200ul in 100-1000ul	Postaja za dodajanje pufru za lizo
Male pincete (~110 mm)	Za vsako vrsto v notranjem biološkem standardu	Postaja za biološki notranji standard
Inkubator s stresalnikom	Dovolj velik za načrtovano število vzorcev	Liza vzorcev
Laboratorijski prostor za »pre-PCR« delo		
Set pipet za »pre-PCR« delo	Set pipet za pipetiranje različnih volumnov	
Aparat za avtomatsko ekstrakcijo DNK Maxwell® RSC (48) Instrument		Čiščenje DNK
Mikrovolumski spektrometer (NanoDrop)		Priprava sekvenčnih knjižnic
Zmogljiv termični cikler z 96 vdolbinicami		Priprava sekvenčnih knjižnic

Stresalnik za PCR stripe ali PCR plošče		Priprava sekvenčnih knjižnic
Namizna centrifuga za kratko vrtenje		Priprava sekvenčnih knjižnic
Stojala za mikrocentrifugirke		Priprava sekvenčnih knjižnic
Laboratorijski prostor za »post-PCR« delo		Priprava sekvenčnih knjižnic
Set pipet za »post-PCR« delo	Set pipet za pipetiranje različnih volumnov	Priprava sekvenčnih knjižnic
Laboratorijski prostor za elektroforezo		Priprava sekvenčnih knjižnic
Kad za elektroforezo		Priprava sekvenčnih knjižnic
Napajalnik za elektroforeto		Priprava sekvenčnih knjižnic
Sistem za fotografiranje elektroforeznih gelov		Priprava sekvenčnih knjižnic

Oprema	Količina	Namjena
Magnetna mješalica (s grijanjem)		Priprema pufera
pH-metar		Priprema pufera
Laboratorijsko staklo (čaše, lijevci, menzure, laboratorijske boce)		Priprema pufera
Precizna laboratorijska vaga (vaganje kemikalija)		Priprema pufera
Velika plastična posuda (~40-50 L) za pranje i dekontaminaciju s otopinom varikine	2 kom. / uzorak	Stanica za pranje i dekontaminaciju
Boca štrcaljka za 95% EtOH i za 10% otopinu varikine	2 kom. / uzorak	Stanica za pranje i dekontaminaciju
Vodena kupelj za prethodno zagrijavanje uzoraka (56°C) prije dodavanja pufera za lizu	Dovoljno velika za planirani broj uzoraka	Stanica za zagrijavanje uzoraka
Precizna laboratorijska vaga za vaganje uzoraka		Stanica za vaganje
Računalo (za zapisivanje masa)		Stanica za vaganje
Laboratorijska kadica za radnu stanicu	1 kom. / uzorak + neg. kontrola	Radna stanica
500 mL Nalgene spremnik (boca) s poklopcem i širokim grlom za odlijevanje etanola	1 kom. / uzorak + 2 kom. neg. kontrola. (spremnik neka bude jednak spremniku za pohranu uzoraka)	Radna stanica
Brtva za pričvršćivanje mrežice na Nalgene spremnik od 500 mL u sklopu radne stanice – brtva se može izraditi od unutarnjeg poklopca tako, da se u sredini izreže otvor. Alternativno se mrežica može pričvrstiti običnom gumicom za domaćinstvo.	1 kom / uzorak + neg. kontrola	Radna stanica
Veći plastični lijevak	1 kom / uzorak + neg. kontrola	Radna stanica
Velike pincete (~200 mm) za radnu stanicu	1 kom / uzorak + neg. kontrola	Radna stanica
Manji stakleni laboratorijski lijevak	2 kom. / uzorak	Stanica za dodavanje pufera za lizu
Menzure	Različiti volumeni (50 do 500 mL)	Stanica za dodavanje pufera za lizu
Pipete za dodavanje proteinaze K	20-200 µl i 100-1000 µl	Stanica za dodavanje pufera za lizu
Male pincete (~110 mm)	Za svaku vrstu u unutarnjem biološkom standardu	Stanica za dodavanje internog biološkog standarda
Inkubator tresilica	Dovoljno velika za planirani broj uzoraka	Liza uzoraka
Laboratorijski prostor za »pre-PCR« rad		
Set pipeta za »pre-PCR« rad	Set pipeta za pipetiranje različitih volumena	

CarEx

Aparat za automatsku ekstrakciju DNA Maxwell® RSC (48) Instrument		Pročišćavanje DNA
Mikrovolumenski spektrofotometar (NanoDrop)		Priprema knjižnica za sekvenciranje
Odgovarajući PCR aparat (Thermal Cycler) kapaciteta 96 uzoraka		Priprema knjižnica za sekvenciranje
Vortex mikser za PCR stripove ili PCR ploče		Priprema knjižnica za sekvenciranje
Stolna centrifuga za kratko centrifugiranje		Priprema knjižnica za sekvenciranje
Stalci za mikroeprovete		Priprema knjižnica za sekvenciranje
Laboratorijski prostor za »post-PCR« rad		Priprema knjižnica za sekvenciranje
Set pipeta za »post-PCR« rad	Set pipeta za pipetiranje različitih volumena	Priprema knjižnica za sekvenciranje
Laboratorijski prostor za elektroforezu		Priprema knjižnica za sekvenciranje
Kadica za elektroforezu		Priprema knjižnica za sekvenciranje
Aparat za napajanje (power supply) za elektroforezu		Priprema knjižnica za sekvenciranje
Sistem za fotografiranje elektroforeznih gelova		Priprema knjižnica za sekvenciranje



Slika 2: Centrifuga / Centrifuga

1.2. Seznam kemikalij, laboratorijskih reagentov in potrošnega materiala / Popis kemikalija, laboratorijskih reagensa i potrošnog materiala

Material	Količina	Namen
KEMIKALE		
Deionizirana voda (ddH ₂ O)		
4% raztopina natrijevega hipoklorita – NaOCl (varikina)	Sveže pripravljena 20% raztopina	Postaja za pomivanje in dekontaminacijo
Laboratorijski detergent za pomivanje		Postaja za pomivanje in dekontaminacijo
Natrijev dodecil sulfat / Sodium dodecyl sulphate – SDS (CAS: 151-21-3)	~ 2 g / vzorec	Pufer za lizo
Natrijev klorid / Sodium Chloride – NaCl (CAS: 7647-14-5)	~ 10 g / vzorec	Pufer za lizo
Tris čistosti 99,9% / Tris ultrapure 99,9% (CAS: 77-86-1)	~ 1 g / vzorec	Tris-HCL
Klorovodikova kislina / Hydrochloric acid – HCl (CAS: 7647-01-0)		Tris-HCL
Dinatrijeva sol EDTA / EDTA disodium dihydrate (CAS: 6381-92-6)	~0,3 g / vzorec	Pufer za lizo
Absolutni etanol / Absolute ethanol	~33 ml / vzorec	Obarjanje DNK
3M Natrijev acetat / 3M Sodium Acetate (CAS: 127-09-3)	1,5 ml / vzorec	Obarjanje DNK
LABORATORIJSKI REAGENTI		
Proteinaza K (20mg/ml)	400 ul / vzorec	
Kit za ekstrakcijo DNK Maxwell® RSC PureFood GMO and Authentication Kit, ki je komplementaren z aparatom za avtomatsko ekstrakcijo DNK Maxwell® RSC (48) Instrument	1 kit omogoča ekstrakcijo iz 48 vzorcev (vključno z negativnimi kontrolami)	Čiščenje DNK
PCR reakcijska zmes z DNK polimerazo - repliQa HiFi ToughMix (Quantabio)	40 ul za duplikat vzorcev	PCR/priprava sekvenčnih knjižnic
Oligonukleotidna začetnika NoPlant F_270 in Fol-degen-rev s TrueSeq adapterji za pripravo sekvenčnih knjižnic z dvostopenjskim PCR: (ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT + RGCHTTYCCHCGWATAAAYATAAG) & (GACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT + TANACYTCNGGRTGNCCRAARAAYCA) – čistost začetnikov naj bo »NGS-Grade«		PCR/priprava sekvenčnih knjižnic
MiliQ voda brez DNaz in RNaz		PCR/priprava sekvenčnih knjižnic
Etidijev bromid		Elektroforeza
Agaroza		Elektroforeza
Pufer TAE		Elektroforeza
Elektroforezni standard 100 bp		Elektroforeza
Kit za čiščenje PCR produktov - Monarch DNA Gel Extraction Kit (New England Biolabs)		Čiščenje PCR produktov
LABORATORIJSKI POTROŠNI MATERIAL		
Laboratorijske rokavice		
Papirnate brisačke		
Konice za pipete s filtri za različne volumne		
Krog iz najlonske mrežice - Ø7 cm, 300um	2 kos / vzorec + 2 kosa za negativno kotrolo	Delovna postaja
Nalepke za pisanje		Tehtalna postaja
Petrijevke	Za vsako vrsto v notranjem standardu	Postaja za biološki notranji standard

250 mL plastenke s širokim grlom	1 kos / vzorec + negativna kontrola	Odcejanje lizata in dolgoročno shranjevanje vzorcev
Centrifugirke – Falkonke (50 mL)	1 kos / vzorec + negativna kontrola	Obarjanje DNK
Mikrocentrifugirke (2 mL)	Št. vzorcev + negativna kontrola	Čiščenje DNK
Plastika za pripravo PCR (8-mestni stripi za PCR mikrocentugirke, mikrocentrifugirke)		Priprava sekvenčnih knjižnic

Materijal	Količina	Namjena
KEMIČKE REAGENCIJE		
Deionizirana voda (ddH ₂ O)		
4% otopina natrijevog hipoklorita – NaOCl (varikina)	Svježe pripremljena 20% otopina	Stanica za pranje i dekontaminaciju
Laboratorijski deterdžent za pranje		Stanica za pranje i dekontaminaciju
Natrijev dodecil sulfat / Sodium dodecyl sulphate – SDS (CAS: 151-21-3)	~ 2 g / uzorak	Pufer za lizu
Natrijev klorid / Sodium Chloride – NaCl (CAS: 7647-14-5)	~ 10 g / uzorak	Pufer za lizu
Tris čistoće 99,9% / Tris ultrapure 99.9% (CAS: 77-86-1)	~ 1 g / uzorak	Tris-HCL
Klorovodična kiselina / Hydrochloric acid – HCl (CAS: 7647-01-0)		Tris-HCL
Kompleksal III(EDTA-Na ₂ x2H ₂ O) / EDTA disodium dihydrate (CAS: 6381-92-6)	~0.3 g / uzorak	Pufer za lizu
Apsolutni etanol / Absolute ethanol	~33 ml / uzorak	Taloženje DNA
3M Natrijev acetat / 3M Sodium Acetate (CAS: 127-09-3)	1,5 ml / uzorak	Taloženje DNA
LABORATORIJSKI REAGENCIJE		
Proteinaza K (20mg/ml)	400 µl / uzorak	
Kit za ekstrakciju DNA (Maxwell® RSC PureFood GMO and Authentication Kit), koji je komplementaran s aparatom za automatsku ekstrakciju DNA Maxwell® RSC (48) Instrument	1 kit omogućuje ekstrakciju iz 48 uzoraka (uključujući neg. kontrole)	Pročišćavanje DNA
PCR reakcijska smjesa s DNA polimerazom - repliQa HiFi ToughMix (Quantabio)	40 µl za duplikat uzoraka	PCR/priprema knjižnica za sekvenciranje
Oligonukleotidne početnice NoPlant F_270 i Fol-degen-rev s TrueSeq adapterima za pripremu knjižnica za sekvenciranje s dvostupanjskim PCR-om: (ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT + RGCTTTCCHCGWATAAAYAAAYATAAG) & (GACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT + TANACYTCNGGRTGNCCRAARAAYCA) – čistoća početnica neka bude »NGS-Grade«		PCR/priprema knjižnica za sekvenciranje
MiliQ voda bez DNAza i RNAza		PCR/priprema knjižnica za sekvenciranje
Etidijev bromid		Elektroforeza
Agaroza		Elektroforeza
Pufer TAE		Elektroforeza
Elektroforetski standard (100 bp DNA ljestvica)		Elektroforeza
Kit za pročišćavanje PCR produkata - Monarch DNA Gel Extraction Kit (New England Biolabs)		Pročišćavanje PCR produkata
LABORATORIJSKI POTROŠNI MATERIJAL		
Laboratorijske rukavice		
Papirnati ručnici		
Filter nastavci za pipetiranje za različite volumene		
Krug od najlonske mrežice - Ø7 cm, 300µm	2 kom. / uzorak + 2 kom. za neg. kotrolu	Radna stanica
Naljepnice za pisanje		Stanica za vaganje

CarEx

Petrijevke	Za svaku vrstu u unutarnjem standardu	Stanica za dodavanje internog biološkog standarda
250 mL plastični spremnici sa širokim grlom	1 kom. / uzorak + negativna kontrola	Odvajanje lizata i dugoročna pohrana uzoraka
Epruvete za centrifugu– tip Falcon (50 mL)	1 kom. / uzorak + negativna kontrola	Taloženje DNA
Mikroepruvete (2 mL)	Broj uzoraka + negativna kontrola	Pročišćavanje DNA
Plastika za pripremu PCR reakcije (8-struki strip PCR mikroepruveta, mikroepruvete)		Priprema knjižnica za sekvenciranje



Slika 3: Proteinaza K / Proteinaza K

1.3. Priprava pufrov in drugih kemijskih raztopin / [Priprema pufera i drugih kemijskih otopina](#)

Pufri in kemijske raztopine pripravi pred začetkom postopka delne lize.

[Pufere i kemijske otopine pripremite prije početka postupka djelomične lize.](#)

PUFER ZA LIZO, 5L

Pufer je pripravljen po navodilih originalnega protokola FAVIS (Iwaszkiewicz-Eggebrecht et al. 2023) in sledi navodilom Vesterinen et al. (2016).

V 5 litrsko steklenico dodaj:

- 4.5 L ddH₂O,
- 116.9 g natrijevega klorida NaCl,
- 2.9 g EDTA,
- 50 mL 1M Tris-HCl, pH 8.0,
- 20 g SDS in
- magnet za magnetno mešalo.

Reagente raztopi s segrevanjem na 60 °C in mešanjem na magnetnem mešalu – steklenica naj bo zaprta z rahlo zategnjenim pokrovom. Magnetno mešalo odstrani, ko so vse sestavine raztopljene in do oznake za 5 L dotoči ddH₂O.

PUFER ZA LIZU, 5L

[Pufer je pripremljen prema uputama originalnog protokola FAVIS \(Iwaszkiewicz-Eggebrecht et al. 2023\) te slijedi smjernice Vesterinen et al. \(2016\).](#)

[U staklenu bocu od 5 litara dodajte:](#)

- 4.5 L ddH₂O,
- 116.9 g natrijevog klorida NaCl,
- 2.9 g EDTA,
- 50 mL 1M Tris-HCl, pH 8.0,
- 20 g SDS i
- magnet za magnetnu mješalicu.

Reagense otopite zagrijavanjem na 60 °C uz miješanje na magnetskoj mješalici – boca neka bude zatvorena slabo zategnutim čepom. Kada su svi sastojci otopljeni, izvadite magnet i dolijte ddH₂O do oznake 5 L.

1 M TRIS HCL, pH 8,0, 1L

V 1 merilno litrsko čašo dodaj:

- 121,4 g Tris,
- ddH₂O do oznake za 800ml,
- klorovodikovo kislino za uravnavo pH na 8.0 in
- ddH₂O do oznake za 1000ml.

Raztopino steriliziraj s filtracijom preko brizge, uporabi filter z okenci premera 0,2 µm. Raztopino lahko hraniš na sobni temperaturi.

1 M TRIS HCL, pH 8,0, 1L

U mjernu čašu od 1 L dodajte:

- 121,4 g Tris,
- ddH₂O do oznake 800 ml,
- klorovodičnu kiselinu za podešavanje pH vrijednosti na 8.0 i
- ddH₂O do oznake 1000 ml.

Otopinu sterilizirajte filtracijom preko šprice. Upotrijebite filter s porama promjera 0,2 µm. Otopinu možete čuvati na sobnoj temperaturi.

0,5 M EDTA, pH 8,0, 1L

V 1 merilno litrsko čašo dodaj:

- 186,12 g EDTA,
- ddH₂O do oznake za 800ml,
- NaOH za uravnamo pH na 8.0 in
- ddH₂O do oznake za 1000ml.

Raztopino steriliziraj s filtracijom preko brizge. Uporabi filter z okenci premera 0,2 µm. Raztopino lahko hraniš na sobni temperaturi.

0,5 M EDTA, pH 8,0, 1L

U mjernu čašu od 1 L dodaj:

- 186,12 g EDTA,
- ddH₂O do oznake 800 ml,
- NaOH za podešavanje pH vrijednosti na 8.0 i
- ddH₂O do oznake 1000 ml.

Otopinu sterilizirajte filtracijom preko šprice. Upotrijebite filter s porama promjera 0,2 µm. Otopinu možete čuvati na sobnoj temperaturi.



Slika 4: Kit za ekstrakciju DNK Maxwell® RSC PureFood GMO and Authentication Kit, komplementaran z aparatom za avtomatsko ekstrakciju DNK Maxwell® RSC (48) (v ozadju). / Kit za ekstrakciju DNA (Maxwell® RSC PureFood GMO and Authentication Kit), komplementaran s aparatom za automatsku ekstrakciju DNA Maxwell® RSC (48) (u pozadini).

2. Priprava postaj / Priprema stanica

2.1. Pralna postaja / Stanica za pranje

- Kovinske pripomočke (škarje, pincete...) dekontaminiraj s suho sterilizacijo v pečici pri 185 °C, vsaj 1 ur (Blumberg, 1987).
- V eni posodi pripravi raztopino vode in detergenta v drugi 20% raztopino varikine. Opremo najprej namoči v posodi z 10% raztopino varikine za vsaj 15 min in jo nato spera v posodi z detergentom in vodo. Velikost posode je odvisna od števila vzorcev. ~40-50L posoda je primerna za 20 vzorcev. Raztopino varikine menjaj tedensko.
- Pripravi puhalko z 20 % raztopino varikine, puhalko z etanolom in puhalko z deionizirano vodo ter papirnate brisačke za čiščenje pultov.
- Dekontaminirajte metalne alate (škarje, pincete i sl.) suhom sterilizacijo u pečnici na 185°C najmanje 1 sata (Blumberg, 1987).
- U jednoj posudi pripremite otopinu vode i deterdženta, u drugoj 20% otopinu varikine. Najprije namočite opremu u posudu s 20% otopinom varikine na najmanje 15 minuta, a zatim je isperite u posudi s deterdžentom i vodom. Veličina spremnika ovisi o broju uzoraka. Spremnik ~40-50 L prikladan je za 20 uzoraka. Otopinu varikine mijenjajte tjedno.
- Pripremite bocu štrcaljku s 20% otopinom varikine, bocu štrcaljku s etanolom, bocu štrcaljku s deioniziranom vodom i papirnate ručnike za čišćenje radnih površina.

2.2. Delovne postaje / Radne stanice

- Vse delovne površine očisti z raztopino varikino (puhalka), osuši z brisačkami, prebrši z deionizirano vodo in ponovno posuši z brisačkami.
- Pripravi toliko delovnih postaj kot imaš vzorcev in dodatno delovno postajo za negativno kontrolo. Na vsako postajo postavi laboratorijsko banjico v katero zložiš 500 ml nalgensko posodico s širokim grlom, 1 večji plastičen lij, zamašek za posodico, 2 kroga iz najlonske mrežice (300 um), tesnilo za pritrditev mrežice, 1 veliko pinceto in 500 ml nalgensko plastenko s širokim grlom z vzorcem (pri negativni kontroli namesto te uporabimo prazno plastenko).
- Plastenke z vzorci in pokrove označi s trajnim markerjem. Označimo tudi negativno kontrolo.

- Očistite sve radne površine otopinom varikine (boca štrcaljka), osušite ručnicima, prebrišite deioniziranom vodom i ponovno osušite ručnicima.
- Pripremite onoliko radnih stanica koliko uzoraka imate i dodatnu radnu stanicu za negativnu kontrolu. Na svaku stanicu stavite laboratorijsku kadu u koju posložite Nalgene spremnik od 500 ml sa širokim grlom, 1 veliki plastični lijevak, poklopac za spremnik, 2 kruga od najlonske mrežice (300 μ m), brtvu za pričvršćivanje mrežice, 1 veliku pincetu i Nalgene spremnik od 500 ml sa širokim grlom s uzorkom (za negativnu kontrolu umjesto toga upotrijebite prazan spremnik).
- Označite spremnike s uzorcima i poklopce trajnim markerom. Označavamo i negativnu kontrolu.



Slika 5: Delovne postaje / Radne stanice

2.3. Postaja za dodajanje biološkega notranjega standarda (ang. biological spike-in) / Stanica za dodavanje internog biološkog standarda (engl. spike-in)

- Postajo za dodajanje notranjega biološkega standarda pripravi na ločenem delu pulta. Za notranji standard uporabi vrste, ki zagotovo niso prisotne v združbah, ki si jih vzorčili in ki so na voljo v velikih količinah. Biološke notranje standard naberi in pripravi predhodno. Pri analizi travniških združb smo za notranji standard uporabljali potočne postranice vrste *Gammarus fossarum*. Predhodno smo v mikrocentrifugirkah stehali po dva do tri osebk in jih zamrznili.
- Pripravi ustrezno število mikrocentrifugirk z notranjimi biološkimi standardi in manjšo pinceto za dodajanje v vzorce.
- Stanica za dodajanje internog biološkog standarda pripravljena je na posebnem dijelu radne površine. Za interni standard koristite vrste koje sigurno nisu prisutne u zajednicama koje ste uzorkovali i koje su dostupne u velikim količinama. Prikupite i pripremite biološke interne standarde unaprijed. U analizi livadskih zajednica kao interni standard korišteni su potočni rakušci vrste *Gammarus fossarum*. Prethodno su se dvije do tri jedinice izvagale u mikroepruvetama i zamrznule.
- Pripremite odgovarajući broj mikroepruveta s internim biološkim standardima i malu pincetu za dodavanje uzorcima.

2.4. Postaja za dodajanje pufera za lizo in proteinaze K/ Stanica za dodavanje pufera za lizu i proteinaze K

- Na ločenem delu pulta pripravi postajo za dodajanje pufera za lizo in proteinaze K. Pufer za lizo pripraviš po navodilih v poglavju 1 (Priprava raztopin).
- Za odmerjanje pripravi valje z različnimi volumni od 50 ml do 500 ml, manjše lije, 1000 ml pipeto in konice s filtrom. Na 10 g vzorca dodamo 100 ml pufera in 100 µl proteinaze K, če so vzorci težji od 40 g dodamo 400 ml pufera in 400 ul proteinaze K. V negativno kontrolo dodamo 30 ml pufera in 30 ul proteinaze K.

CarEx

- Na zasebnom dijelu radne površine pripremite stanicu za dodavanje pufera za lizu i proteinaze K. Pripremite pufer za lizu prema uputama u Poglavlju 1 (Priprema otopina).
- Pripremite menzure različitih volumena od 50 ml do 500 ml, manje lijevke, pipetu od 1000 μ l i filter nastavke za pipetiranje. Dodajte 100 ml pufera i 100 μ l proteinaze K na 10 g uzorka, ako je uzorak teži od 40 g, dodajte 400 ml pufera i 400 μ l proteinaze K. Dodajte 30 ml pufera i 30 μ l proteinaze K u negativnu kontrolu.

2.5. Postaja za tehtanje / Stanica za vaganje

- Na ločenem delu pulta pripravi postajo za tehtanje s tehtnico, nalepkami in računalnikom za zapis tež. Pred začetkom postopka stehtaj težo praznih 500 ml posodic za odtekanje etanola. Za biomaso odšteješ povprečno vrednost prazne posodice od bruto teže plastenke z vzorcem.
- Na posebnom dijelu radne površine pripremite stanicu za vaganje s vagon, naljepnicama i računalom za bilježenje masa. Prije početka postupka izvažite prazne spremnike od 500 ml za odlijevanje etanola. Za biomasu oduzmite prosječnu vrijednost praznog spremnika od bruto težine spremnika s uzorkom.

3. Postopek / Postupak

3.1. Segrevanje pufra za lizo / Zagrijavanje pufera za lizu

- Pufer za lizo ob mešanju z magnetom segrej na 65-70°C, mešaj vsaj dokler se oborine popolnoma ne raztopijo.
- Zagrijte pufer za lizu na 65-70°C uz miješanje magnetom, miješajući dok se talog potpuno ne otopi.

3.2. Dekantiranje etanola / Dekantiranje etanola

- Z dekantiranjem začni na prvi delovni postaji. Odpri posodo z vzorcem in z veliko pinceto odstrani etiketo z oznako vzorca, v kolikor se ta nahaja v posodi. S pomočjo etanola v puhalki speri etiketo tako, da poskrbiš, da živali vrneš nazaj v posodo.
- Na odprtino plastenke namesti krog iz najlonske mrežice in ga pritrdi s tesnilom.
- Nadaljuj na naslednji delovni postaji in ponovi koraka 8.1 in 8.2.
- Vrni se na prvo delovno postajo. Etanol iz posode z vzorcem preko pritrjene najlonske mrežice počasi prelij v 500 ml nalgensko posodico za odtekanje etanola, pomagaj si s plastičnim lijem in rotiranjem posodice.
- Ko je odtekel skoraj ves etanol posodo obrni na glavo in jo postavi v lij in pusti 35 min, da odteče do konca (Iwaszkiewicz-Eggebrecht et al., 2023).
- Nadaljuj na naslednji delovni postaji in ponovi koraka 8.3 in 8.4.
- Po 35 minutah se vrni na prvo postajo in odstrani posodo iz lija.
- Pazljivo odstrani tesnilo in najlonsko mrežico potisni notri v posodico z vzorcem, kjer ostane med postopkom delne lize, pomagaj si z dolgo pinceto.
- Posod z vzorcem zapri z originalnim zamaškom.
- Nadaljuj na naslednji delovni postaji in ponovi korake 8.7 do 8.9.
- Plastične lije iz vseh delovnih postaj odnesi do postaje za pomivanje in jih dekontaminiraj in pomij po protokolu.
- (1) Započnite dekantiranje na prvoj radnoj stanici. Otvorite spremnik s uzorkom i velikom pincetom uklonite etiketu s oznakom uzorka, ako postoji. Koristeći etanol u boci štrcaljci, isperite etiketu, pazeći da vratite životinje u spremnik.

CarEx

- (2) Stavite krug od najlonske mrežice preko otvora boce i pričvrstite ga brtvom.
- (3) Nastavite do sljedeće radne stanice i ponovite korake 1. i 2.
- (4) Povratak na prvu radnu stanicu. Polako prelijte etanol iz spremnika za uzorak kroz pričvršćenu najlonsku mrežicu u Nalgene spremnik od 500 ml za odlijevanje etanola, koristeći plastični lijevak i okrećući spremnik.
- (5) Kada gotovo sav etanol iscuri, okrenite spremnik naopako, stavite ga u lijevak i ostavite 35 minuta da se potpuno iscijedi (Iwaszkiewicz-Eggebrecht i sur., 2023.).
- (6) Nastavite do sljedeće radne stanice i ponovite korake 4. i 5.
- (7) Nakon 35 minuta vratite se na prvu stanicu i izvadite spremnik iz lijevka.
- (8) Pažljivo uklonite brtvu i pomoću duge pincete gurnite najlonsku mrežicu u spremnik za uzorak, gdje će ostati tijekom postupka djelomične lize.
- (9) Zatvorite spremnik s uzorkom originalnim poklopcem.
- (10) Nastavite do sljedeće radne stanice i ponovite korake 7. do 9.
- (11) Odnosite plastične lijevke sa svih radnih stanica u praonicu te ih dekontaminirajte i operite prema protokolu.

3.3. Tehtanje / Vaganje

- Vse vzorce odnesi do postaje za tehtanje.
- Stehtaj maso vsakega vzorca in jo vnesi v računalnik.
- Za vsak vzorec izračunaj biomaso tako, da od bruto teže odšteješ povprečno težo plastenke.
- Glede na biomaso ocenimo koliko pufru za lizo in proteinaze K potrebuješ za vsak vzorec in vrednosti zapiši na posoda. Za oceno si pomagaj z naslednjo tabelo:

A	B	C
Teža vzorca (g)	Pufer za lizo (mL)	Proteinaza K (μL)
< 5,00	30	30
5,00 – 9,99	50	50
10,00 – 19,99	100	100
20,00 – 29,99	200	200
30,00 – 39,99	300	300
>40,99	400	400
Negativna kontrola	30	30

CarEx

- Odnosite sve uzorke na stanicu za vaganje.
- Izvažite masu svakog uzorka i unesite je u računalno.
- Za svaki uzorak izračunajte biomasu oduzimanjem prosječne težine spremnika od bruto težine.
- Na temelju biomase procijenite koliko pufera za lizu i proteinaze K trebate za svaki uzorak i zapišite vrijednosti na posudu. Upotrijebite sljedeću tablicu kao pomoć pri procjeni:

A	B	C
Masa uzorka (g)	Pufer za lizu (mL)	Proteinaza K (μL)
< 5,00	30	30
5,00 – 9,99	50	50
10,00 – 19,99	100	100
20,00 – 29,99	200	200
30,00 – 39,99	300	300
>40,99	400	400
Negativna kontrola	30	30

3.4. Dodavanje notranjega biološkog standarda / Dodavanje internog biološkog standarda

- Po vrsti v svak vzorec dodaj notranji biološki standard znane biomase iz predhodno pripravljenih mikrocentrifugirk. V negativno kontrolu notranjega standarda ne dodaš.
- Biomasa notranjih standardov vnesi v računalnik.
- Dodajte interni biološki standard poznate biomase iz prethodno pripremljenih mikroepreveta svakom uzorku redom. Negativnoj kontroli ne dodajete interni standard.
- Unesite biomasu internih standarda u računalno.



Slika 6: Pripravljene biološki standardi z znano biomaso. / Pripremljeni interni biološki standardi poznate biomase.

3.5. Dodajanje pufru za lizo in proteinaze K / Dodavanje pufera za lizo i proteinaze K

- Za vsak vzorec predhodno izračunaj volumen obeh reagentov (9.4)
- V vzorce najprej dodaj pufer za lizo. Pri natančnem in doziranju volumna si pomagaj s steklenim lijem in merilnim valjem. Pufer dodajaj postopoma in z njim splakni notranje stene posodice z vzorcem, da splakneš živali.
- Za vsaki vzorec, prehodno izračunajte volumen oba reagensa (9.4)
- Najprije dodajte pufer za lizo u uzorke. Koristite stakleni lijevak i menzuru koji će vam pomoći u izlivanju i mjerenju volumena. Postupno dodajte pufer i njime isperite unutarnje stijenke spremnika s uzorkom kako biste isprali životinje.

3.6. Predhodno segrevanje vzorcev v vodni kopeli / Predgrijavanje uzoraka u vodenoj kopeli

- Za pospešitev postopka inkubacije, vzorce predhodno segrej v vodni kopeli na 56 °C, in sicer tako, da jih za 40 minut potopiš v vodno ogreto na 60 °C. Ker čas predhodnega segrevanja variira glede na volumen vzorca, število vzorcev, tip posodic in tip vodne kopeli, spremljaj temperaturo v vzorcih.
- Kako biste ubrzali proces inkubacije, prethodno zagrijte uzorke u vodenoj kupelji na 56 °C tako da ih uronite u vodu zagrijanu na 60 °C na 40 minuta. Budući da vrijeme predgrijavanja varira ovisno o volumenu uzorka, broju uzoraka, vrsti posuda i vrsti vodene kupelji, pratite temperaturu u uzorcima.

3.7. Inkubacija vzorcev na 56°C s stresanjem / Inkubacija uzoraka na 56°C uz miješanje

- Predhodno segrete vzorce postavi v inkubator s stresalnikom, ki ga predhodno ogreješ na 56 °C.
- Inkubiraš 2 uri in 45 minut pri 56 °C s stresanjem do 90 rpm.
- Stavite prethodno zagrijane uzorke u inkubator-tresilicu, prethodno zagrijanu na 56 °C.
- Inkubirajte 2 sata i 45 minuta na 56 °C uz miješanje pri 90 rpm.

3.8. Dekantiranje lizata in dolgoročna shranjevanje vzorcev / Dekantiranje lizata i dugotrajna pohrana uzoraka

- (1) Na vsaki delovni postaji pripravi 50 ml falkonko, po dve 2 ml mikrocentrifugirki s pokrovom z navojem in 500 ml nalgensko posico s širokim grlom, če je volumen lizata manjši od 200 ml, lahko uporabiš 250 ml posodico.
 - Posodice z vzorci odstrani iz inkubatorja in jih razporedi na delovne ppstaje.
 - Začni na prvi delovni postaji. Odpri posodo z vzorcem in na odprtino plastenke namesti nov krog iz najlonske mrežice in ga pritrdi s tesnilom.
 - Lizat previdno prelij v označeno posodico za shranjevanje lizata. Lizat odlivaj dokler kapljanje ne poneha in zapri posodo za shranjevanje lizata.
 - Pazljivo odstrani tesnilo in najlonsko mrežico potisni notri v posodico z vzorcem, pomagaj si z dolgo pinceto.
 - V posodico z vzorcem vrni originalno etiketo (iz 8.1) oz. dodaj novo, če te ni bilo.
 - (7) Za fiksiranje in hrambo vzorca uporabi etanol v katerem je bil vzorec originalno hranjen (iz 8.4), previdno ga prelij nazaj iz posodice za odtekanje etanola in zapri posodo. Po potrebi dotoči svež 96 % tehničen etanol.
 - Za vsak vzorec ponovi korake od prvega (1) v poglavju 3.8. do sedmega (7).
 - Laboratorijske banjice, posodice za odtekanje etanola, tesnila za najlonske mrežice odnesi do postaje za pomivanje in jih dekontaminiraj in pomij po protokolu. Pincete umij z detergentom in dekontaminiraj s postopkom suhe sterilizacije po protokolu.
-
- (1) Na svako radnoj stanici pripremite Falcon epruvetu od 50 ml, dvije mikroeprevete od 2 ml s čepovima na navoj i Nalgene spremnik od 500 ml sa širokim grlom. Ako je volumen lizata manji od 200 ml, možete koristiti spremnik od 250 ml.
 - (2) Izvadite spremnike za uzorke iz inkubatora i rasporedite ih na radne stanice.
 - (3) Počnite na prvoj radnoj stanici. Otvorite spremnik s uzorkom i postavite novi krug od najlonske mrežice preko otvora spremnika i pričvrstite ga brtvom.
 - (4) Pažljivo ulijte lizat u označeni spremnik za pohranu lizata. Ulijevajte lizat dok ne prestane kapati i zatvorite spremnik za skladištenje lizata.
 - (5) Pažljivo uklonite brtvo i gurnite najlonsku mrežicu u spremnik s uzorkom pomoću duge pincete.
 - (6) Vratite originalnu etiketu (iz koraka 1. u poglavlju 3.2) u spremnik za uzorak. Dodajte novu ako je nije bilo.

CarEx

- (7) Za fiksiranje i pohranjivanje uzorka upotrijebite etanol u kojem je uzorak izvorno bio pohranjen (iz koraka 4. u poglavlju 3.2), pažljivo ga izlijte natrag iz spremnika za odlijevanje etanola i zatvorite spremnik. Po potrebi dodajte svježi 96% tehnički etanol.
- Ponovite sve korake od prvog (1) do sedmog (7) u poglavlju 3.8. za svaki uzorak.
- Odnosite laboratorijske kadice, spremnike za odlijevanje etanola i brtve za najlonske mrežice u stanicu za pranje te ih dekontaminirajte i operite u skladu s protokolom. Operite pincetu deterdžentom i dekontaminirajte postupkom suhe sterilizacije prema protokolu.

3.9. Obarjanje DNK / Taloženje DNA

- Obarjanje DNK sledi protokolu Ficetola et al. (2008).
- Od vsakega vzorca odlij 15 ml lizata in ga shrani v označeno 50 ml falkonko. Pred odlivanjem vzorec homogeniziraj tako, da ga nežno pretreseš.
- Posode z lizatom shrani na -20 °C.
- V vsako falkonko dodaj 1,5 ml 3M natrijevega acetata in 33 ml absolutnega etanola.
- Falkonke shrani na -20 °C ali neposredno nadaljuj z naslednjim korakom in ekstrakcijo DNK.
- Taloženje DNA sledi protokol Ficetola et al. (2008).
- Odlijte 15 ml lizata iz svakog uzorka i pohranite ga u označenu Falcon epruvetu od 50 ml. Prije odlijevanja uzorak homogenizirajte laganim miješanjem.
- Čuvajte spremnike s lizatom na -20 °C.
- Dodajte 1,5 ml 3M natrijeva acetata i 33 ml apsolutnog etanola u svaku Falcon epruvetu.
- Pohranite Falcon epruvete na -20 °C ili prijedite izravno na sljedeći korak i ekstrakciju DNA.

3.10. Ekstrakcija DNK / Ekstrakcija DNA

CarEx

- S centrifugiranjem (5500 g, 35 min, 6 °C) peletiraj oborjeno DNK iz falkonke in zavrzi supernatant.
- Peletirano DNK resuspendiraj v 200 ul pufera TE, dodaj 1000 ml CTAB.
- Za ekstrakcijo DNK uporabi aparat za avtomatsko ekstrakcijo DNK Maxwell® RSC (48) Instrument in pripadajoči kit za ekstrakcijo DNK Kit za ekstrakcijo DNK Maxwell® RSC PureFood. Pri ekstrakciji sledi protokolu kita.
- Peletirajte precipitiranu DNA u Falcon epruveti centrifugiranjem (5500 g, 35 min, 6 °C) te odstranite supernatant.
- Resuspendirajte talog DNA u 200 µl TE pufera, dodajte 1000 µl CTAB.
- Za ekstrakcijo DNA koristite Maxwell® RSC automatizirani instrument za ekstrakcijo DNA (48) Instrument i pripadajući kit za ekstrakcijo DNA Maxwell® RSC PureFood kit za ekstrakcijo DNA. Prilikom ekstrakcije slijedite upute proizvođača.

3.11. Priprava sekvenčnih knjižnic / Priprema knjižnica za sekvenciranje

- Za pripravo knjižnic slediš dvostopenjskemu PCR protokolu. V prvi stopnji (PCR 1) pomnožiš tarčni marker: 456 bp dolg fragment gena za citokrom oksidazo 1, kio ga pomnožimo z oligonukleotidnima začetnikoma NoPlant_F_270 in Fol-degen-rev. V drugi stopnji (PCR 2) amplikonom dodaš indekse in illumina adapterje. V pričujočem protokolu je PCR 2 in sekvenciranje opravljeno pri zunanjem ponudniku.
- Koncentracije DNK pomeri z mikrovolumskim spektrofotometrom.
- Vzorce, ki imajo koncentracijo nad 50 ng/µl redči na koncentracijo med 10 in 50 ng/ul.
- Reakcijsko zmes za PCR1 reakcijo pripravi po naslednji tabeli:

Komponenta / reagent	Volumen
repliQa HiFi ToughMix (2x)	20
10 uM NoPlant_F_270	1,875
10 uM Fol-degen-rev	1,875
ddH2O	12,25
Vzorec DNK	4
Skupni volumen	40

- Za PCR1, vsak vzorec pomnoži v dveh ponovitvah. Uporabi naslednje pogoje za PCR reakcijo:

Korak	Temp	Čas	Št. ciklov
Denaturacija	98 °C	30 s	1
Denaturacija	98 °C	10 s	30
Naleganje	46 °C	5 s	30
Ekstenzija	68 °C	2 s	30
Shranjevanje	18 °C	∞	

- Za pripremu knjižnica sledite dvostupanjski PCR protokol. U prvoj fazi (PCR 1) umnažate ciljni marker: fragment gena za citokrom c oksidazu 1 duljine 456 bp, koji se umnaža s oligonukleotidnim početnicama NoPlant_F_270 i Fol-degen-rev. U drugoj fazi (PCR 2), dodajete indekse i illumina adaptore na ampikone. U sadašnjem protokolu, PCR 2 i sekvenciranje izvodi vanjski pružatelj usluga.
- Koncentracije DNA mjere se mikrovolumenskim spektrofotometrom.
- Razrijedite uzorke s koncentracijama iznad 50 ng/μl do koncentracija između 10 i 50 ng/ul.
- Reakcijska smjesa za PCR1 reakciju priprema se prema sljedećoj tablici:

Komponenta / reagens	Volumen (μl)
repliQa HiFi ToughMix (2x)	20
10 μM NoPlant_F_270	1,875
10 μM Fol-degen-rev	1,875
ddH2O	12,25
Uzorak DNA	4
Ukupni volumen	40

3.13. Čiščenje PCR produktov / Pročiščavanje PCR produkata

- PCR1 produkte očisti z kitom za čiščenje PCR produktov - Monarch DNA Gel Extraction Kit (New England Biolabs).
- PCR1 produkti se pročiščavajo s kompletom za pročiščavanje PCR produkata - Monarch DNA Gel Extraction Kit (New England Biolabs).

3.14. Sekvenciranje / Sekvenciranje

- PCR2 reakcijo in sekvenciranje po tehnologiji Illumina MiSeq opravi pri zunanjem ponudniku.
- PCR2 reakcijo i sekvenciranje pomoću Illumina MiSeq tehnologije izvodi vanjski pružatelj usluga.

4. VIRI / LITERATURA

Blumberg DD 1987 Creating a ribonuclease-free environment. *Methods in Enzymology*, 152: 20-4

Ficetola G. F., Miaud G., Pompanon F, Taberlet P (2008) Species detection using environmental DNA from water samples Biol. Lett 4, 423–425. doi:10.1098/rsbl.2008.0118

Iwaszkiewicz-Eggebrecht E, Łukasik P, Buczek M, Deng J, Hartop EA, Havnås H, et al. (2023) FAVIS: Fast and versatile protocol for non-destructive metabarcoding of bulk insect samples. PLoS ONE 18(7): e0286272. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0286272>

Vesterinen EJ, Ruokolainen L, Wahlberg N, Peña C, Roslin T, Laine VN, et al. What you need is what you eat? Prey selection by the bat *Myotis daubentonii*. Mol Ecol. 2016;25(7):1581–94. pmid:26841188