infoPoint

Nukleinsäure-Dekontamination mit der DNA/RNA-ExitusPlus™

Anwendung

Der ungewollte Eintrag von DNA und RNA kann Analyse-Ergebnisse verfälschen oder gar ein biologisches Sicherheitsrisiko darstellen. Daher ist die vollständige DNA/RNA-Dekontamination von Oberflächen und Instrumenten eine Grundvoraussetzung für sicheres Arbeiten und für verlässliche PCR-Analysen. DNA/RNA-ExitusPlus™ ist eine sichere Dekontaminationslösung für alle molekularbiologischen Labore. Katalytische, kooperative Effekte der Komponenten dieser Lösung bewirken einen sehr schnellen, nichtenzymatischen und nicht Sequenzspezifischen Nukleinsäure-Abbau.



DNA-Beseitigung – Ganz oder gar nicht

Im Gegensatz zu anderen kommerziellen Produkten erreicht DNA/RNA-ExitusPlus™ einen schnellen Nukleinsäure-Abbau auf der Basis einer wässrigen Lösung ohne toxische Nebenwirkungen auf den Anwender oder korrosive Effekte auf Geräte oder die Umwelt. Die meisten Dekontaminations-Reagenzien basieren auf denselben molekularen Prinzipien, welche die DNA modifizieren oder denaturieren. Dabei wird die DNA jedoch nur maskiert – die genetische Information bleibt erhalten und es besteht das Risiko, dass diese chemisch wieder reaktiviert wird. Aber nur der Abbau in kleinste DNAFragmente kann die vollständige und sichere DNA-Dekontamination gewährleisten. Abb. 1 fasst den Vergleich der DNA-Fragmentierung durch DNA/RNA-ExitusPlus™ und konventionelle Reagenzien zusammen. In diesen Tests zeigte nur die Behandlung mit DNA/RNA-ExitusPlus™ einen DNA-Abbau, während andere Dekontaminations-Produkte, die auf DNA-Modifikation oder - Denaturierung beruhen, nur sehr geringe DNA-Fragmentierung bewirkten (einige davon enthielten noch die vollständige genetische Information).

Keywords

- Nukleinsäure-Dekontamination
- DNA-Abbautest
- PCR, qPCR

Sequenz-unspezifischer DNA-Abbau

PanReac AppliChem patentierte DNA/RNA-ExitusPlus™-Lösungen erzielen einen schnellen und effizienten Abbau von Nukleinsäuren. Die Methode basiert auf einem chemischen, nicht enzymatischen Prinzip. Daher ist die Fragmentierung völlig unabhängig von der Sequenz und Länge von DNA-Fragmenten. Der vollständige Abbau von großen DNA-Spezies wie Plasmiden benötigt länger als der Abbau kleiner DNA-Moleküle (z.B. Primer). Einzel- und Doppelstrangbrüche werden dabei zufallsverteilt über die ganze Sequenz eingefügt; so kann keine homogene Klasse an DNA-Fragmenten entstehen.

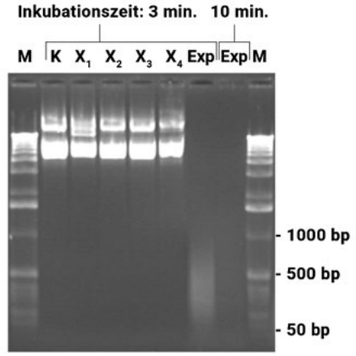


Abb. 1. Vergleich des DNA-Abbaus durch DNA/RNA-ExitusPlus™ und anderer kommerzieller Dekontaminations-Reagenzien.
Jeweils 200 ng CCC Plasmid-DNA wurden 3 oder 10 Minuten mit 5 µl der bezeichneten Reagenzien behandelt.
M: Molekulargewichtsmarker (1 kb Leiter), K: Kontrolle (mit Wasser behandelt), Exp: DNA/RNA-ExitusPlus™, X1, X2, X3, X4: andere Reagenzien.

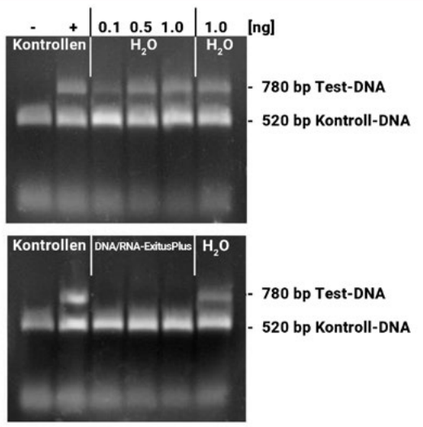


Abb. 2. PCR-Test zum Nachweis des vollständigen DNA-Abbaus durch DNA/RNA-ExitusPlus™. Test-DNA (0,1 bis 1 ng) wurde in PCR-Gefäßen getrocknet und 20 Sekunden mit sterilem Wasser (H_2O) oder DNA/RNA-ExitusPlus™ behandelt und 2x nachgewaschen. Für die PCR wurden 50 µl von jedem Ansatz verwendet. Kontroll- DNA wurde zur Amplifikationskontrolle in allen PCR-Ansätzen mitgeführt.
Ergebnis: Amplifikation eines 520 bp PCR-Produkts zeigt intakte Kontroll-DNA im PCR-Ansatz an. Dagegen zeigt das Ausbleiben eines 780 bp-Produkts den vollständigen Abbau der Test-DNA. Wasser-behandelte Negativ-Kontrollen (H_2O) zeigen Banden aus Test- und Kontroll-Template-DNA während in DNA/RNA-ExitusPlus™- behandelten Proben nur Kontroll-DNA amplifiziert wurde.

Die sensitive PCR-Analyse zeigt, dass nach Behandlung von Test-DNA mit DNA/RNA-ExitusPlus™ keine amplifizierbare DNA mehr vorhanden ist (Abb. 2), was den effizienten DNA-Abbau belegt. In diesem Experiment wurden definierte DNA-Proben auf der inneren Oberfläche eines Reaktionsgefäß' getrocknet und nachfolgend mit DNA/RNA-ExitusPlus™ behandelt. Nur aus Positivkontrollen und wasserbehandelten Proben konnte Test-DNA amplifiziert werden. Dagegen ergaben DNA/RNA-ExitusPlus™-behandelte Proben kein entsprechendes PCR-Produkt.

Das Besprühen von Laboroberflächen mit DNA/RNA-ExitusPlus™ sorgt für vollständige DNA-Dekontamination. Die Reaktionszeit von DNA/RNA-ExitusPlus™ korrespondiert mit der üblichen Trockenzeit (10 - 20 Minuten).

Unerwünschte Nebenwirkung von konventionellen Mitteln: Korrosion

Die meisten gebräuchlichen DNA-Dekontaminations-Reagenzien enthaltenaggressive Chemikalien mit bekannten korrosiven,gefährlichen oder gar toxischen Wirkungen. Inhaltsstoffe wie Azide, mineralische Säurenwie Phosphorsäure oder Salzsäure, aggressive Peroxide und stark alkalische Substanzen wie Natriumhydroxid werden bis heute eingesetzt. Daher beobachtet man schon nach nur 20 Minuten Einwirkungsdauer vielfach starke irreversible Korrosionen auf den verschiedenen Metalloberflächen (Abb. 3). Die neu entwickelte und patentierte Zusammensetzung und Wirkungsweise von DNA/RNA-ExitusPlus™ bewährt sich dagegen auch in diesem Test. Auf allen Metalloberflächen ist keine Spur von Korrosion oder Beschädigung zu beobachten.

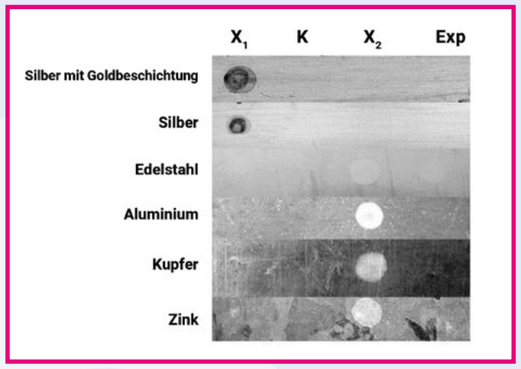


Abb. 3. Korrosives Potenzial konventioneller DNA-Dekontaminationsmittel im Vergleich mit DNA/RNA-ExitusPlus™.
Metalle, wie sie üblicherweise für Laborausstattungen oder Geräte verwendet werden, wurden 20 Minuten mit den Lösungen inkubiert. Kontrolle (K) mit sterilem Wasser; X1, X2 (Wettbewerbsprodukte).

Autoklavieren alleine reicht nicht!

Autoklavieren wird allgemein für ein wirkungsvolles Verfahren gehalten, um DNA zu beseitigen. Lange ging man davon aus, dass beim Autoklavieren hauptsächlich Fragmente von 20 bis 30 Basenpaaren erhalten bleiben. Neuere Untersuchungen zeigen aber, dass nach Autoklavieren noch einzelne größere DNAFragmente durch PCR-Analytik nachweisbar sind [1]. Dies ist besonders dann der Fall, wenn die Nukleinsäuren durch Proteinhüllen (z.B. Viren) oder innerhalb von Mikroorganismen (z.B. Bakterien) geschützt sind. Da DNA/RNA-ExitusPlus™ aufgrund seiner chemischen Zusammensetzung nicht hitzesensitiv ist und auch keine flüchtigen, gesundheitsschädlichen Substanzen enthält, wurde Autoclave-ExitusPlus™ entwickelt. Dies ist eine Pulvermischung, die Medien oder Zellkulturen zum DNA-Abbau zugegeben wird. Abb. 4 zeigt den Effekt von Autoclave-ExitusPlus™ auf Bakterienkulturen und Nukleinsäuren nach dem Autoklavieren. Es zeigt sich, dass der Abbau der bakteriellen DNA nur mit Zusatz von Autoclave-ExitusPlus™ effizient herbeiführt wird, während die Vergleichsprobe unter den gängigen Bedingungen in Medium oder Wasser immer positiv ausfällt.
Daher muss Autoklavieren als Mittel zur Entfernung von DNA aus Mikroorganismen neu bewertet werden. Neuere Ergebnisse zeigen, dass Nukleinsäuren aus Viren und Bakterien durch einfaches Autoklavieren nicht ausreichend inaktiviert werden.

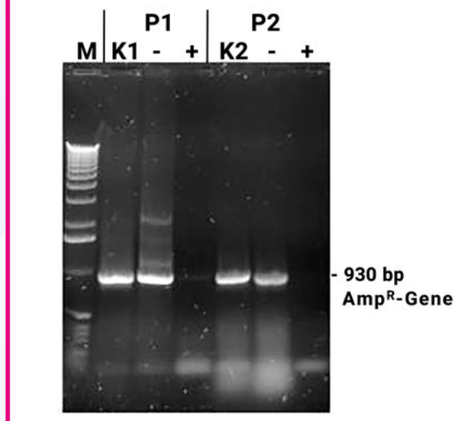


Abb. 4. PCR-Analyse von *E. coli*-Kulturen nach dem Autoklavieren mit oder ohne Autoclave-ExitusPlus™.
Zwei rekombinanten *E. coli*-Kulturen (P1 und P2), die das Ampicillin- Resistenzgen (AmpR-Gen) tragen, wurden autoklaviert. Proben (2 µl) der behandelten Kulturen wurden mittels PCR auf das Vorhandensein von vollständigem AmpR-Gen untersucht.
M: Molekulargewichtsmarker, (-): *E. coli*-Kultur nur mit Wasser autoklaviert, (+): *E. coli* mit Autoclave-ExitusPlus™ autoklaviert, (K1 und K2): *E. coli* mit Autoclave-ExitusPlus™ behandelt und Template-DNA für das AmpR-Gen im PCR-Ansatz zur Amplifikationskontrolle.

Zusammenfassung

Das tatsächliche Potential eines DNA-Dekontaminationsmittels kann nur durch die Kombination aus PCR-Tests mit DNA-Abbautests überprüft werden. So werden falsche Ergebnisse durch Modifikation und Maskierung von DNA oder durch bloße Hemmung der PCR ausgeschlossen.

In den DNA/RNA-ExitusPlus™-Lösungen werden milde, nicht korrosive Inhaltstoffe für den schnellen, nicht-enzymatischen Abbau von Nukleinsäuren eingesetzt. Schon kurze Inkubationszeiten mit DNA/RNA-ExitusPlus™ entfernen unerwünschte DNA und RNA von Arbeitsflächen und Instrumenten.

Literatur

[1] Elhafi, G. et al. (2004) Microwave or autoclave treatments destroy the infectivity of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus but allow detection by reverse transcriptasepolymerase chain reaction. Avian Pathology **33, 3003-306.**

Nukleinsäure-Dekontamination mit der DNA/RNA-ExitusPlus™

IP-020DE;202211

Nukleinsäure-Dekontamination mit der DNA/RNA-ExitusPlus™

- Katalytische und kooperative Effekte der Lösungskomponenten erreichen den schnellen, nichtenzymatischen, Sequenz-unabhängigen Abbau von DNA- und RNA-Molekülen.
- Alle Komponenten der DNA/RNA-ExitusPlus™-Lösungen sind biologisch abbaubar und für den Menschen unschädlich und nicht toxisch.
- Es werden keine aggressiven mineralischen Säuren oder Laugen verwendet, so dass auch Geräte und Materialien selbst bei längerer Einwirkungsdauer nicht angegriffen, geschädigt oder gar zerstört werden.

Verfügbare Produkte:

Produktcode	Produktname	Packungsgröße
A7600,1000	Autoclave-ExitusPlus™	Pulver zur Behandlung von 6 x 1 L Medium oder Zellkultur
A7089,0100	DNA/RNA-ExitusPlus™	100 mL
A7089,0500		500 mL
A7089,1000RF		1 L
A7089,2500RF		2.5 L
A7409,0100	DNA/RNA-ExitusPlus™ IF	100 mL
A7409,0500		500 mL
A7409,1000RF		1 L
A7409,2500RF		2.5 L
A7409,5000		5 L



Anmerkung: DNA/RNA-ExitusPlus™ enthält einen leichten Farbindikator um die behandelte Oberfläche sichtbar zu machen. Die IF = 'Indicator-Free' (Indikator-freie) Version A7409 ist dagegen fast farblos.
Die meisten Packungsgrößen werden mit Sprühpistole geliefert, außer RF = 'ReFill' (Nachfüll)-Flasche, ohne Sprühaufsatz.

IP-020DE

AppliChem GmbH
Ottoweg 4
D-64291 Darmstadt
Germany
Phone +49 6151 9357 0
Fax +49 6151 9357 11
info.de@itwreagents.com

ITW Reagents, S.R.L.
Corso Milano 31
I-20900 Monza (MB)
Italy
Phone +39 039 9530 360
Fax +39 039 9530 361
info.it@itwreagents.com

Panreac Química S.L.U.
C/ Garraf 2, Polígono Pla de la Bruguera
E-08211 Castellar del Vallès (Barcelona)
Spain
Phone +34 937 489 400
Fax +34 937 489 401
info.es@itwreagents.com

itwreagents.com