V01: Analize okoljske DNA

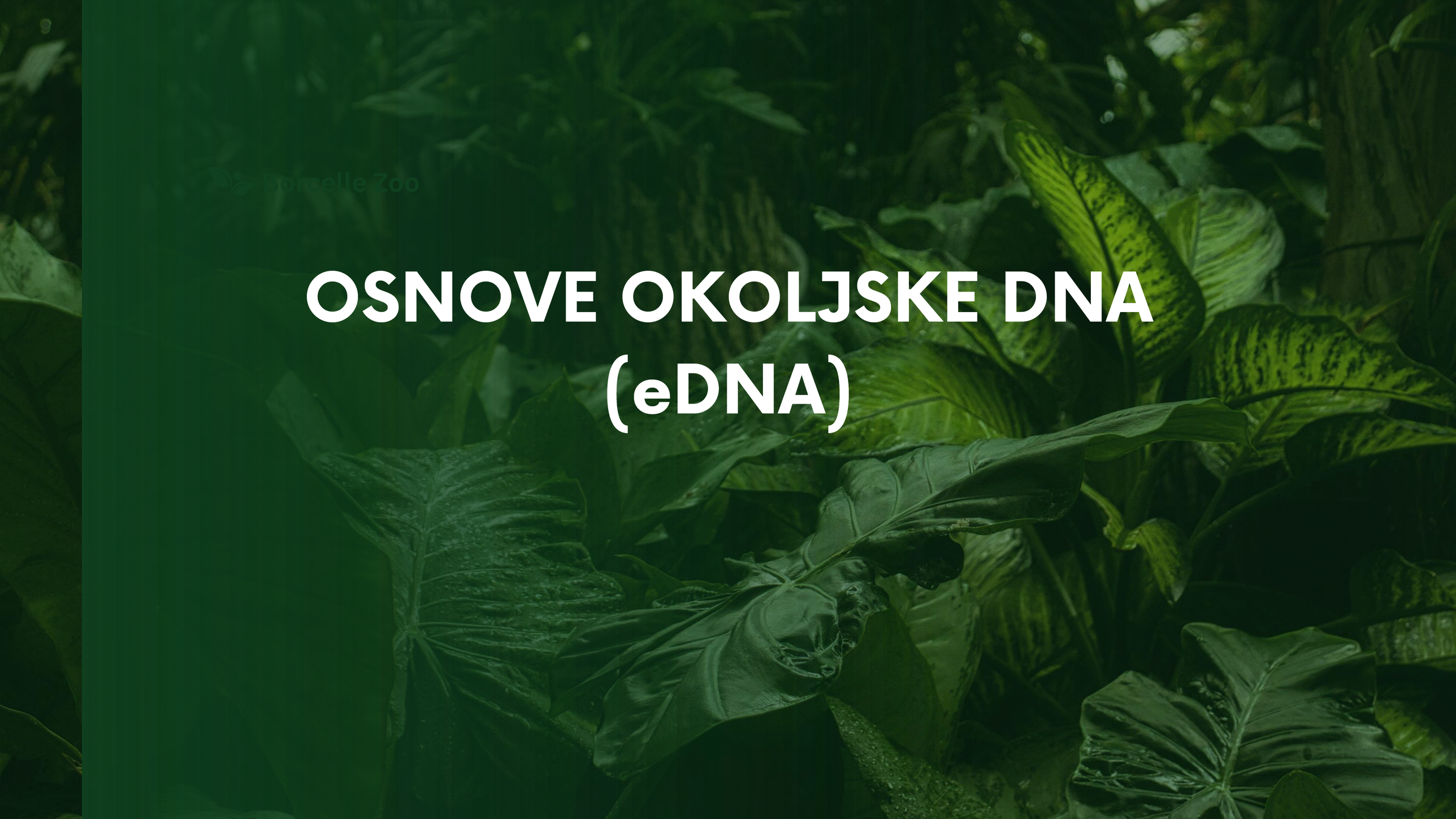
(angl. environmental DNA)

Laboratorijski praktikum
2026/2027

Asist. Aja Bončina



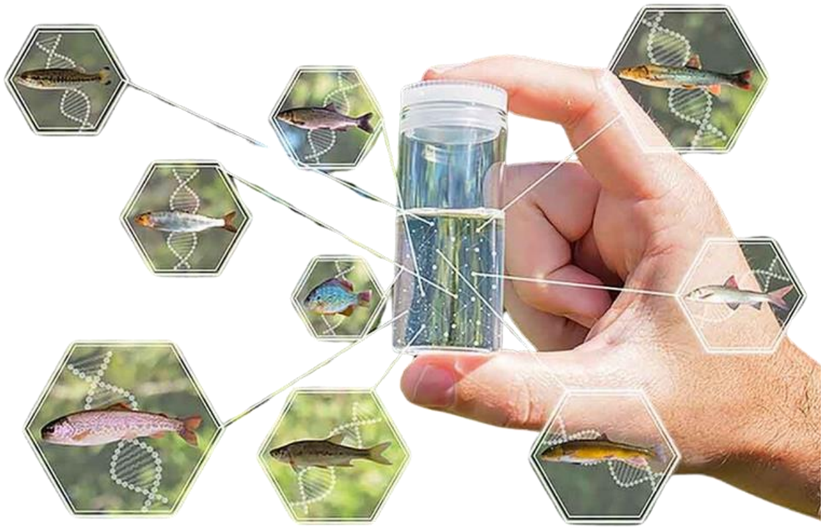




OSNOVE OKOLJSKE DNA (eDNA)



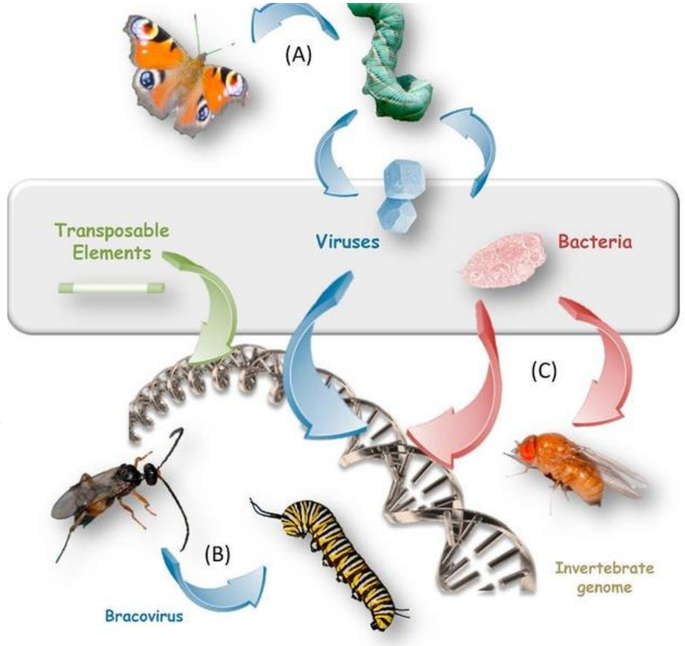
Starodavna DNA
(aDNA; ancient DNA)



Okoljska DNA *(eDNA; environmental DNA)*

I. GENETSKI MONITORING

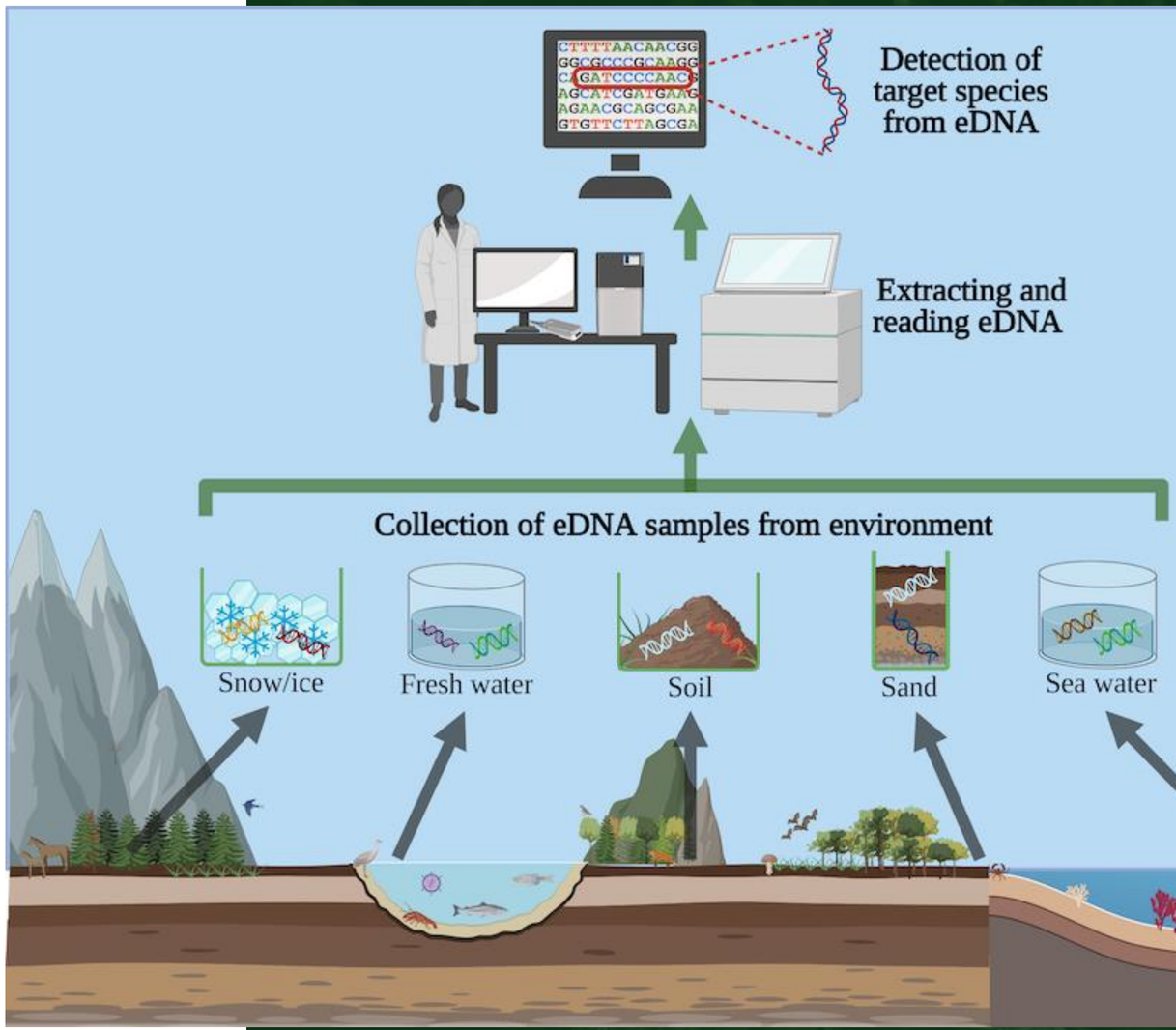
nevretenčarska DNA *(iDNA; invertebrate DNA)*



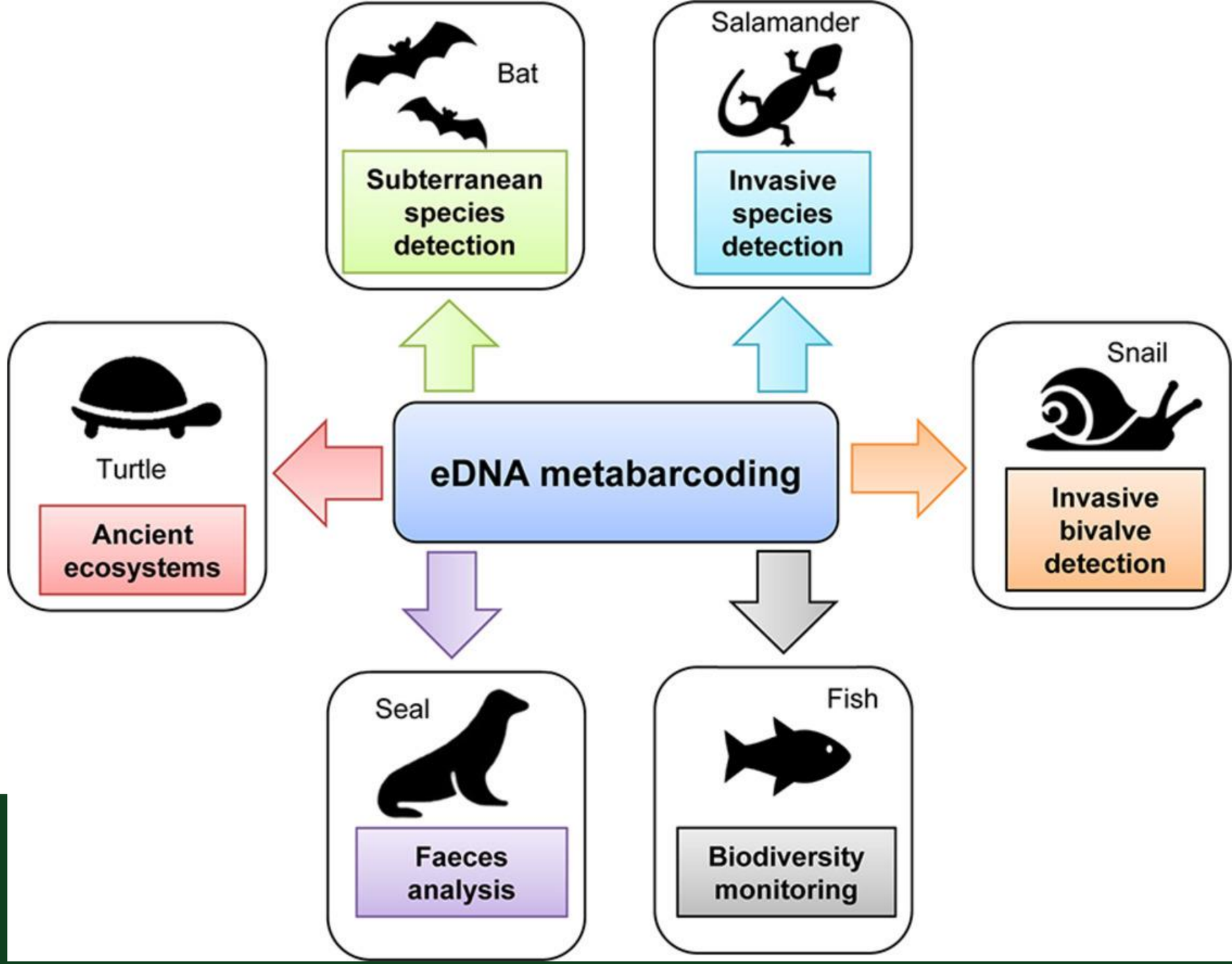
Schematic representation of horizontal gene transferts targeting invertebrate genomes

Kaj je okoljska DNA (eDNA)?

- je DNA (jedrna ali mitohondrijska) organizmov, ki se sproščajo v okolju. Okoljska DNK izvira iz celičnega oz. organskega materiala, ki ga organizmi (skozi kožo, iztrebke itd.) odvržejo v vodno, morsko ali kopensko okolje. To eDNA je mogoče vzorčiti in spremljati z novimi molekularnimi metodami.
- **Neinvaziven pristop**
- **Visoka verjetnost detekcije redkih, ogroženih ali težko sledljivih vrst**
- **Viri eDNA:** izločeno blato (iztrebki-neinvazivni vzorci), sluznica, gamete, odpadla koža, dlaka in lasje, ob razgradnji karkasa, kosti + sodobnejši pristopi: cvetovi (vir opraševalcev), Malasyian pasti (nevretenčarji), zračna DNA, idr.
- eDNK lahko zaznamo v celični ali zunajcelični (raztopljena DNK) obliki.



Aplikativnost analiz okoljske DNK - izjemno širok spekter analiz biodiversitete



Metoda, ki temelji na črtnih kodah DNA (DNA-BASED STUDY TO ASSESS BIODIVERSITY)

Metabarkodiranje DNA

= pristop, ki omogoča identifikacijo več milijonov kopij DNA v eni sekvenčni reakciji s pomočjo sekvenciranja naslednje generacije (NGS) in temelji na identifikaciji črtnih kod DNA.

\+

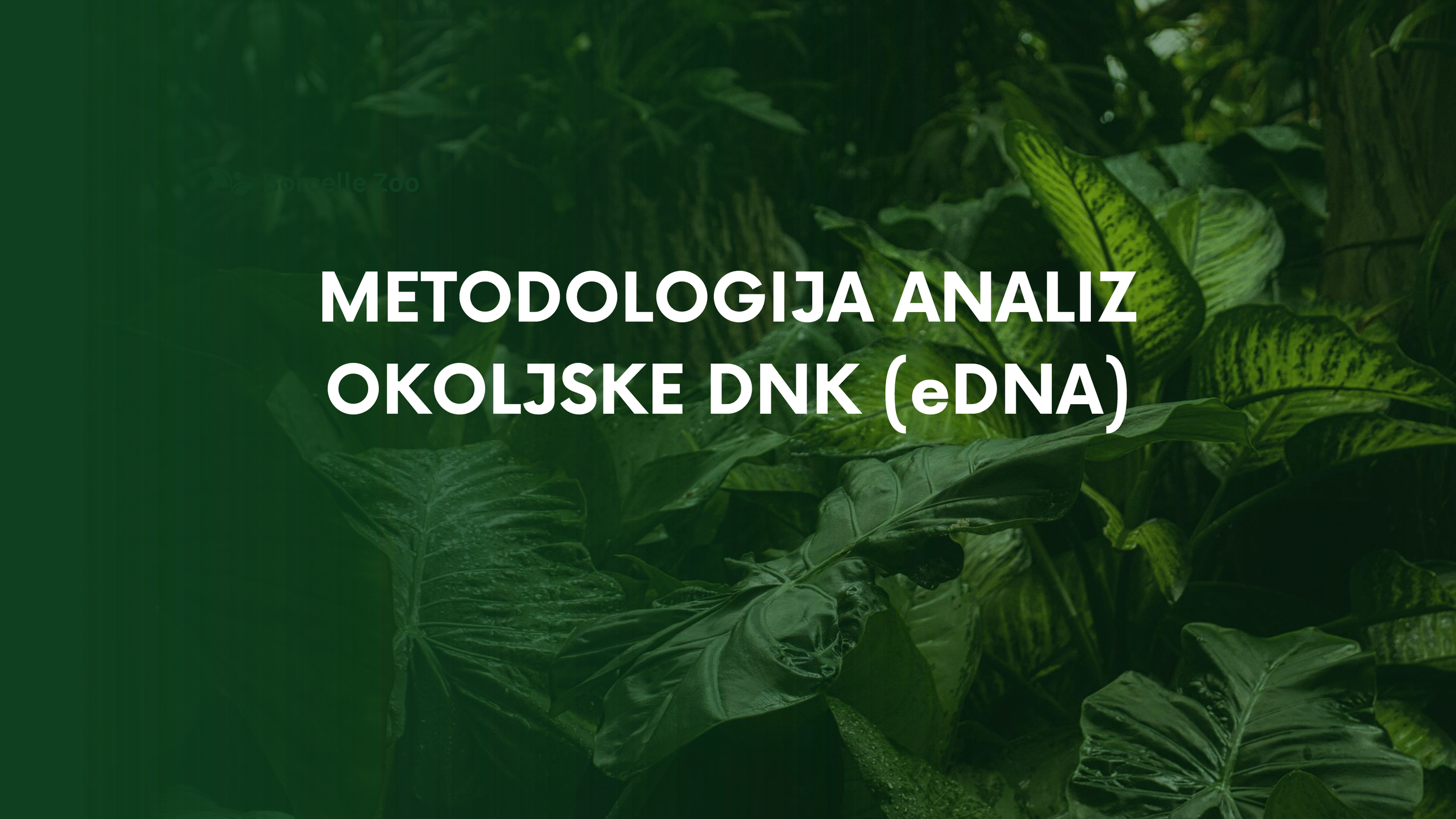
- hiter, učinkovit, relativno poceni pristop
- neinvazivni in eDNA vzorci
- visoka verjetnost detekcije redkih, kriptičnih, ogroženih in vrst, ki jih je težko preučevati
- standardizirana merila
- detekcija širokega spektra taksonov
- sekvenciranje s pomočjo univerzalnih primejrev (začetnih oligonukleotidov)

−

- zahteva po dobrem znanju bioinformatike in kompleksnih genetskih analiz
- kompleksne laboratorijske analize
- pomankljive podatkovne referenčne baze genetskih podatkov



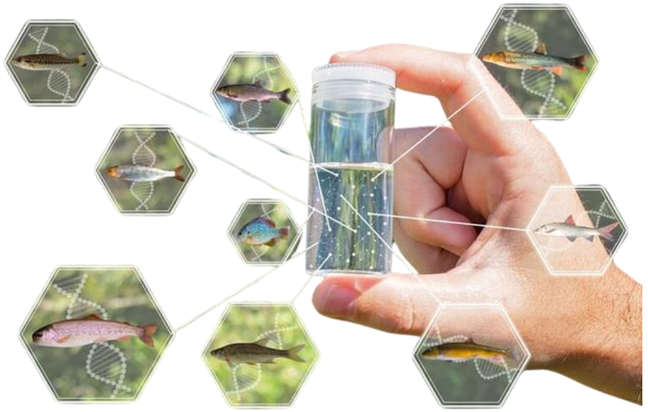
Slika 1: Vsak organizem ima edinstveno, tj. črtno kodo DNA (*angl. DNA barcode*), ki omogočajo izjemno močno orodje za preučevanje biodiverzitete - metabarkodiranje



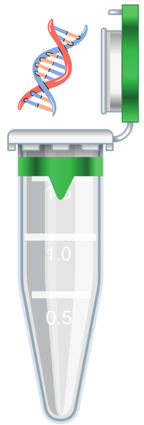
METODOLOGIJA ANALIZ OKOLJSKE DNK (eDNA)

Osnovna metodologija okoljske DNA

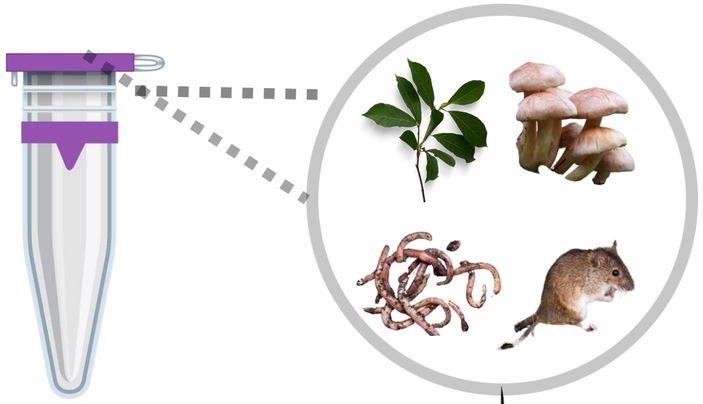
Vzorčenje (neinvazivnih ali eDNA vzorcev)



Izolacija genomske DNA



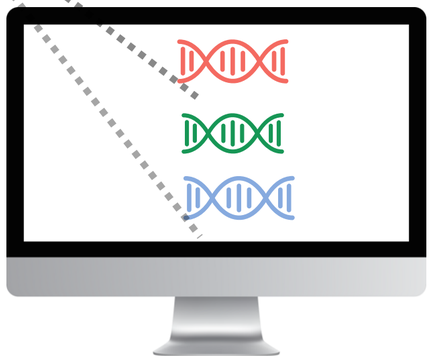
pomnoževanje (qPCR) z univerzalnimi taksonomsko-specifičnimi primerji in vezava indeksov (MIDs, barcodes)



Priprava NGS knjižnic in NGS sekvenciranje



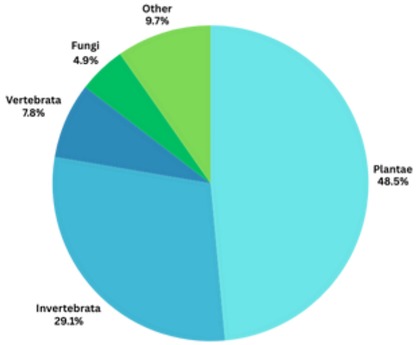
Taksonomska identifikacija



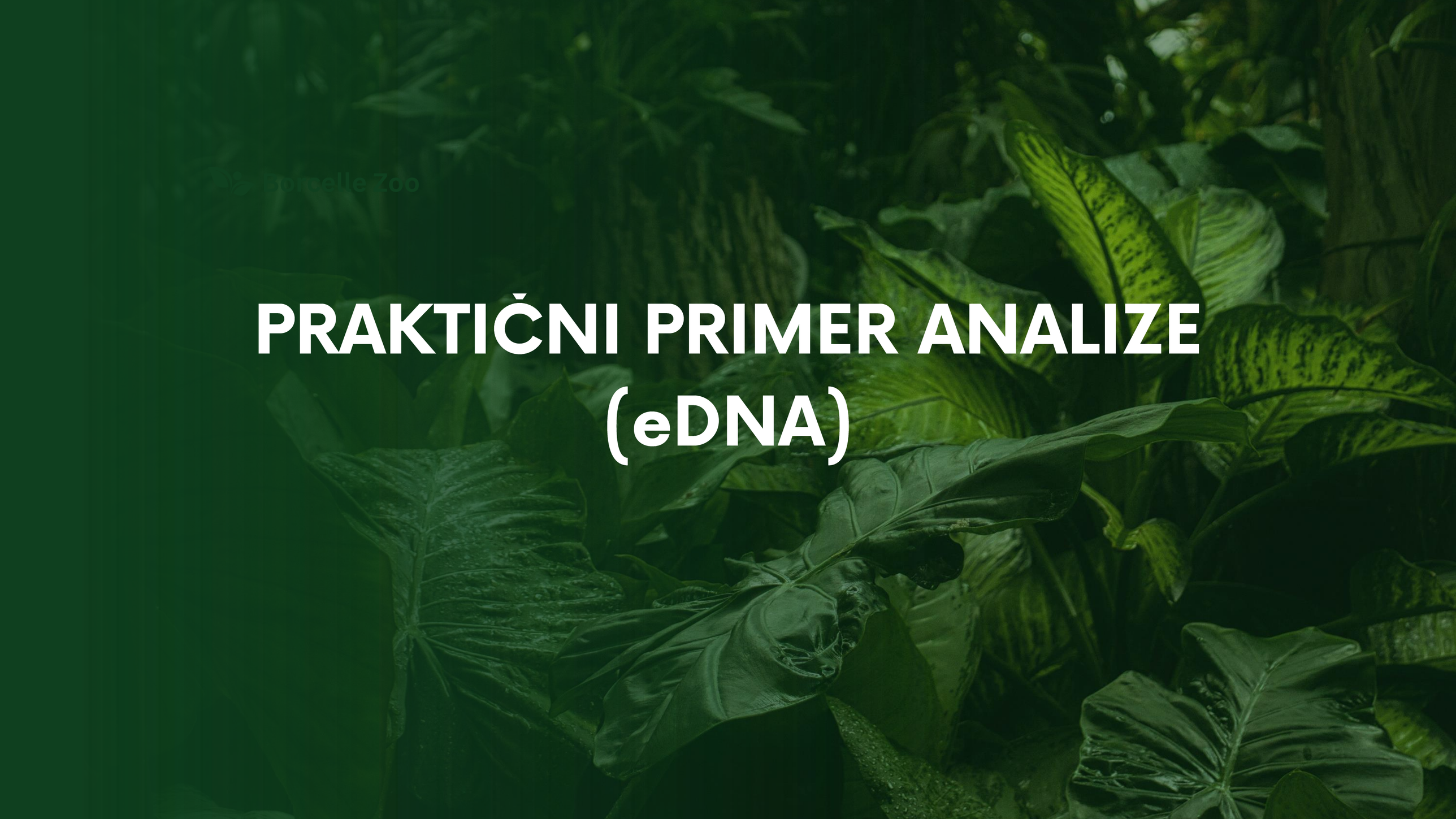
referenčne podatkovne baze DNA

Taxonomy	DNA barcode
Species 1	
Species 2	
Species 3	

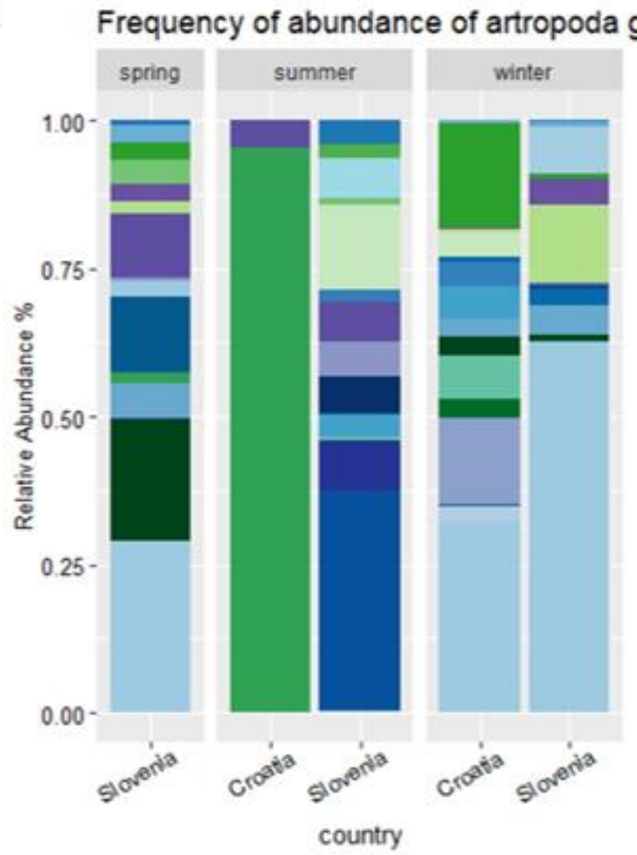
Statistične analize: Analize zastopanosti (FOO%; Frequency of occurance)



Taxa	%
sp. 1	28.6
sp. 2	35.6
sp. 3	14.3
sp. 4	7.2
sp. 6	14.3



PRAKTIČNI PRIMER ANALIZE (eDNA)





Invertebrate analysis	Truncation length	ASV	Different genera	Different species
MIDORI database	160	959	114	117




Tipula sp.


Harpalus sp.


Curculio sp.


Drosophyla sp.


Carabus sp.


Abax sp.


Poecilus sp.

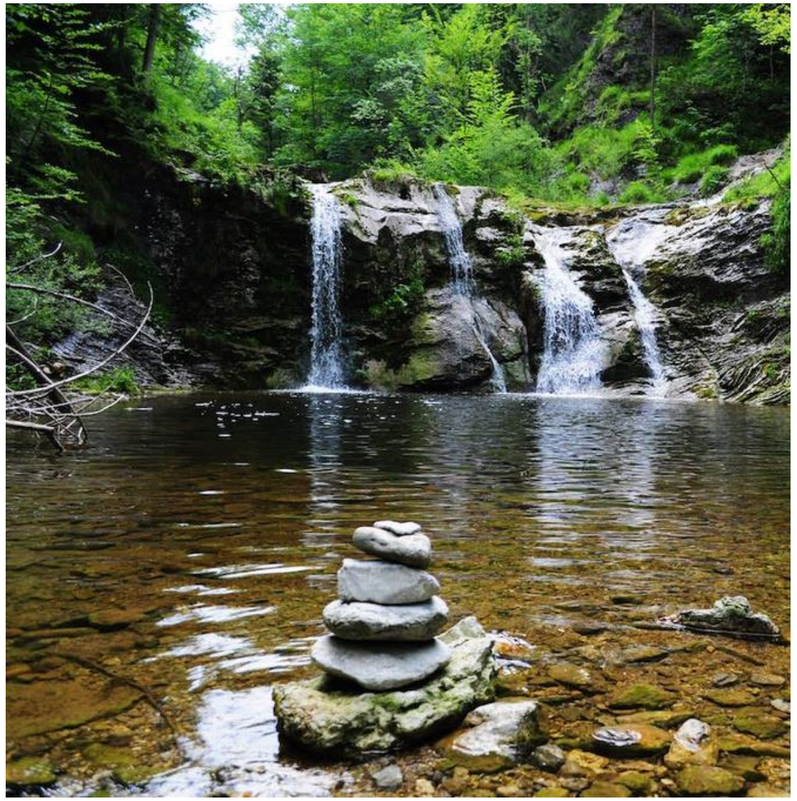
Praktični primer: preučevanje prehrane sesalcev (divjega prašiča) na podlagi neinvazivnih vzorcev iztrebkov

LABORATORIJSKE VAJE - ANALIZA VZORCEV PRSTI (eDNA) ZA IDENTIFIKACIJO TALNIH ORGANIZMOV (nevretenčarji, vretenčarji, rastline, glive)

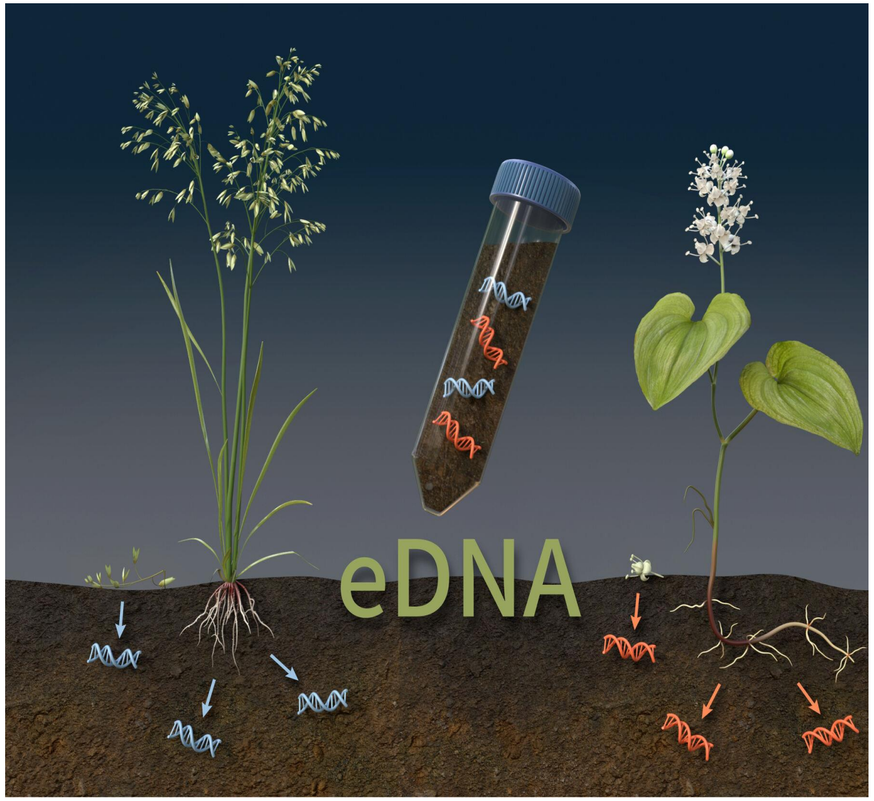
Namen vaje: izolacija eDNA z vzorcev prsti



Kot raziskovalci ste šli na teren



Vzorčili ste vzorce prsti (na terenu 16.10)



Namen laboratorijske analize: izolacija genomske eDNK in detekcija organizmov z vzorcev prsti

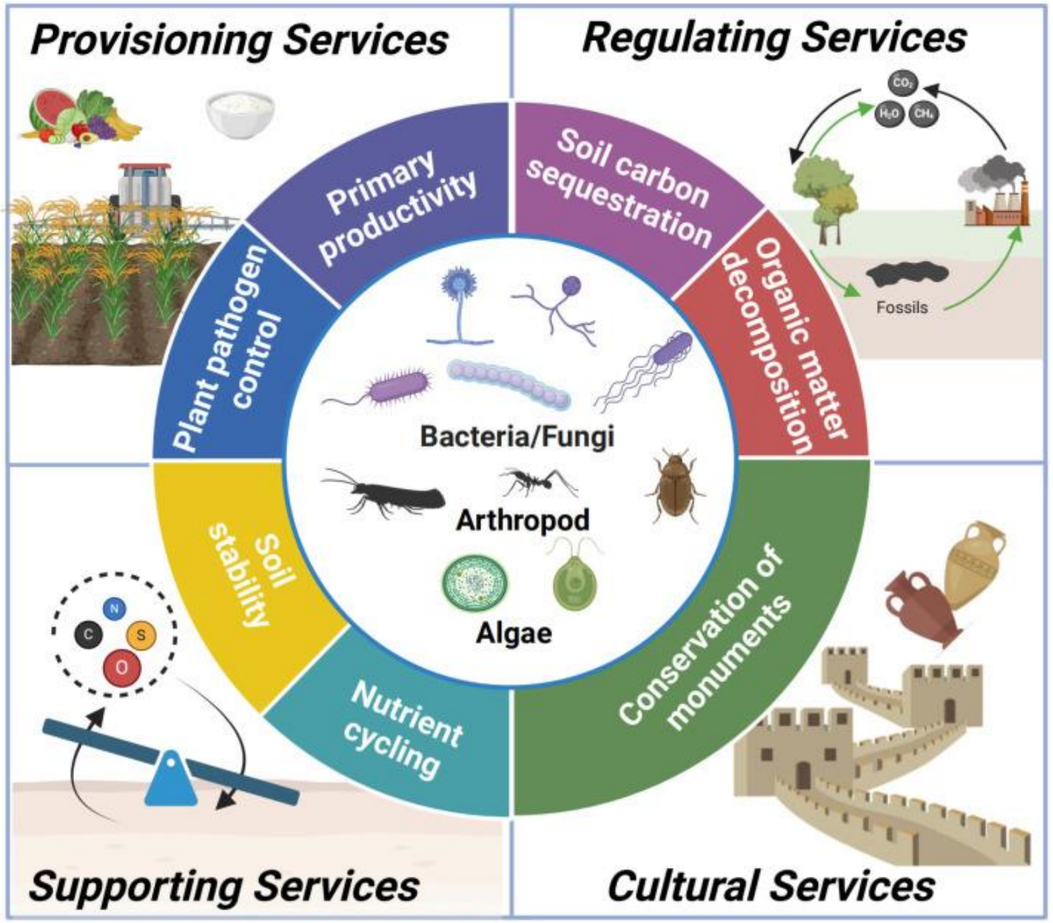
Pomembnost talnih ekosistemov (Fraga Dornellas in sod. 2025)

- Evropa: 60-70% prsti kategorizirane kot kategorija „unhealthy“
- Številni degradacijski procesi ➔ zahteva po monitoringu
- Nujni ukrepi za ohranjanje prsti in restoracijo talnih ekosistemov
- Prst = najbolj biodiverzitetno pester ekosistem Zemlje (1/4 vse kopenske BD)
- Biodiverziteta tal = vsa varieteta življenje v tleh od genov do združb
- Talni organizmi = ključni za ohranjanje ekosistemskih storitev prsti (razgradnja, kroženje snovi, filtracija, čiščenje, prevzem CO2, idr.)
- Talna biodiverziteta (še posebej Arachnida, Insecta, Fungi) eden od najmanj raziskovana v kopenskih ekosistemih

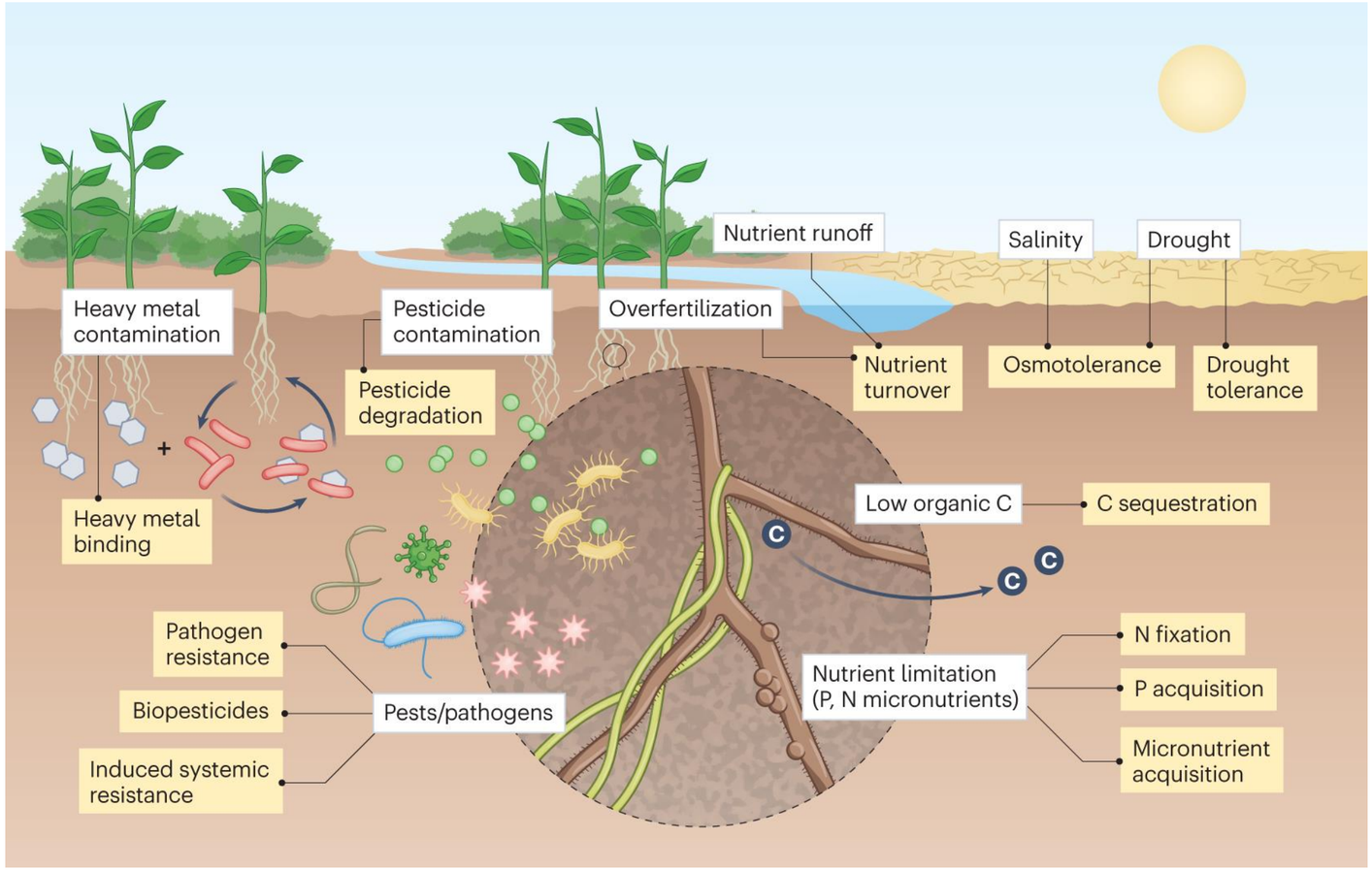


Uporaba metabarkodiranja vzorcev prsti

Proučevanje mikrobioma tal
(Banerjee et al, 2022; Musialowski in sod. 2025)



Proučevanje stanja tal
(Musialowski in sod. 2025)



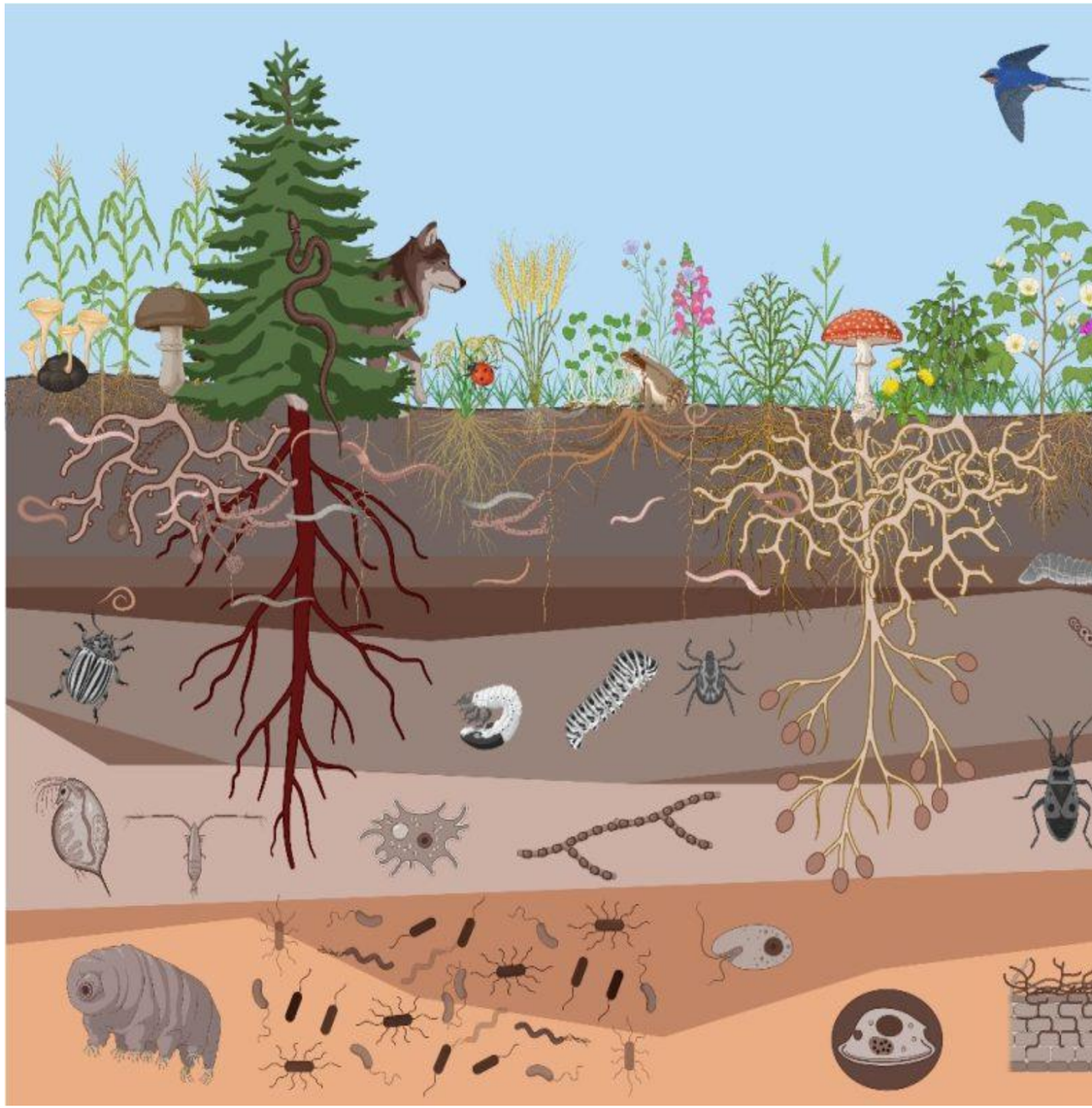
Monitoring biodiverzitete
(Orgiazzi in sod. 2015)

Omogoča vključevanje vseh tipov prsti (e.g. travišč, kmetijskih površin, gozdov, puščav, Arktik, Antarktika, idr.)

Optimizacija vzorčenja in izolacije eDNA vodnih vzorcev:

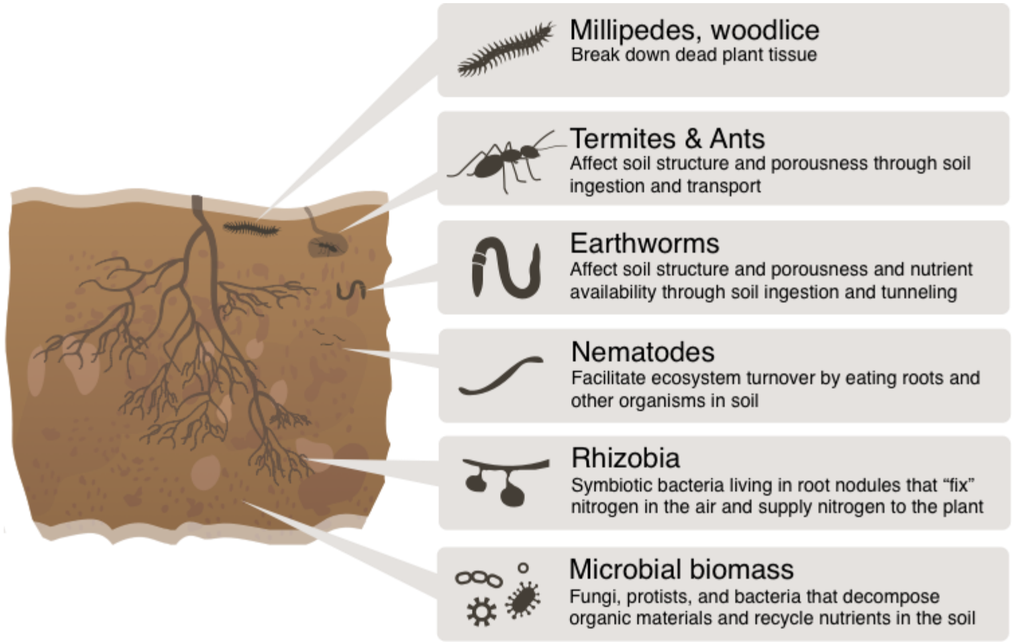
USTREZNO VZORČENJE + HANDLING + SHRANJEVANJE = ključno!

- Lastnosti tal (heterogenost➔ replikati, dobra homogenizacija vzorca)
- Globina vzorčenja ➔ biodiverziteta se razlikuje med talnimi stolpci (poenotenje globine vzorčenja)
- Mesto odvzema (poznavanje ekologije tarčnih organizmov)
- Preprečevanje kontaminacije vzorcev (sterilno orodje, vključevanje neg. kontrole in poz. kontrole, replikati)
- Preprečevanje degradacije DNA in RNA (pufri, -80*C po vzorčenju)
- Encimatski inhibitorji v prsti: kisline, fenolne spojine, snovi, vezane na glino, in druge zaviralce – vključevanje posebnih postopkov za odstranitev

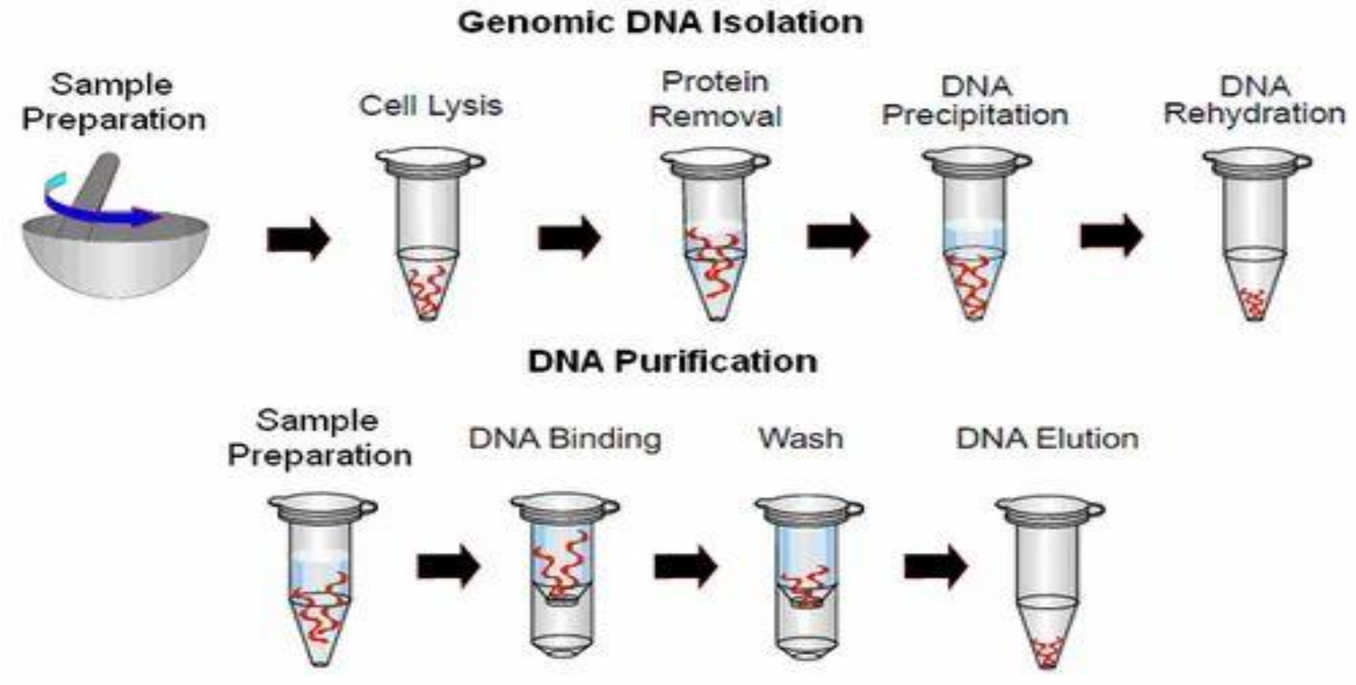


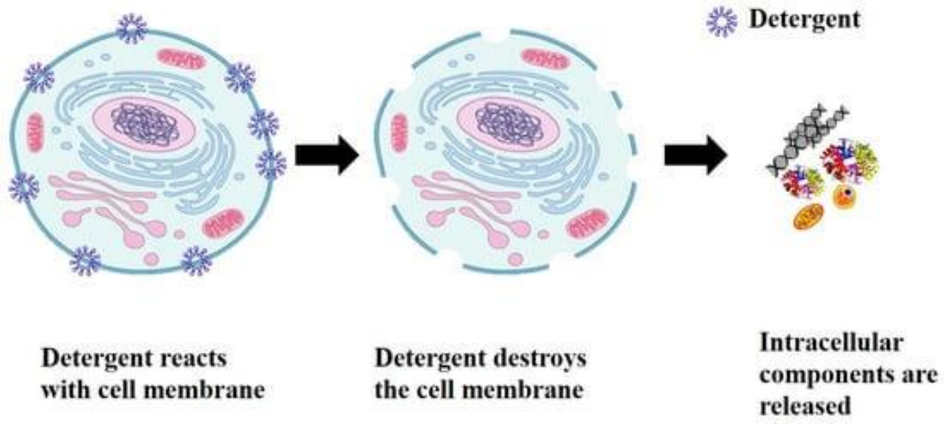
NAŠ EKSPERIMENT: METODOLOGIJA IZOLACIJE: S SODOBNIMI IZOLACIJSKIMI eDNA KITI

- Namen: Izolirali bomo eDNA talnih vzorcev, ki smo jih vzorčili na terenu na območju ritin vs. ne ritin
- *Cilj1*: *Laboratorijske vaje:* osvojiti izvedbo izolacije eDNA vzorcev prsti
- *Cilj2: Laboratorijske vaje:* naučiti se slediti protokolom za analizo izolacije eDNA vzorcev
- *Cilj3: Statistične vaje:* Določiti /identificirati taksone, ki so bili prisotni v talnih vzorcih s pomočjo pristopa metabarkodiranja eDNA vzorcev + analiza zastopanosti taksonov (FOO%)
- V predlogi za laboratorijski dnevnik so dodana vprašanja za eDNA



NAŠ EKSPERIMENT: IZOLACIJA TALNIH VZORCEV ZA MONITORING BIODIVERZITETE PRSTI





OSNOVNI KORAKI IZOLACIJE:

1. LIZACIJA ali LIZA

2. PRECIPITACIJA ali OBARJANJE

3. ČIŠČENJE

4. ELUCIJA DNA

NAŠ EKSPERIMENT: IZOLACIJA TALNIH VZORCEV ZA MONITORING BIODIVERZITETE PRSTI

DNA Extraction and Purification from 250–1,000 mg Soil

LYSE

INHIBITOR REMOVAL

1. Transfer the glass beads from a Disruptor Tube to a 15 mL centrifuge tube. Add 0.25-1 g soil sample and 1 mL SLX-Mlus Buffer. Vortex at maximum speed for 3-5 minutes to lyse samples.

2. Add 100 µL DS Buffer. Vortex to mix thoroughly. Incubate at 70°C for 10 minutes. Briefly vortex the tube once during incubation. Centrifuge at 3,000 rpm for 3 minutes at room temperature.

3. Transfer 800 µL supernatant into a new 2 mL microcentrifuge tube (not provided). Add 270 µL chilled P2 Buffer. Vortex to mix thoroughly. Let sit on ice for 5 minutes. Centrifuge at maximum speed for 5 minutes.

4. Carefully transfer the supernatant to a new 2 mL microcentrifuge tube. Add 0.7 volumes 100% isopropanol. Mix thoroughly by inverting tube for 20-30 times. If the soil contains very low DNA, incubate the sample at -20°C for 1 hour. Centrifuge at maximum speed for 10 minutes. Carefully aspirate and discard the supernatant. Do not disturb the DNA pellet.

5. Invert the tube on absorbent paper for 1 minute to drain the liquid. Add 200 µL Elution Buffer. Vortex for 10 seconds. Incubate at 70°C for 10-20 minutes to dissolve the DNA pellet.

6. Add 100 µL cHTR Reagent that has been completely resuspended. Vortex to mix thoroughly. Let sit at room temperature for 2 minutes. Centrifuge at maximum speed for 2 minutes.

7. Transfer the cleared supernatant to a new 2 mL microcentrifuge tube. If supernatant still has a dark color from the soil, repeat Step 6 for a second cHTR Reagent step. This will require additional cHTR Reagent (Cat# CHTR-50) to be purchased separately.

NAŠ EKSPERIMENT: IZOLACIJA TALNIH VZORCEV ZA MONITORING BIODIVERZITETE PRSTI

BIND

8. Add an equal volume of XP1 Buffer. Vortex to mix thoroughly.

9. Insert a HiBind® DNA Mini Column into a 2 mL Collection Tube. Transfer the sample from Step 8 to the HiBind® DNA Mini Column. Centrifuge at 10,000*g* for 1 minute at room temperature. Discard the filtrate and reuse the Collection Tube.

WASH

10. Add 500 µL HBC Buffer diluted with 100% isopropanol. Centrifuge at 10,000*g* for 1 minute. Discard the filtrate and the Collection Tube.

11. Transfer the HiBind® DNA Mini Column into a new 2 mL Collection Tube. Add 700 µL DNA Wash Buffer diluted with 100% ethanol. Centrifuge at 10,000*g* for 1 minute. Discard the filtrate and reuse the Collection Tube.

12. Centrifuge the empty HiBind® DNA Mini Column at maximum speed for 2 minutes at room temperature. This step is critical in removing residual ethanol that may interfere with downstream applications.

ELUTE

13. Transfer the HiBind® DNA Mini Column into a clean 1.5 mL microcentrifuge tube. Add 50-100 µL Elution Buffer heated to 70°C directly onto the center of HiBind® matrix. Let sit at room temperature for 1-2 minutes. Centrifuge at maximum speed for 1 minute.

14. Take the filtrate from Step 13 and place onto the center of the same HiBind® DNA Mini Column used in the procedure. Let sit at room temperature for 1 minute. Centrifuge at maximum speed for 1 minute.

15. Store eluted DNA at -20°C.