

Van
Goffe Elsinga
Michiel Hootsmans

Onderwerp
Methode monsterfiltratie en DNA conservatie t.b.v.
bronopsporing fecale besmettingen in zwemwater

Datum
19 mei 2022

Bestemd voor
John Hin, RWS-WVL

Kopie / afschrift
Carmen Hogendoorn, RWS-WVL

Pagina
1/4

Monsterfiltratie en DNA conservatie t.b.v. bronopsporing fecale besmettingen in zwemwater

Beginsel

Concentratie van het water monster geschiedt door middel van filtratie. Filtreer het te onderzoeken monster over een geschikt membraan filter. Behandel het membraanfilter met een hoeveelheid Ammonium oxalaat en vervolgens met PBS om eventueel aanwezig ijzer, dat de extractie en PCR reactie remt, in het monster te verwijderen. Stop het filter in het bead-beat buisje (buisje met glaskorrels) en voeg hier vervolgens buffer aan toe. Na incubatie bij 65°C wordt het buisje geschud in een machine (bead-beaten), waardoor de cellen kapot gaan en het DNA vrijkomt. Hierna worden de buisjes ingevroren en bewaard bij -20°C totdat ze op transport naar KWR gaan voor DNA extractie en PCR analyses.

Reagentia

Bij deze bepaling wordt gebruik gemaakt van DNA en daarom dienen alle reagentia en benodigdheden vrij te zijn van DNA en stoffen (bijvoorbeeld DNase) die invloed hebben op het DNA.

DNase-vrij water

Water dat geschikt is voor moleculaire werkzaamheden en vrij is van DNA, RNA, DNase en RNase.

RNase-away

Schoonmaakvloeistof (met chloor) voor het verwijderen van DNA en RNA besmettingen op bijvoorbeeld pincetten en filtratieopstelling.

Ethanol (70%)

Desinfectievloeistof voor het afspoelen van RNase-away op bijvoorbeeld pincetten en filtratieopstelling. Dit hoeft niet perse een "molecular biological grade" ethanol te zijn, maar mag een 70% ethanol met 10% isopropanol oplossing zijn, wat commercieel verkrijgbaar is en bedoeld is voor reinigen en desinfecteren van werkoppervlakten.

Ammonium Oxalaat oplossing 0,5M pH3

Samenstelling

Ammonium oxalaat monohydraat ($C_2H_8N_2O_4 \cdot H_2O$) CAS: 6009-70-7

71,055 g

Demiwater

1000 ml

Bereiding

Los het Ammonium oxalaat monohydraat op in demiwater. Ammonium oxalaat monohydraat lost beter op bij verwarmen. Verwarm het ammonium oxalaat eerst in een waterbad bij 50°C voor het stellen van de pH. Stel de pH door middel van toevoeging van 10M (30%) zoutzuur (HCl) op pH 3,0. Per liter ammonium oxalaat oplossing moet er ongeveer 35 ml 10M zoutzuur toegevoegd worden. Steriliseer deze oplossing door een 0,2 µm membraanfilter. Deze oplossing bewaren bij kamertemperatuur. Na verloop van tijd kan er neerslag ontstaan in de oplossing. Dit moet door middel van verwarmen weer worden opgelost.

1x PBS oplossing

Gibco – Life Technologies

PBS Tablets (100 tablets) – 18912-014

Bereiding

Voeg 1 tablet, zonder deze met de blote handen aan te raken, toe aan 500 ml DNA/RNA-vrij water en laat het tablet oplossen. Schud de fles even om een homogene oplossing te krijgen.

Procedure blanco

Neem bij elke monsterserie een procedure blanco mee. Deze blanco bestaat uit 100 ml DNase-vrij water. Filtreer en behandel de blanco verder op dezelfde wijze als de monsters.

DNeasy® PowerBiofilm® Kit

Kit van leverancier Qiagen (art.nr. 24000-50) voor het conserveren en isoleren van DNA.

Inhoud van de kit:

PowerBiofilm® Bead Tubes

Solution MBL

Solution FB

Solution IRS

Solution MR

Solution PW

Solution Ethanol

Solution EB

MB Spin Column

2 ml Collection Tubes

Toestellen, glaswerk en hulpmiddelen

- Opstelling voor membraanfiltratie.

Voorbeeld: Millipore Microfil® 3-post Base w/tubing no Tulip
Millipore EZ-Fit™ Manifold 6-place for Microfil®

- Vacuumpomp

Voorbeeld: Millipore EZ-Stream vacuum pump for liquid transfer

- Vortex

- PowerLyzer
Voorbeeld: Qiagen PowerLyzer 24 Homogenizer
Omni International Bead Ruptor elite
- Broedstoof, ingesteld op circa 55°C (voor verdampen ethanol en verwarmen van buffer MBL)
- Massief verwarmingsblok (Dry heat block) ingesteld op 65°C.

Hulpmiddelen

- Pincetten
- Latex/Nitril handschoenen
- Micropipetten. Diverse micropipetten, voor het pipetteren van diverse volumina, met bijbehorende pipetpuntjes welke voorzien zijn van geïntegreerd filter.
- Membraanfilters. Gebruik Polycarbonate Track-Etch Membrane filter met een poriegrootte van 0,2 µm en een diameter van 47 mm.
Voorbeeld: Sartorius nr. 23007--47-----N
- Plastic filterbekers, behorend bij de filterunit en geschikt voor 47 mm filters.
- Petrischalen 94x16 mm (art. nr. 632161), te gebruiken als deksel voor plastic filterbekers

Te onderzoeken monster

Begin het onderzoek bij voorkeur onmiddellijk na de monsterneming. Bij koeling van het monster bij $5 \pm 3^\circ\text{C}$ moet binnen 48 uur na monsterneming met het onderzoek worden begonnen of zoveel eerder als mogelijk.

Werkwijze

Draag tijdens alle stappen latex/nitril handschoenen. Verwissel deze regelmatig om besmetting van monster en materiaal te voorkomen. Verwissel ze in ieder geval als je van ruimte wisselt.

Voor gebruik dienen de filterunit en de pincetten te worden schoongemaakt. Doe dit door er RNase-away op te spuiten. Het is handig om de pincetten in een plastic bakje te leggen tijdens het in laten werken van de RNase-away. Laat de RNase-away op zowel de pincetten als de filterunit minimaal 15 minuten inwerken. Zuig daarna de filterunit droog m.b.v. de vacuümpomp.

Doe deze stap 2x: Spoel de filterunit schoon met 70% ethanol in een spuitfles, zuig dit af.

Doe deze stap ook 2x: Spoel de unit na met DNase-vrij water.

Spoel de pincetten schoon met 70% ethanol (spuitfles) en plaats ze voor minimaal 5 minuten bij 55°C in de broedstoof, zodat de ethanol verdampt. Hierna kunnen de filterunit en de pincetten gebruikt worden.

Voor ieder monster dient een nieuwe plastic filterbeker gebruikt te worden. Gebruik een petrischaal als deksel voor op de plastic filterbeker, dit voorkomt contaminatie van de naastgelegen filterbekers door spetteren.

Filtreer vervolgens de watermonsters door het membraanfilter. Probeer van oppervlaktewatermonsters minimaal 100 ml te filtreren, hoewel dit bij monsters met veel onopgeloste deeltjes niet altijd zal lukken. Filtreer als laatste de procedure blanco (100 ml DNase-vrij water) . Om remming in de analyses door eventueel aanwezig ijzer in de monsters te voorkomen, wordt er 10 ml Ammonium oxalaat (0,5 mol/l, pH 3,0) op de filters gegoten. Spoel het filter, na filtratie van het Ammonium oxalaat, na met PBS (20 ml is voldoende) zodat alle ammonium oxalaat verwijderd is.

Monster filtratie en conservatie van het DNA

1. Filtreer de monsters door het membraanfilter met behulp van de filtreeropstelling.
2. Spoel de filters met 10 ml Ammonium oxalaat (0,5 M, pH3,0).
3. Spoel de behandelde filters na met PBS (ongeveer 20 ml).
4. Vouw de filters in 3x op tot een punt (zonder de bovenkant van het filter aan te raken) m.b.v. een steriele pincet en stop de filters in de bead-beat buisjes. Zorg dat de inhoud op het filter niet door het vouwen naar buiten komt. Het beste is om na de 2^e vouw, de 3^e vouw niet helemaal af te maken, maar de twee uiteinden bij elkaar vast te pakken met de pincet en het filter vervolgens onderin het buisje te stoppen/drukken.
5. Voeg 350 µl MBL (voorverwarmd op 55°C) toe aan de bead-beat buisjes met filter.
6. Voeg 100 µl FB toe aan de bead-beat buisjes. Vortex kort om het geheel te mixen.
7. Incubeer de bead-beat buisjes 10 minuten bij 65°C in het verwarmingsblok (zorg ervoor dat de filters onder het vloeistofniveau zitten van de buffers).
8. Bead-beat de buisjes vervolgens 30 seconden bij 5.000 rpm in de PowerLyzer.
9. Vries de bead-beat buisjes vervolgens in bij -20°C.