

## NUKLEIINHAPETE ERALDAMINE MAGMAX VIRAL/PATHOGEN II NUCLEIC ACID ISOLATION KITIGA (APPLIED BIOSYSTEMS)

### 1 TÖÖPÕHIMÕTE / MEETODI LÜHIKIRJELDUS

Antud protokoll kirjeldab, kuidas teostada nukleiinhapete eraldust 200 µl-st proovimaterjalist Terviseameti rahvatervise labori nakkushaiguste osakonnas, kasutades KingFisher Flex (ThermoFisher) eraldusrobotit. MagMAX Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation kit on magneetiliste kerakesete tehnoloogial (Berensmeier, 2006) põhinev nukleiinhapete puhastamise komplekt. Kiti sisu on loetletud Tabel 1.

**Tabel 1** MagMAX Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation kit (Applied Biosystems) sisu ja säilitamistingimused

| Komponent                                  | Maht (2000 reaktsiooni) | Nõuded säilitamistingimustele |
|--|-------------------------|-------------------------------|
| Sidumislahus ( <i>Binding Solution</i> )   | 550 ml                  | 15 °C kuni 25 °C              |
| Pesulahus ( <i>Wash Solution</i> )         | 1000 ml                 |                               |
| Elueerimispuhver ( <i>Elution Buffer</i> ) | 100 ml                  |                               |
| Proteinaas K ( <i>Proteinase K</i> )       | 10 ml                   |                               |
| Magnetkerakesed ( <i>Binding Beads</i> )   | 20 ml                   |                               |

### 2 TÖÖKÄIK

1. Too analüüsimiseks mõeldud proovid oma töökohale.
2. Loe proovide arv kokku ning koosta eralduse protokoll, arvestades sisse ka eralduse negatiivse kontrolli (EK).
3. Teosta proovide eeltöötlus laminaari all vastavalt juhendile.
4. Valmista ette ja markeeri 1,5 ml RNAaside vabad mikrotuubid vastavalt protokollis registreeritud proovide ja kontrollide arvule.
5. Laminaari all sega proovid vorteksil 5 sek vahetult enne.
6. Vala valmistatud mikrotuubidesse kogu eeltöödeldud proov järgides hoolega proovi ja vastava tuubi märgistus.
7. Valmista pesu- ja elueerimisplaadid ette eelnevalt RNaseZap või analoogse tootega ja 70% etanooliga puhastatud tööpinnal (NB! puhastusjärjekord oluline) KingFisher Flex jaoks vastavalt Tabel 1.
8. Ära lisa reaktiive süvenditesse, kus protokollis järgi pole proovimaterjali ega kontrollmaterjali.

**Tabel 1.** Proovidest eraldamiseks MagMAX Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation kitiga vajalik plaatide komplekt ühe eralduse jaoks KingFisher Flex robotiga

| Plaadi nimetus  | Plaadi asukoht robotil | Plaadi tüüp         | Reagent                   | Maht <i>per well</i> |
|-----------------|------------------------|---------------------|---------------------------|----------------------|
| <i>Wash 1</i>   | 2                      | 96 <i>deep-well</i> | <i>Wash Buffer</i>        | 500 µl               |
| <i>Wash 2</i>   | 3                      | 96 <i>deep-well</i> | 80% etanool (vt Märkus 4) | 500 µl               |
| Elueerimisplaat | 4                      | 96 <i>deep-well</i> | Elueerimislahus           | 50 µl                |

- 8.1. Kata valmistatud plaadid ajutise kattega *MicroAmp Clear Adhesive Film* ning hoiad need toatemperatuuril seni kuni valmistad prooviplaati (NB! kuni 1 tund).

9. Valmista sidumiskerakeste segu vastavalt tööprotokollis registreeritud proovide arvule puhtal tööpinnal:
  - 9.1. Valmista ette üks 15 ml või 50 ml (sõltuvalt valmistava lahuse lõppkogusest) steriilne tuub puhtal tööpinnal.
  - 9.2. Sega magnetkerakeste lahus (*Binding Beads*) vorteksil 30 sek ja veendu, et magnetkerakeste lahus on homogeenne vahetult enne sidumiskerakeste segu valmistamist.
  - 9.3. Arvuta vastavalt koostatud protokollile vajalik komponentide maht arvestades 1 proovi kohta 265 µl sidumislahust (*Binding Solution*) ja 10 µl magnetkerakeste lahust (*Binding Beads*) pluss 10% kadu.
  - 9.4. Sega lahust loksutades seda hoolikalt edasi-tagasi ning jätta valmistatud segu kõrvale ootele. Välti mullide teket.
10. Jätka prooviplaadi valmistamisega laminaarkapi all:

**Märkus 1\*:** Sõltuvalt edaspidi rakendatavast meetodist (KJ 9.19) lisa või ära lisa 10 µl sisemist kontrolli.

**Märkus 2\*\*:** Puukidest nukleiinhapete eraldamisel tuleb kasutada diagnostikumi VIASURE Tick Borne Diseases Real Time PCR Detection Kit sisemist kontrolli, mille puhul

- 1) resuspendeeri IC viaal 500 µl nukleasivaba veega (diagnostikumis sisalduv),
- 2) jaga IC alikvootideks,
- 3) lisa 5 µl sisemist kontrolli proovide ja eralduskontrolli süvenditesse.

**Märkus 3\*:** Proteinaas K ja sisemise kontrolli võib segada eelnevalt igal kasutuspäeval ja hoida seejärel jääl. Proteinaas K ja sisemise kontrolli segu on stabiilne jääl kuni 8 tundi.

- 10.1. \*(*Valikuline*) Sõltuvalt edaspidi rakendatavast meetodist sega 1,5 ml mikrotuubis kokku 5 µl Proteinaas K ja 10 µl/\*\*5 µl sisemist kontrolli (IC ehk *internal control*) ühe proovi kohta. Arvuta vastavalt protokollis registreeritud proovide arvule ja uuritavale näitajatele vajamineva lahuse ruumala arvestades alati lahuse lõppmahule lisaks ühe proovi ruumala.
- 10.2. Valmista ette puhas 96 *deep-well* plaat.
- 10.3. Lisa igasse süvendisse 5 µl proteinaas K lahust või \*15 µl/\*\*10 µl proteinaas K ja sisemise kontrolli segu vastavalt protokollile ja uuritavale näitajale.
- 10.4. Lisa prooviplaadile 200 µl proovimaterjali vastavalt valmistatud protokollile.
- 10.5. Lisa 200 µl nukleasivaba vett negatiivse kontrollmaterjali süvendisse.
- 10.6. Pööra sidumiskerakeste segu õrnalt 5 korda edasi-tagasi homogeniseerimiseks, seejärel lisa igasse prooviplaadi süvendisse vastavalt koostatud protokollile 275 µl.
11. Veendu, et KingFisher Flex eraldusrobot on töövalmis õigete varuosadega: „96 *deep-well* magnetic head“ ja „96 *deep-well* heating block“ (seadme kasutusjuhend).
12. Laadi valmistatud plaadid instrumenti vastavalt valitud protokollile (KingFisher Flex programm **MVP\_2Wash\_200\_Flex**, ekraanil oranž kategooria „RNA“). Käivita programm.
13. Oluline: programmi lõppemisel aurustumise vältimiseks eemalda elueerimisplaat viivitamatult instrumendist, seejärel kata plaat kilega MicroAmp Clear Adhesive Film.

14. Peale eraldust või pärast järgmiste analüüside teostamist tõsta eraldatud proovid elueerimisplaadilt 1,5 ml RNAaside vaba ja *low binding* mikrotuubidesse või jäta neid plaadi peale ning säilita  $(+5\pm3)$  °C juures jooksva tööpäeva lõpuni või  $(-24\pm4)$  °C juures kuni 6 kuud või kuni aasta  $(-80\pm5)$  °C juures.