

Jun 17, 2024

Protocolo de coleta de amostras para eDNA metabarcoding usando filtros Sterivex - LGC PUC Minas

DOI

dx.doi.org/10.17504/protocols.io.81wgbz623gpk/v1



Gabriel Antônio Mendes¹, Guilherme Costa Berger¹, Heron O Hilário¹, Daniel Cardoso de Carvalho¹

¹Laboratório de Genética da Conservação - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais



Gabriel Antônio Mendes

Laboratório de Genética da Conservação - Pontifícia Universi...

OPEN  ACCESS



DOI: dx.doi.org/10.17504/protocols.io.81wgbz623gpk/v1

Protocol Citation: Gabriel Antônio Mendes, Guilherme Costa Berger, Heron O Hilário, Daniel Cardoso de Carvalho 2024. Protocolo de coleta de amostras para eDNA metabarcoding usando filtros Sterivex - LGC PUC Minas. **protocols.io**

<https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.81wgbz623gpk/v1>

License: This is an open access protocol distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](#), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited

Protocol status: Working

Este protocolo é utilizado em nossas coletas, foi testado e apresenta resultados confiáveis.

Created: May 07, 2024

Last Modified: June 17, 2024

Protocol Integer ID: 99381

Keywords: DNA ambiental, eDNA, Environmental DNA, Sterivex, eDNA metabarcoding, Coleta de eDNA



Funders Acknowledgement:

FAPEMIG

Grant ID: APQ 02247-23

Abstract

O objetivo deste protocolo é orientar sobre a coleta de amostras de água para empregar a técnica de DNA ambiental (eDNA) *metabarcoding*. Nesta metodologia empregamos os filtros Sterivex, que permitem uma filtragem no local de coleta, com fácil manuseio, menor risco de contaminação e uma melhor preservação de DNA ambiental nas amostras. Este protocolo foi desenvolvido pelo Laboratório de Genética da Conservação - PUC Minas, e está em constante aprimoramento.

Conheça nosso grupo e linhas de pesquisa: <https://sites.google.com/view/lgcpucminas>

Image Attribution

Guilherme Costa Berger

Materials



1. Dois pares de luvas
2. Três filtros Sterivex
3. Três pedaços de filme plástico Parafilm
4. Seis tampas Luer Lock
5. Tubo falcon contendo solução tampão ATL
6. Uma seringa descartável de 60ml
7. Um saco Stand up pequeno
8. Um saco Stand up grande
9. Uma seringa descartável de 10ml

Safety warnings

Cuidados

Evite tocar nos materiais do kit sem luvas. Não entre na água que irá ser coletada.



Before start

Preparação

Primeiramente, certifique-se de realizar a coleta e a filtragem em um ambiente aberto e plano. Se possível, utilize uma superfície esterilizada para apoiar o kit de coleta e seus componentes durante os procedimentos. Após a filtragem e armazenamento das amostras, lembre-se de recolher os descartáveis para efetuar seu descarte adequado. Se possível, realizar os procedimentos em dupla.

Preparação

- 1 Primeiramente, certifique-se de realizar a filtragem em um ambiente aberto e plano. Se possível, utilize uma superfície esterilizada para apoiar o kit de coleta e seus componentes durante os procedimentos. Após a filtragem e armazenamento das amostras, lembre-se de recolher os descartáveis para efetuar seu descarte adequado. Se possível, realizar os procedimentos em dupla.
- 2 O kit de coleta é composto pelos seguintes materiais:



1. Dois pares de luvas
2. Três filtros Sterivex
3. Três pedaços de filme plástico Parafilm
4. Seis tampas Luer Lock
5. Tubo falcon contendo solução tampão ATL
6. Uma seringa descartável de 60ml
7. Um saco Stand up pequeno

8. Um saco Stand up grande
9. Uma seringa descartável de 10ml

Coleta

- 3 Abra o kit com cuidado e coloque um par de luvas para começar a coleta. Evite tocar na superfície externa das luvas.
- 4 A coleta da água pode ser feita diretamente através da seringa (1A), caso seja um local seguro para o coletor e sem o risco de contaminar a água a ser filtrada. Também é possível realizar a coleta utilizando o saco *Stand Up* grande (1B e 1C). Se houver muito sedimento em suspensão na água, aguarde alguns momentos para que estes decantem e proceda com a filtragem.



- 5 Com a seringa de 60ml, colete a água do saco *Stand Up* ou diretamente do ponto amostral (2A).



- 6 Encaixe o Sterivex na Seringa (2B) utilizando o encaixe de rosca luer lock (2C).
- 7 Passe a água pelo Sterivex pressionando o êmbolo da seringa (2D). Esse processo deve ser repetido quantas vezes for necessário. 1 passagem = 60ml de água. Se a seringa ficar obstruída e o êmbolo travar, puxe levemente o êmbolo para remover particulado do filtro, e retome o processo. Evite passar ar pelo filtro, apenas água.



- 8 Após filtrar a quantidade total planejada, desencaixe a seringa do filtro e puxe o êmbolo para a posição inicial, preenchendo a seringa de ar (3A). Encaixe a seringa novamente no Sterivex e aperte o êmbolo, passando o ar pelo filtro Sterivex (3B). Repita esse passo até retirar toda a água do filtro. Este passo é muito importante para garantir a conservação da amostra.



Conservação das amostras

- 9 Após a filtragem, é necessário colocar o tampão ATL para conservar o material genético contido no filtro. Primeiro abra a seringa de 10ml, remova o êmbolo e encaixe uma das tampas *Luer Lock* de cor vermelha na saída da seringa.
- 10 Abra o tubo falcon contendo ATL Buffer, e despeje seu conteúdo na seringa. A tampa *Luer Lock* irá impedir que o tampão saia (4B).



- 11 Cuidadosamente, recoloque o êmbolo na seringa. Com a seringa voltada para cima, retire a tampa *Luer Lock*. Em seguida, encaixe o filtro *Sterivex* que já foi utilizado na filtragem.
- 12 Se o kit contém o *Sterivex* com apenas uma saída *Luer Lock* (5A), utilize um pedaço de *Parafilm* ou de papel-filme para obstruir a saída enquanto coloca o tampão. Esse mesmo papel pode ser utilizado na vedação final da amostra.

Caso seja o Sterivex com duas saídas *Luer Lock* (5B), feche a saída com uma tampa *Luer Lock*.



- 13 Encaixe a seringa preenchida com o tampão ATL na entrada *Luer Lock* do filtro Sterivex. Com seringa para baixo, coloque 2,5ml de tampão ATL em cada Sterivex filtrado. Pressione repetidamente a seringa para facilitar o processo de entrada do tampão (6A).



- 14 Com o Parafilm (6A) ou papel-filme (6B), embale o filtro. Durante o processo de embalo, adicione uma etiqueta de identificação única a cada um dos filtros, possibilitando seu armazenamento e identificação adequados (6C).



- 15 Repita os processos descritos acima para cada uma das replicatas biológicas coletadas em campo.
- 16 Após realizar os procedimentos para cada uma das replicatas, guarde os filtros no saco *Stand Up* pequeno (6C e 7). Certifique-se que o lacre está bem vedado e coloque o saco dentro de um isopor ou caixa térmica com gelo (7). Garanta que as amostras estarão protegidas da luz do sol e do calor.





Observações

- 17
- **Uso de amostras de controle de contaminação da filtração:** estas amostras têm como objetivo garantir que não há contaminação intrínseca ao sistema de coleta. A filtração destas devem ser feitas em um ambiente limpo, utilizando água ultrapura (em experimentos com microorganismos), ou mineral (no caso de experimentos com vertebrados). Estas amostras devem ser extraídas, sequenciadas, analisadas e, caso apresentem ASVs/OTUs, as mesmas podem/devem ser excluídas das demais amostras.
 - **Volume de água:** O volume a ser filtrado em cada filtro (replicata) deve ser padronizado em todos os pontos amostrais. Recomendamos no mínimo 3 passagens de 60ml, mas pode variar devido a qualidade da água, podendo ser decidido pelo pesquisador no momento da coleta se o volume filtrado será maior.