

PUUKIDE EELTÖÖTLUS NUKLEIINHAPETE ERALDUSEKS

1 TÖÖPÕHIMÕTE / MEETODI LÜHIKIRJELDUS

Meetodi materjaliks on eelnevalt morfoloogiliselt või muul meetodil määratud *I. ricinus* ja *I. persulcatus*. Nukleiinhapete eraldamiseks tuleb esmalt ultrasügavkülmikus (-80 ± 5) °C juures säilitatud koondproovidel lasta toatemperatuurini sulada. Seejärel eraldada eeltöödeldud koondproovid üksikproovideks ja need homogeniseerimisseadmega steriilsetes homogeniseerimistuubides lüüsipuhvriga lõhustada. Homogeniseeritud materjal tuleb tsentrifuugida, mis võimaldab eraldada pealislahuse (ingl. *supernatant*). Edasises etapis eraldatakse pealislahusest nukleiinhapped.

2 TÖÖKÄIK

2.1 Algmaterjali homogeniseerimise etapp

1. Too (-80 ± 5) °C juures säilitatud algmaterjal laminaarkapi alla toatemperatuurile sulama. Arvesta sulamisel (15 ± 5) minutiga.
2. Märgista homogeniseerimistuubid.
3. Kui koondproovideks jaotatud algmaterjal on üles sulanud, too eelnevalt tähistatud homogeniseerimistuubid laminaarkapi alla.
4. Pipeteeri puukide jaoks mõeldud tuubidesse ja EK (eralduskontroll) tuubi 50 µl Lysis Solution RL lüüsipuhvrit.
5. Tõsta steriilse külviasaga (1 µl) üks puuk vastavalt tähistatud homogeniseerimistuubi.
6. Sule kõik homogeniseerimistuubid korralikult ja lae homogeniseerimisseadme Mixer Mill Type MM 301 adapterplaadid.
7. Vii läbi esimene homogeniseerimise tsükkel, valides ajaks 1 minut ja 30 sekundit ning sageduseks 25.
8. Esimese tsükli lõppedes pööra adapterplaadid teisele küljele ja vii läbi teine homogeniseerimise tsükkel sama aja ja sagedusega.
9. Teise tsükli lõppedes kontrolli visuaalselt materjali homogeniseerituse astet – vajadusel korda homogeniseerimise tsikleid.
10. Homogeniseerimist on vaja korrata, kui visuaalselt on märgata, et puugi kest ei ole purunenud või on ainult osaliselt purustatud. Homogeniseerimise tsüklid võib lõpetada, kui ei ole võimalik enam puugi kehaosasid eristada ja materjal on täielikult lõhustatud.
11. Eemalda adapterplaadid seadmest ja homogeniseerimistuubid plaatide vahelt.
12. Vii lõhustatud materjaliga homogeniseerimistuubid uuesti laminaarkapi alla.
13. Pipeteeri lõhustatud puuke sisaldavatesse tuubidesse ja EK tuubi lisaks 400 µl lüüsipuhvrit.
14. Inkubeeri proove toatemperatuuril termomikseril 30 minutit, 450 rpm.
15. Inkubeerimise lõppedes tsentrifuugi homogeniseerimistuubid tsentrifuugis 10 000 x rcf (g), 2 minutit.
16. Valmista ette steriilsed mikrotuubid (1,5 ml), mis märgista homogeniseerimistuubide järjekorranumbritega ja EK tähistusega.
17. Pipeteeri laminaarkapi all 420 µl pealislahust ja EK sisu vastavalt tähistatud steriilsetesse mikrotuubidesse (1,5 ml).

18. Vii 1,5 ml mikrotuubid pealislahustega külmkappi (5 ± 3) °C juurde ootele kui analüüs jätkub samal päeval.
19. Alternatiivselt võib säilitada pealislahuseid (-24 ± 4) °C juures külmkapis kuni 6 kuud või (-80 ± 5) °C ultrasügavkülmikus kuni 1 aasta.