

# AppliChem

☞ Nr.1

## Nukleinsäure-Dekontamination mit der ExitusPlus™-Technologie



**Die moderne Gentechnik zeigt, dass in vielen Fällen schon freie DNA-Moleküle für Infektionen, Rekombinationen oder biologische Transformationen ausreichen [1,2]. Zusätzlich werden die Nachweisverfahren für DNA-Moleküle immer sensitiver. Daher wird die Detektion von Kontaminationen oder die Verhinderung von Amplifikations-Artefakten in der PCR für die Gentechnik, die Kriminalistik, die Biomedizin und die Hygiene immer wichtiger. Die vollständige Dekontamination von Geräten und Materialien von DNA-Molekülen wird so zu einem entscheidenden Faktor für die allgemeine biologische Sicherheit.**

AppliChem

### Keywords

**Nukleinsäure-  
Dekontamination**

**DNA-Degradationstest**

**PCR-Test**

**Autoklavieren von DNA**

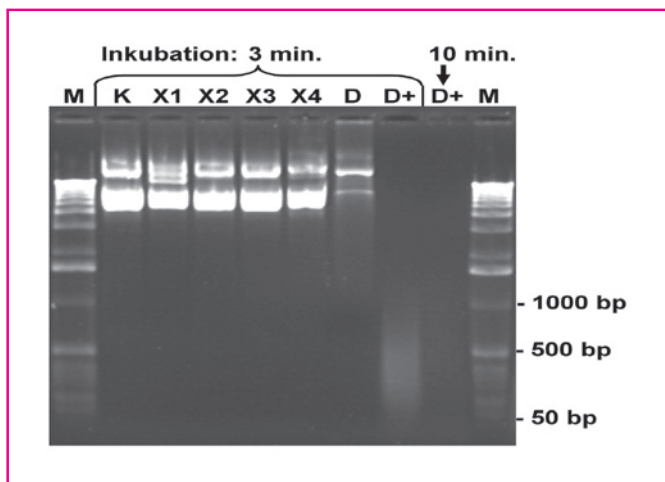
### Alles oder Nichts: Erstaunliche Erkenntnis

Das Mittel der Wahl zur Beseitigung von Kontaminationen durch Nukleinsäuren ist immer noch Chlorbleichlaugung („bleach“) – ein Mittel das alles zerstört, nicht nur die Nukleinsäure. Dies hat uns veranlasst in Kooperation mit multiBIND Biotech, Köln, nach einer unschädlichen Alternative zu suchen und die molekulare Wirkungsweise der auf dem Markt befindlichen sonstigen DNA-Dekontaminationsmittel zu untersuchen. Hierfür wurde unter sehr hoher Belastung (großer DNA-Überschuss) mit definierten DNA-Kontaminationen die Eigenschaften der konventionellen Mittel verglichen. Zwei Probleme werden offensichtlich: Erstens werden durch die konventionellen Mittel in keinem Fall die DNA-Moleküle effizient zerstört und zweitens enthalten diese Mittel Komponenten mit stark korrosiven oder giftigen Eigenschaften. Als Fazit daraus hat sich für uns die Notwendigkeit der Neuentwicklung einer effektiven Lösung zur DNA-Dekontamination ergeben, die wir hier als DNA-ExitusPlus™ und Autoclave-ExitusPlus™ vorstellen. Im Vergleich zu den herkömmlichen Produkten wird DNA und RNA schnell und effizient zerstört, ohne dass das Reagenz korrosive oder giftige Eigenschaften aufweist.

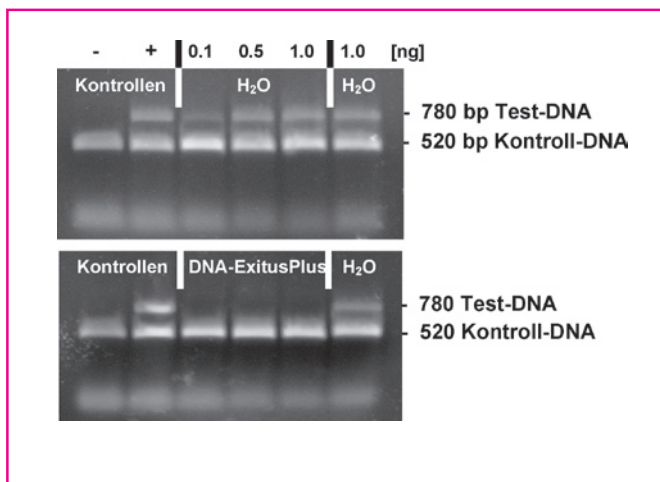
Bei der DNA-Dekontamination unterscheidet man nach der molekularen Wirkungsweise der eingesetzten Mittel drei Grundprinzipien zur Zerstörung oder Inaktivierung der genetischen Information: Modifikation, Denaturierung und Degradation. Je nach Zusammensetzung der Mittel können diese drei Prinzipien einzeln oder in Kombination angewandt werden.

Da nach den aktuellen Erkenntnissen zum biologischen Risikopotenzial von freien DNA-Molekülen für eine wirklich sichere DNA-Dekontamination die Zerlegung dieser DNA-Moleküle in möglichst kleine Fragmente die wirkungsvollste Methode ist, wurden die gängigen konventionellen Mittel mit unserer Neuentwicklung DNA-ExitusPlus™ im DNA-Degradationstest verglichen. Der DNA-Degradationstest erlaubt einen sensitiven, quantitativen Vergleich der Geschwindigkeit des DNA-Abbaus (Abb. 1 und 2).

Unerwarteter Weise haben wir festgestellt, dass einige der bekannten kommerziellen Mittel nur mit dem Prinzip der Modifikation oder Denaturierung der DNA-Moleküle arbeiten. Eine Zerlegung der DNA-Stränge erfolgt dabei nicht, sondern die genetische Information, für die diese DNA-Stränge kodieren, wird eigentlich nur maskiert. Eine chemische Demaskierung der DNA-Moleküle durch Entfernung der blockierenden Gruppen würde die genetische Information wieder lesbar und amplifizierbar machen. Nach dem heutigen Wissensstand zur Gentechnik und der Problematik der Neukombination von Erbtägern sind solche Mittel eigentlich nicht mehr zeitgemäß. Aber auch die Mittel, die zu einer nachweisbaren Degradation



**Abb. 1 Test der DNA-Degradation durch konventionelle DNA-Dekontaminationsmittel im Vergleich mit DNA-ExitusPlus™.** Es wurden jeweils 200 ng CCC-Plasmid-DNA in 10 µl Wasser mit 5 µl der angegebenen Lösungen für 3 bzw. 10 Minuten bei Raumtemperatur behandelt. Anschließend wurden die Proben mit Bromphenolblau-Ladepuffer versehen und für 3 Minuten bei 92°C denaturiert. Die denaturierten Proben wurden sofort auf 4°C abgekühlt und komplett auf das Gel aufgetragen. Die DNA wurde nach der Gelelektrophorese im 1%-igen Agarosegel mit Ethidiumbromid angefärbt und fotografiert. Die Kontrolle (K) zeigt die intakte CCC-Plasmid-DNA (7 kb; 200 ng, 10 µl) nach Behandlung mit sterilem Wasser [5 µl]. Bei Einfügung von Strangbrüchen entstehen Fragmente mit kleinerem Molekulargewicht. Diese können im Gel durch den Vergleich mit der Kontrolle und mit dem Molekulargewichtsmarker [M; 1 kb Leiter] identifiziert werden. Die Produkte X1-X4 zeigen unter diesen Bedingungen praktisch keine Degradation der Test-DNA. Bei der Probe D [herkömmliches DNA-Exitus™] beobachtet man unter diesen Bedingungen nur partielle Degradationen. Einzig DNA-ExitusPlus™ [D+] zeigt einen sehr schnellen fast vollständigen DNA-Abbau bereits nach 3 Minuten, so dass nur noch eine kleine restliche Fraktion von Fragmenten kleiner als 500 Basenpaare identifiziert wird. Nach 10 Minuten ist unter den Testbedingungen keine DNA mehr nachweisbar.



**Abb. 3 PCR-Test zum Nachweis der vollständigen Entfernung von DNA-Kontaminationen durch DNA-ExitusPlus™.** Test-DNA [0,1 bis 1 ng] wurde in PCR-Gefäßen getrocknet und dann 20 Sekunden mit sterilem Wasser oder DNA-ExitusPlus™ behandelt. Kontroll-DNA ist in allen Proben [520 bp PCR-Produkt]; Test-DNA [780 bp PCR-Produkt]; Negativkontrolle = H<sub>2</sub>O.

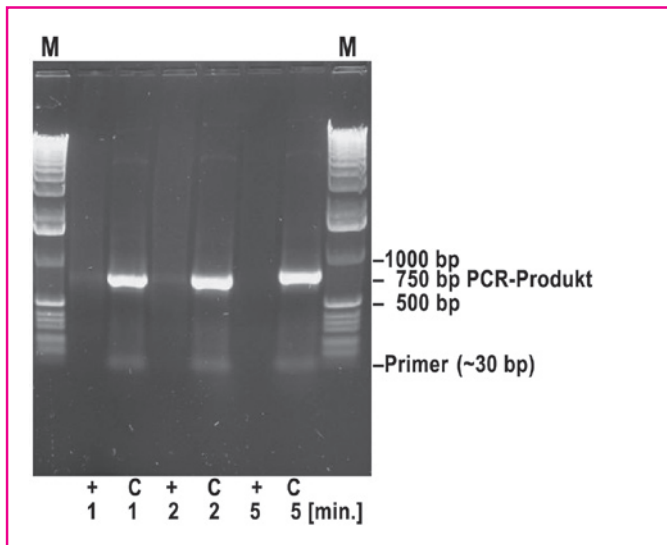
der DNA-Stränge führen, bewirken bestenfalls einen partiellen Abbau. Es bleiben auch hier noch sehr große DNA-Fragmente übrig (Abb. 1), die zum Teil noch immer die vollständige genetische Information oder zumindest wichtige Teile davon enthalten können.

#### DNA-ExitusPlus™ baut Nukleinsäuren sequenzunabhängig ab

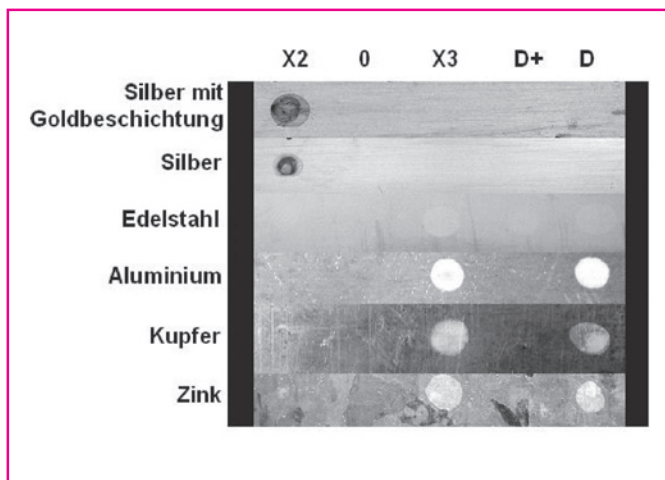
Die Strangbruchaktivität von DNA-ExitusPlus™ ist unabhängig von der Größe der DNA-Fragmente und erfolgt chemisch – nicht enzymatisch. Große Plasmide erfordern eine längere Inkubationszeit als kleine Fragmente (z.B. Primer). Zur Verdeutlichung: Hätte man beispielsweise eine Aktivität, die theoretisch 100.000 Nicks pro Minute in DNA-Stränge einfügt, so ist klar, dass damit alle DNA-Fragmente unabhängig von ihrer Größe abgebaut werden. Die kleinen Fragmente sind dann nur schneller vollständig abgebaut als die großen. Daher bleibt bei sehr hoher DNA-Konzentration bei einem Test-Molekül von 6 kb in CCC-Form nach 5 Minuten auch noch eine Fraktion von kleinen Fragmenten mit 200 bis 500 bp Größe nachweisbar, während Primer (ca. 30 Nucleotide) in der selben Zeit komplett abgebaut werden (Abb. 2). Die Strangbrüche erfolgen statistisch völlig zufällig verteilt und die resultierenden Fragmente stellen deshalb nicht eine einzige Klasse von Molekülen dar (keine definierte Erkennungssequenzen wie bei Enzymen!). Daher ist die PCR auch für die Fraktion der etwas größeren DNA-Stücke negativ. Wenn man DNA-ExitusPlus™ auf Laborbänke sprüht hat man einen gewaltigen Überschuss, da ca. 1 bis 5 ml Lösung auf kleinste Mengen von DNA treffen. Es ist nur darauf zu achten, dass tatsächlich auch alle kritischen Bereiche lückenlos mit DNA-ExitusPlus™ in Kontakt kommen. Bei sehr starken DNA-Kontaminationen ist es daher besser nicht die Inkubationszeit zu verlängern, sondern in einem zweiten Gang DNA-ExitusPlus™ erneut auf die Flächen aufzubringen.

Die effiziente Zerstörung von DNA-Molekülen durch DNA-ExitusPlus™ wurde durch die sensitive PCR-Analytik überprüft. Zu diesem Zweck wurden definierte DNA-Proben an der Oberfläche der Innenwände von Reaktionsgefäßen ange-trocknet. Anschließend wurden diese Oberflächen mit DNA-ExitusPlus™ behandelt und durch eine PCR-Amplifikation mit zur DNA-Probe passenden Primern auf mögliche DNA-Reste untersucht (Abb. 3). Nach Behandlung mit DNA-ExitusPlus™ konnten keine amplifizierbaren DNA-Template mehr nachgewiesen werden.

Bis jetzt sind allein solche nicht standardisierten PCR-Tests das Maß der Dinge für die Kontrolle einer erfolgreichen DNA-Dekontamination. Wenn die Kontroll-



**Abb. 2 Abbau eines PCR-Produktes und der Primer durch DNA-ExitusPlus™.** Zur Überprüfung des Abbaus von kleineren DNA-Fragmenten wurden 500 ng DNA pro Probe eines 750 bp PCR-Produktes und entsprechenden Primern für die angegebenen Zeiten [1, 2, und 5 Minuten] mit DNA-ExitusPlus™ inkubiert. (+) 5 µl DNA mit 5 µl DNA-ExitusPlus™; (C) Kontrolle 5 µl DNA mit 5 µl Wasser; M Molekulargewichtsmarker 1 kb Leiter. Nach der Behandlung wurde die DNA für 2 Minuten bei 95°C denaturiert.



**Abb. 4 Korrosives Potenzial verschiedener kommerziell erhältlicher DNA-Dekontaminationsmittel im Vergleich mit DNA-ExitusPlus™.** Metalle, wie sie üblicherweise für Laborausstattungen oder Geräte verwendet werden, wurden 20 Minuten in den Lösungen inkubiert.

Kontrolle (K) mit sterilem Wasser;

X2, X3 (Wettbewerbsprodukte).

D (DNA-Exitus™); D+ (DNA-ExitusPlus™).

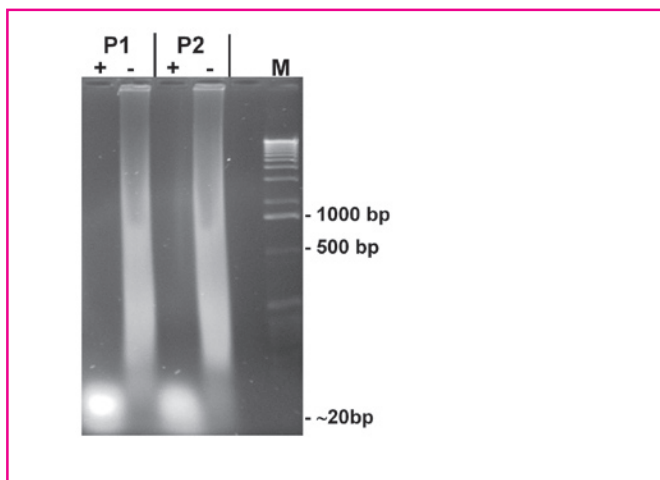
Templates dabei sehr groß gewählt werden, ihre Konzentrationen und Verdünnungen aber sehr klein sind, sowie Waschungen mit sterilem Wasser erfolgen, ist die Aussagekraft der Tests nur schwer zu beurteilen.

### Konventionelle Mittel enthalten Azide, Säuren, Peroxide oder stark alkalische Substanzen

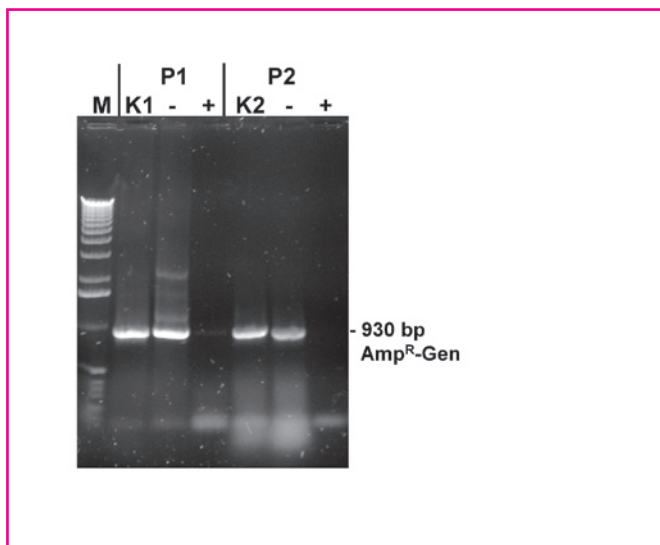
Einen weiteren Nachteil der konventionellen Dekontaminationsmittel offenbart der Test zum korrosiven Potenzial der verschiedenen Lösungen. Dafür wurden Metalloberflächen mit identischen Aliquots der Mittel für 20 Minuten inkubiert. Die ausgewählten Metalle sind repräsentativ für im Labor übliche Geräte oder Ausrüstungen (Abb. 4). Dabei zeigt sich, dass alle bekannten kommerziellen Mittel aggressive chemische Agentien enthalten, die korrosiv wirken und auch gesundheitsschädlich sind. Bekannte Inhaltsstoffe der konventionellen Mittel sind Azide, mineralische Säuren, wie Phosphorsäure oder Salzsäure, aggressive Peroxide oder stark alkalische Substanzen, wie z.B. Natriumhydroxid. Daher beobachtet man schon nach nur 20 Minuten Einwirkungsdauer vielfach starke irreversible Korrosionen auf den verschiedenen Metalloberflächen (Abb. 4). Die neuentwickelte und patentierte Zusammensetzung und Wirkungsweise von DNA-ExitusPlus™ bewährt sich dagegen auch in diesem Test. Auf allen Metalloberflächen ist keine Spur von Korrosion oder Beschädigung zu beobachten. DNA-ExitusPlus™ wurde unter gleichen Bedingungen auch auf einer Vielzahl von Kunststoffoberflächen getestet, ohne dass Korrosionen oder andere Schädigungen auftraten (Daten nicht gezeigt). Damit bietet DNA-ExitusPlus™ eine sehr wirkungsvolle und gleichzeitig materialschonende Alternative zu den konventionellen Mitteln.

### Autoklavieren alleine reicht nicht!

Das anerkannte und für das effektivste Verfahren gehaltene Dekontaminationsverfahren zur Beseitigung von DNA-Kontaminationen ist Autoklavieren. Beim Autoklavieren bleiben hauptsächlich Fragmente von 20 bis 30 Basenpaare erhalten – zumindest ist man davon ausgegangen. Neuere Untersuchungen zeigen aber, dass selbst nach dem Autoklavieren noch einzelne größere DNA-Fragmente 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. Weiterhin erlaubt diese Methode nur die Dekontamination von hitzeresistenten Oberflächen kleinerer Gegenstände, nicht aber von Arbeitsplatten und Werkbänken. Die Reaktionszeit von DNA-



**Abb. 5 Das Autoklavieren von rekombinanten Bakterien führt nur zu einem partiellen DNA-Abbau.** 50 ml Kulturen von rekombinanten *E. coli* Kulturen wurden nach Zugabe gleicher Volumina an Wasser (-) oder Autoclave-ExitusPlus™ (+) bei 120°C und 1,2 Bar für 20 Minuten autoklaviert. Anschließend wurden 10 µl Aliquots dieser Kulturen im analytischen DNA-Agarose-Gel untersucht. Bei Zugabe des gleichen Volumens an sterilem Wasser (-) sind nach dem Autoklavieren noch große Mengen höhermolekularer DNA-Fragmente vorhanden. Eine identische Kultur mit der Zugabe von einem gleichen Volumen an Autoclave-ExitusPlus™ (+) zeigt den Abbau der DNA in Fragmente kleiner als 20 Basenpaare. Es wurden zwei Vergleichsproben aus dem selben Ansatz aufgetragen.



**Abb. 6 PCR-Analyse der autoklavierten *E. coli* Kulturen aus Abb. 5.** Die rekombinanten *E. coli* Kulturen enthielten ein Plasmid mit dem Resistenz-Gen für Ampicillin (Amp<sup>R</sup>-Gen). Daher wurden 2 µl Aliquots der Kulturen nach dem Autoklavieren in PCR-Ansätzen mit Primern für das komplette Amp<sup>R</sup>-Gen getestet. Die Probe aus dem Ansatz mit sterilem Wasser (-) ergibt eine starke PCR-Bande für das komplette Amp<sup>R</sup>-Gen. Die Probe aus dem Ansatz mit Autoclave-ExitusPlus™ (+) dagegen enthält keine intakten DNA-Fragmente für das Amp<sup>R</sup>-Gen. Als positive Kontrolle (K) wurde ein 2 µl Aliquot der Probe aus dem Ansatz mit Autoclave-ExitusPlus™ mit 2 ng Template-DNA für das Amp<sup>R</sup>-Gen versehen. Die Amplifizierung der entsprechenden DNA-Bande in dieser Reaktion zeigt, dass die PCR-Reaktion unter diesen Bedingungen normal ablaufen kann. Es wurden zwei Vergleichsproben aus dem selben Ansatz aufgetragen.



ExitusPlus™ entspricht der Einwirkzeit. Nach 10 bis 20 Minuten ist das aufgesprühte Mittel eingetrocknet. Da DNA-ExitusPlus™ aufgrund seiner chemischen Zusammensetzung nicht hitzesensitiv ist und auch keine flüchtigen, gesundheitsschädlichen Substanzen enthält, wurde eine Pulvermischung auf Basis der DNA-ExitusPlus™ – Inhaltsstoffe hergestellt (Autoclave-ExitusPlus™) und dessen Aktivität auf Bakterienkulturen und deren Nukleinsäuren bei erhöhten Temperaturen getestet (Abb. 5 und 6). Es zeigt sich, dass nur der Zusatz von Autoclave-ExitusPlus™ den Abbau der bakteriellen DNA effizient herbeiführt, während die Vergleichsprobe unter den bis jetzt gängigen Standardbedingungen in Medium oder Wasser – überraschenderweise und eigentlich erschreckend – immer positiv ausfällt. Außerdem hat man erkannt, dass der Autoklav eine der größten Nukleinsäurekontaminationsquellen im Labor ist, da mit den Aerosolen beim Öffnen des Autoklaven auch Nukleinsäurefragmente im Raum verteilt werden!

Im Lichte der vorliegenden neuen Ergebnisse muss man daher einen alleinigen PCR-Test als Nachweis für die vollständige Entfernung von DNA-Molekülen kritisch betrachten. Ein solcher PCR-Test wird auch bei Dekontaminationsmitteln, die nur die DNA modifizieren oder maskieren, zu einem negativen Ergebnis führen, selbst wenn dabei die DNA-Moleküle weder entfernt noch zerstört werden. Die vollständige Bewertung des Dekontaminationspotenzials eines Mittels kann daher nur durch die PCR-Analytik in Kombination mit einem DNA-Degradationstest erfolgen. Genauso kritisch muss man jetzt die gängige Standardmethode des Autoklavierens sehen, da die aktuellen Ergebnisse zeigen, dass DNA-Moleküle aus Viren oder Mikroorganismen dadurch nicht ausreichend inaktiviert werden.

### Zusammenfassung

- I. Durch katalytische und kooperative Effekte der Lösungskomponenten ergibt sich ein sehr schneller nicht-enzymatischer Abbau von DNA- und RNA-Molekülen.
- II. Alle Komponenten der ExitusPlus™-Reagenzien sind biologisch abbaubar und für den Menschen unschädlich und nicht-toxisch.
- III. 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.
- IV. Beim Aufsprühen auf Oberflächen entstehen keine gesundheitsschädlichen Aerosole.
- V. Beim Autoklavieren können keine Nukleinsäure-haltigen Aerosole mehr auftreten, da Nukleinsäuren effektiv zerstört werden.

### 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 transcriptase-polymerase chain reaction. *Avian Pathology* **33**, 3003-306.
- [2] Burns, P.A. *et al.* (1991) Transformation of mouse skin endothelial cells in vivo by direct application of plasmid DNA encoding the human T24 H-ras oncogene. *Oncogene* **6**(11), 1973-1978.



Artikelbezeichnung	Bestell-Nr.	Menge
Autoclave-ExitusPlus™	A7600,0100	1,2 L
	A7600,0250	3 L
	A7600,0500	6 L
	A7600,1000	6 L
DNA-ExitusPlus™	A7089,0100	100 ml
	A7089,0250	250 ml
	A7089,0500	500 ml
	A7089,1000	1 L
	A7089,1000RF*	1 L
	A7089,2500RF*	2,5 L
DNA-ExitusPlus™ IP**	A7409,0100	100 ml
	A7409,0250	250 ml
	A7409,0500	500 ml
	A7409,1000	1 L
RNase-ExitusPlus™	A7153,0100	100 ml
	A7153,0250	250 ml
	A7153,0500	500 ml
	A7153,1000	1 L
	A7153,1000RF*	1 L
	A7153,2500RF*	2,5 L

\* Refill \*\* indikatorfrei



Mehr Infos unter:  
[service@applichem.com](mailto:service@applichem.com)