



Fjällräven lever i Skandinavien fjällkedja, bland annat i området som här är fotat från Stor-Axhögen med vy mot Helags.

Bevara fjällräven

För att rädda den utrotningshotade fjällräven behöver vi metoder för att följa hur många de är. Den här övningen visar hur man kan analysera DNA från spillning och med bioinformatiska verktyg få fram detaljerad information.

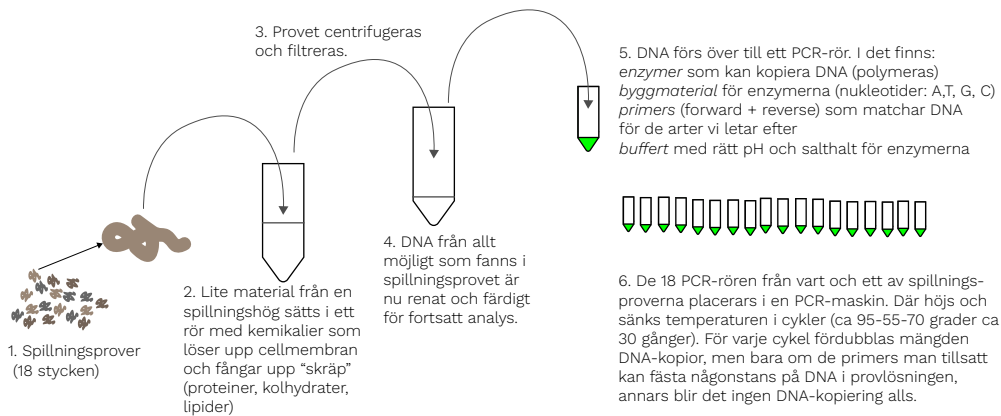
Hur gör man för att rädda en utrotningshotad art? Det beror på vad det är för art, vilka orsaker som finns till att arten är hotad och vilka möjligheter som finns för att påverka läget. För att kunna följa arbetet behöver vi ha koll på antal individer av arten vi vill rädda. För djur som rör sig kan det vara klurigt att räkna dem. Men det finns andra sätt. I den här uppgiften har det samlats in spillning från några områden i fjällerna. Men hur vet man vilket djur som bajsat?

Människan jagade fjällräv (*Vulpes lagopus*) så mycket att den nästan utrotades under 1800-talet. Fjällräven blev fridlyst i Sverige 1928, men det räckte inte för att få arten att återhämta sig. Ökad konkurrens från rödrävar (*Vulpes vulpes*), sämre tillgång på smågnagare (lämmlar) och inavel gjorde att det såg mörkt ut. I slutet av 1900-talet fanns troligen bara ett 50-tal fjällrävar kvar. För att rädda fjällräven satsades på stödutfordring och att avliva rödrävar i fjällerna. Det föddes även upp fjällrävar i fångenskap som släpptes ut. Tack vare alla insatser ser läget mer positivt ut idag för fjällräven. I en rapport från 2022 framkommer att det finns ca 560 vuxna fjällrävar och att det under året föddes 164 kullar med fjällrävsungar (72 i Norge, 91 i Sverige och en i Finland). Under det året släppte man också ut 25 fjällrävar från ett avelsprogram.

Uppgift 1

Hur många rödrävar, fjällrävar och järvar kan vi hitta i ett fjällområde där man samlat in spillningsprover? Innan vi kan svara på frågan beskrivs metoderna.

Bakgrund: När man hittar rovdjursspillning kan det vara svårt att se om det är från rödräv, fjällräv eller järv, tre arter som lever i fjällområdet. Förutom att man kan se rester av det som djuren ätit (päls- och benrester) finns celler från djurets tarmkanal som kan användas för att identifiera djuret som lämnat spillningen. För att ta reda på hur många individer det finns av en viss art, kan man inventera spillningshögar och sedan göra DNA-tester på celler i spillningen för veta vilket djur som bajsat.



Förklaring av DNA-analys:

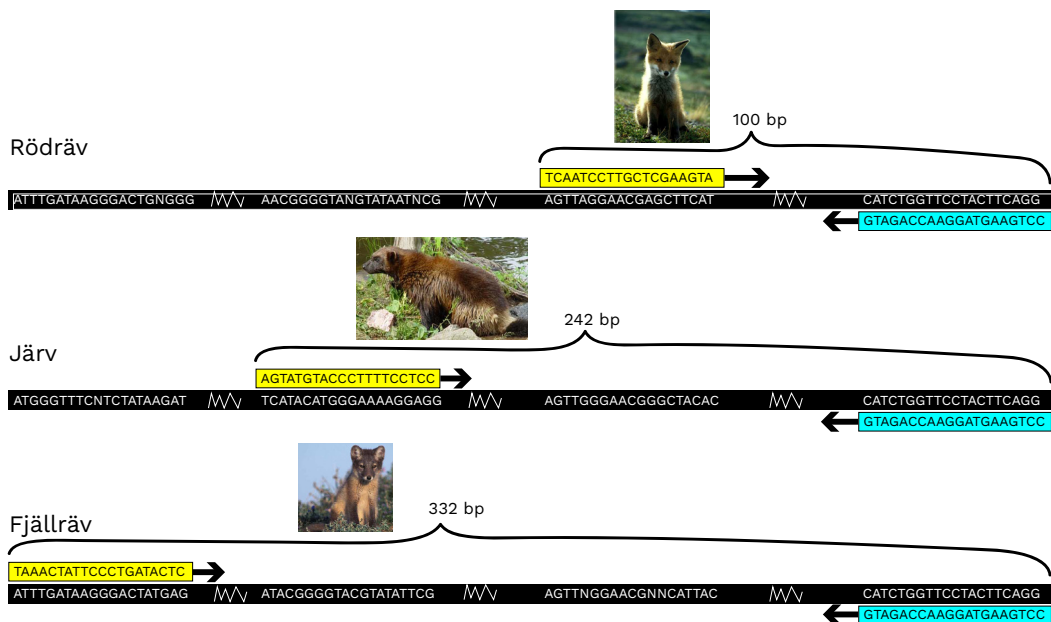
Bilden ovan visar hur DNA extraheras från 18 spillningshögar och förbereds för metoden PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Vi vill undersöka om spillningen kommer från rödräv, fjällräv eller järv. Vi kan med PCR-metoden söka specifikt efter dessa arter med hjälp av små DNA-bitar som kallas för primers.

Primers beställs färdiga med en speciell ordning på kvävebaserna som gör att de passar mot DNA hos de djur man letar efter (se bilden nedan). Det behövs en "framåtprimer" (forward) och en "bakåtprimer" (reverse) för att markera start och slut på det område som ska kopieras upp.

Kopieringsenzymerna (DNA-polymeras) bygger bara där en primer sitter fast på DNA. De använder DNA-nukleotider som "byggmaterial" (A, T, G, C). De ingår i blandningen (se punkt 5 i bilden ovan).

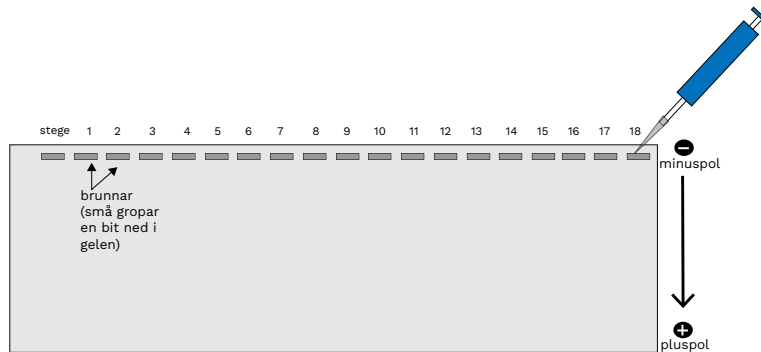
I bilden nedan visas tre olika artspecifika forward primers (gula) och en och samma reverse primer (blå). Om det finns DNA från rödräv i ett spillningsprov så kommer det efter att man kört proverna i en PCR-maskin att finnas DNA-kopior (DNA-fragment) som blir 100 baspar (bp) långa. För järv blir DNA-kopiorna istället 242 bp och för fjällräv 332 bp. Längderna (antal bp) är viktiga i analysen.



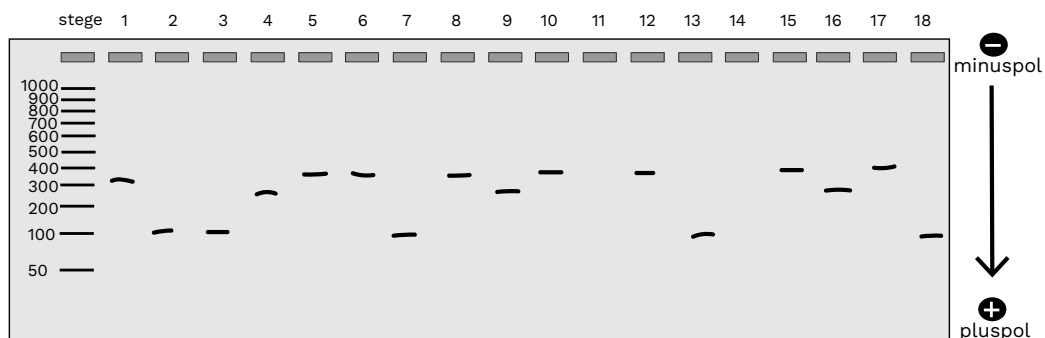
Källa: Dalén L, Götherström A, Angerbjörn A (2004) Identifying species from pieces of faeces. *Conservation Genetics*, 5, 109-111

Analys med gelelektrofores: De olika arterna vi letar efter ger efter PCR-metoden DNA-bitar av olika längd efter PCR-körningen (100, 242 och 332 baspar långa). Metoden gelelektrofores separerar molekyler efter deras storlek.

I gelelektrofores använd en gelplatta som har små gropar ("brunnar") i ena änden. Man använder en pipett för att suga upp lite PCR-prov. I bilden på gelen nedan har man satt till PCR-proverna (1-18) överst på gelen. Längst till vänster har man också tillsatt en storleksstandard ("stege") som innehåller färdiga DNA-bitar i storleksområdet 50-1000 bp.



En elektrisk spänning har lagts över gelplattan (minuspol överst, pluspol nederst i bild). DNA är minusladdat och därför kommer DNA-molekylerna som finns i proverna att röra sig mot pluspolen (rakt nedåt i bilden).



Tolkning av resultatet: DNA har ingen färg, men vi tillsätter färgämnen som binder till DNA så att det syns. I gelen som visas i bilden ovan motsvarar varje band (streck) DNA av en viss längd. Korta DNA-kopior rör sig snabbare genom gelplattan än längre DNA-kopior. **Läs av gelen och för in resultaten i tabellen nedan.**

Art\Prov	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Rödräv (100 bp)																		
Järv (242 bp)																		
Fjällräv (332 bp)																		

- Hur många spillningsprover kom från rödrävar, järvar och fjällrävar i fjällområdet?
- Kan vi med denna metod avgöra hur många individer av varje art som finns i området där vi samlat in spillningen? Varför/varför inte?

Uppgift 2

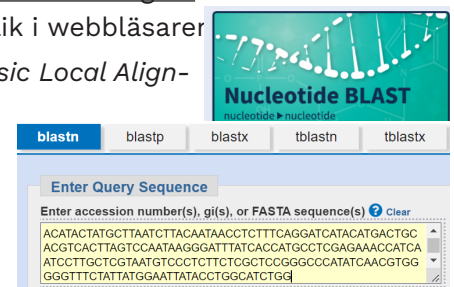
För att få veta mer krävs en fortsatt analys där DNA sekvenseras. Då får man reda på ordningen på kvävebaserna i DNA-bitarna som man kopierat upp med PCR-metoden. Genom att sedan jämföra sekvenserna med stora databaser som innehåller många sekvenser kan man få mer detaljerad information.

Resultatet av sekvenseringen för ett av de 18 proverna gav följande DNA-sekvens:

```
ACAATTACCTCACACCCCCTTAAAAAAGTTGCCCTATGTACGTCGTGCATTACTGTTATGCCC  
CATGCATATAAGCATGTACATATATTTATATTATTACATAAGACATACTATGCTTAATCTTACAA  
TAACCTCTTTTCAGGATCATACTGACTGCACGTCACCTTAGTCCAATAAGGGATTATCACCATGC  
CTCGAGAAACCATCAATCCTTGCTCGTAATGTCCCTCTTCTCGCTCCGGGCCATATCAACGT  
GGGGGTTTCTATTATGAATTATACCTGGCATCTGG
```

Gör så här:

1. Kopiera sekvensen ovan (Ctrl + C eller motsvarande kommando).
2. Gå till databasen *NCBI Gene Bank* via länken: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (OBS! Håll ned Ctrl eller motsvarande för att öppna i en ny flik i webbläsaren).
3. Välj ingång "Analyze". I listan med olika analysverktyg, välj *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)*. Klicka på *Nucleotide BLAST*.
4. Klistra in sekvensen (Ctrl + V) i den första rutan under *Enter Query Sequence*.
5. Scrolla ner och klicka på *BLAST*. Vänta!
6. **Resultatsidan:** Kolumnen *Max score* visar träffar sorterade från högre till lägre värde på "score" (högt "score" betyder större likhet mellan den sekvens du matat in och matchningen i databasen).
 - a. Hur många "poäng" (*Max Score*) har den översta träffen?
 - b. Hur många procent likhet har den översta träffen (se kolumn *Per.Ident*)?
 - c. Hur lång (i antal baspar, bp) är träffen i databasen (se kolumn *Acc.Len*)?
 - d. Vilken djurart stämmer DNA-sekvensen bäst överens med?
Ange latinskt namn (*Scientific name*) och ta reda på det svenska namnet.



I kolumnen *Accession* visas ett "ID-nummer". Klicka på det för den översta träffen, dataposten öppnas. Läs informationen vid rubriken *FEATURES* och svara på frågorna:

- e. Kommer DNA-sekvensen från cellkärnans eller mitokondriens DNA?
- f. Är det en sekvens som är "konserverad" (individer inom samma art har samma sekvens) eller "hypervariabel" (individer inom en art har olika sekvenser)?
- g. Kan DNA-sekvensdata användas för att svara på hur många fjällrävar det finns ett område? Motivera.

Uppgift 3

Läs på sidan 1 och notera vilka stödinsatser som gjorts för fjällräv.

Diskutera hur DNA-metoder skulle kunna användas för att följa upp stödinsatserna.

Uppgift 4

Varifrån kommer sekvensdatat? Kopiera titeln (*TITLE*) på den vetenskapliga artikeln som angavs i databasträffen. Sök rätt på artikeln på nätet. Läs abstract. Vilket syfte hade undersökningen? Vad de kom fram till?