

AppliCations

👉 No.1

Очистка от загрязнения нуклеиновыми кислотами с помощью технологии ExitusPlus™



Как показывает современная генная инженерия, во многих случаях для инфекции, рекомбинации или биологической трансформации достаточно наличия свободных молекул ДНК [1,2]. Кроме того, методы обнаружения ДНК становятся все чувствительнее. Таким образом, выявление контаминации и предотвращение артефактов амплификации при ПЦР, в частности, в генной инженерии, криминалистике, биомедицинских и гигиенических исследованиях, приобретает все большее значение. Полная очистка оборудования и материалов от остатков ДНК – решающий фактор надежности биологических исследований.

AppliChem

Ключевые слова

Очистка от загрязнения нуклеиновыми кислотами

Тест на расщепление ДНК

Тест ПЦР

Автоклавирование для разрушения ДНК

Все или ничего: поразительный вывод

Основным способом очистки от загрязнения нуклеиновыми кислотами по-прежнему является обработка хлорной известью («отбеливателем») – средством, разрушающим не только нуклеиновые кислоты, но и все остальные соединения. В связи с этим мы начали поиск безвредной альтернативы, а также изучение молекулярных механизмов действия имеющихся на рынке средств очистки от остатков ДНК; исследования проводились в сотрудничестве с компанией multiBIND Biotech (МультиБИНД Биотех), Кёльн. Мы сравнивали свойства традиционных средств для деконтаминации, применяя их в условиях очень сильного загрязнения определенным количеством ДНК (взятой с большим избытком). При этом стали очевидными две проблемы: во-первых, традиционные средства оказались неспособны эффективно разрушать молекулы ДНК, а во-вторых, они содержали очень едкие или ядовитые компоненты. Таким образом, назрела необходимость в разработке эффективного средства очистки от ДНК. Итак, мы представляем именно такие средства: наборы DNA-ExitusPlus™ и Autoclave-ExitusPlus™. В отличие от традиционных средств, они быстро и эффективно разрушают ДНК и РНК, не обладая при этом агрессивными свойствами и не принося вреда здоровью.

Различают три основных молекулярных механизма разрушения или инактивации генетического материала при деконтаминации от ДНК: модификацию, денатурацию и деградацию. В зависимости от состава средства эти три механизма могут действовать по отдельности или в сочетании.

Исходя из современных знаний о потенциальной биологической опасности свободных молекул ДНК, самым надежным методом деконтаминации является расщепление этих молекул на как можно более мелкие фрагменты; поэтому мы сравнивали эффективность расщепления ДНК традиционными средствами и с помощью разработанного нами нового продукта - DNA-ExitusPlus™. Набор для анализа разрушения ДНК позволяет провести чувствительное количественное сравнение скорости расщепления (рис. 1 и 2).

Результаты оказались неожиданными: выяснилось, что некоторые из известных производимых промышленностью средств вызывают лишь модификацию или денатурацию молекул ДНК. Цепи ДНК при этом не разрушаются, и кодируемая ими генетическая информация сохраняется в «замаскированном»

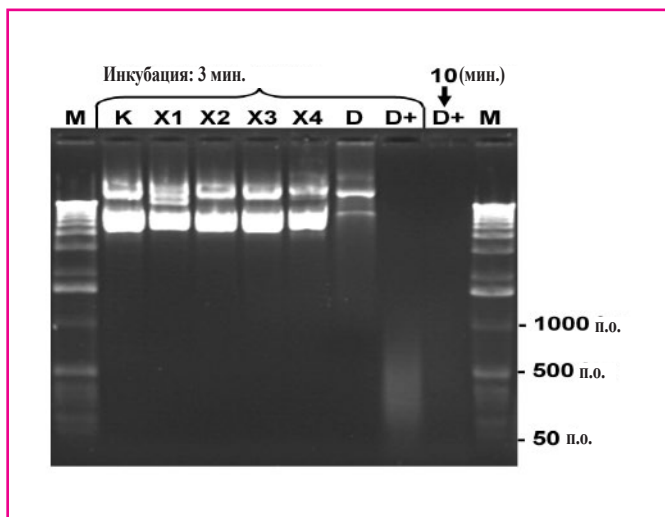


Рис. 1 Исследование эффективности деградации ДНК традиционными средствами для деконтаминации и DNA-ExitusPlus™. В каждом случае 200 нг кольцевой плазмидной ДНК растворяли в 10 мкл воды, добавляли 5 мкл указанных растворов и выдерживали при комнатной температуре 3 – 10 минут. Затем к образцам добавляли забуференный раствор бромфенолового синего и денатурировали 3 минуты при 92°C. После этого денатурированные пробы немедленно охлаждали до 4°C и вносили в гель в полном объеме. После электрофореза в 1% агарозном геле ДНК окрашивали бромидом этидия и фотографировали. В контрольной пробе (К), к которой добавляли 5 мкл стерильной воды, видна неизменная кольцевая плазмидная ДНК (7 kb; 200 нг, 10 мкл). При разрывах цепей образуются фрагменты с меньшей молекулярной массой. Их можно определить с помощью контрольных фрагментов и маркеров молекулярной массы в геле (М; градация 1 kb). Продукты X1-X4 при данных условиях почти не разрушают тестовую ДНК. В пробе D (обычный раствор DNA-ExitusPlus™) при данных условиях наблюдается лишь частичная деградация. Лишь раствор DNA-ExitusPlus™ (D+) уже через 3 минуты вызывает очень быструю и почти полную деградацию ДНК, поэтому в геле видна только небольшая остаточная фракция фрагментов длиной менее 500 пар оснований. Через 10 минут при данных условиях испытания ДНК уже не обнаруживается.

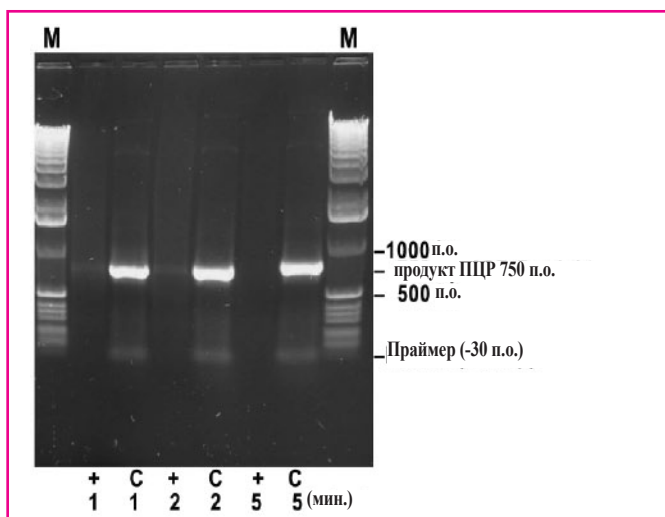


Рис. 2. Разрушение продуктов ПЦР и праймера под действием раствора DNA-ExitusPlus™. Для доказательства расщепления мелких фрагментов ДНК пробы, содержащие 500 нг ДНК, состоящей из продуктов ПЦР длиной 750 п.о. и соответствующих праймеров, инкубировали с раствором DNA-ExitusPlus™ в течение 1, 2 и 5 минут. (+) 5 мкл раствора ДНК + 5 мкл DNA-ExitusPlus™; (C) контроль: 5 мкл раствора ДНК + 5 мкл воды; (M) маркер молекулярной массы, градация 1 kb. После обработки ДНК денатурировали 2 минуты при 95°C

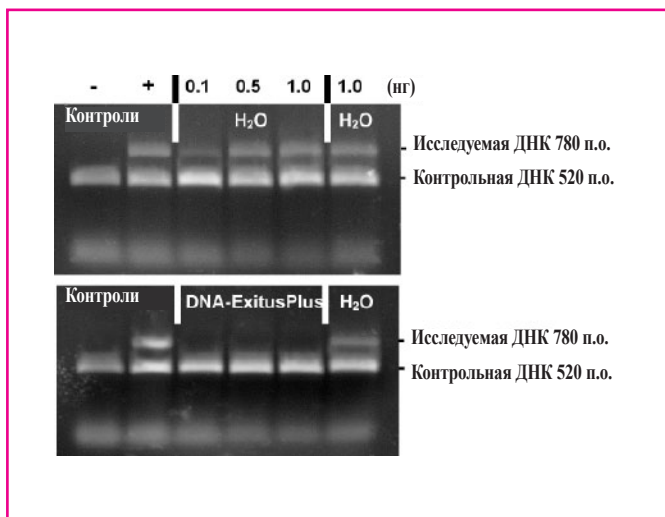


Рис. 3 ПЦР-анализ для доказательства полной очистки от ДНК после обработки DNA-ExitusPlus™. ДНК (0,1 – 1 нг) наносили на внутренние поверхности пробирок для ПЦР и высушивали, а затем обрабатывали стерильной водой или раствором DNA-ExitusPlus™ в течение 20 секунд. Контрольная ДНК содержится во всех пробах (продукт ПЦР 520 п.о.); исследуемая ДНК (продукт ПЦР 780 п.о.); отрицательный контроль = H2O.

виде. При снятии «маскировки» посредством удаления блокирующих групп химической обработкой молекулы ДНК генетическая информация может снова стать доступной для считывания, а молекула – для амплификации. Учитывая уровень современных знаний в области генной инженерии, а также проблему рекомбинирования носителей генной информации, такие средства следует рассматривать как несоответствующие современным требованиям. Однако даже средства, достоверно разрушающие цепи ДНК, в лучшем случае разрушают их лишь частично. При этом обычно сохраняются довольно крупные фрагменты ДНК (рис. 1), которые все еще могут содержать полную генетическую информацию, или, по меньшей мере, ее важные части.

DNA-ExitusPlus™ расщепляет цепь ДНК независимо от ее последовательности

Активность раствора DNA-ExitusPlus™ не зависит от размера фрагментов ДНК и обусловлена химическими, а не ферментативными реакциями. Крупные плазмиды требуют более длительной инкубации, чем мелкие фрагменты (например, праймеры). В качестве разъяснения: допустим, под действием раствора в цепи ДНК образуется 100 000 разрывов в минуту, таким образом, очевидно, что все фрагменты ДНК будут расщеплены независимо от длины цепи. При этом мелкие фрагменты будут просто расщеплены полностью быстрее, чем крупные. Поэтому при очень высокой концентрации тестовой молекулы кольцевой ДНК длиной 6 kb с ковалентно соединенными концами через 5 минут в смеси все еще будет определяться фракция мелких фрагментов длиной 200 – 500 п.о., в то время как праймеры (длиной около 30 нуклеотидов) за это время расщепляются полностью (рис. 2). Характер разрывов цепи полностью соответствует случайному распределению, таким образом, образуется разнородный набор фрагментов (без определенных распознаваемых последовательностей, как при ферментативном расщеплении!). Поэтому ПЦР такой смеси невозможна, даже при наличии более крупных фрагментов ДНК. При распылении на лабораторный стол раствора DNA-ExitusPlus™ следует брать его в достаточном избытке, так как для разрушения самых малых остаточных количеств ДНК требуется примерно 1-5 мл. При этом необходимо следить за тем, чтобы раствор DNA-ExitusPlus™ покрывал все критические поверхности без промежутков. При очень сильной контаминации ДНК вместо

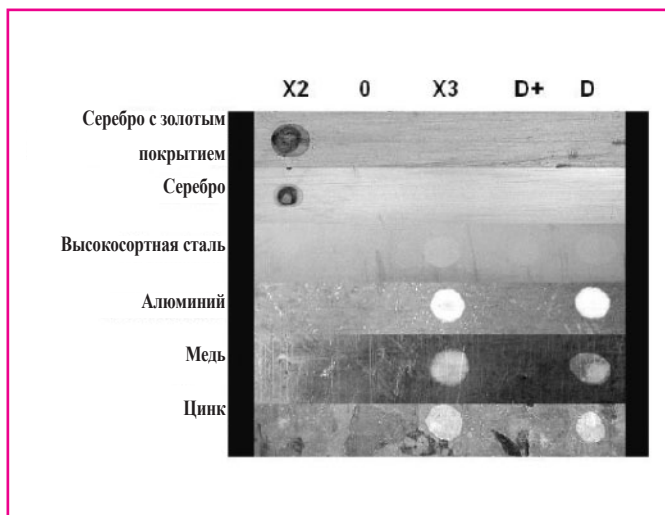


Рис. 4. Сравнение коррозионных свойств различных имеющихся в продаже средств для деконтаминации и раствора DNA-ExitusPlus™. Металлы, обычно используемые для производства лабораторного оборудования или приборов, инкубировали с испытуемыми растворами 20 минут. Контроль (К) со стерильной водой; X2, X3 (конкурирующая продукция). D (DNA-Exitus™); D+ (DNA-ExitusPlus™).

продления времени инкубации лучше повторить обработку поверхностей раствором DNA-ExitusPlus™.

Эффективность расщепления молекул ДНК под действием раствора DNA-ExitusPlus™ была доказана чувствительным ПЦР-анализом. Для этой цели на внутренние поверхности реакционных сосудов наносили определенные ДНК-зонды и высушивали их. Затем эти поверхности обрабатывали раствором DNA-ExitusPlus™ и проводили амплификацию с соответствующими этим зондам праймерами, чтобы обнаружить возможные остатки молекул ДНК (рис. 3). После обработки DNA-ExitusPlus™ фрагменты ДНК, доступные для амплификации, полностью отсутствовали.

До настоящего времени для контроля эффективности деконтаминации от ДНК применяются только такие нестандартизированные тест-системы на основе ПЦР. Если при этом используются очень длинные контрольные матричные фрагменты, а их концентрации очень низкие или разведения очень большие, а также осуществляется промывка стерильной водой, судить об информативности метода сложно.

Традиционные средства содержат азиды, кислоты, пероксиды или сильные щелочи

Испытание традиционных средств для очистки от нуклеиновых кислот на способность к коррозии выявило у них еще один недостаток. В ходе этого испытания металлические пластины в течение 20 минут инкубировали с одинаковыми аликвотами средств. При этом выбирались металлы, часто используемые для производства лабораторных приборов и оборудования (рис. 4). Испытание показало, что все известные имеющиеся в продаже средства содержат агрессивные химические вещества, вызывающие коррозию, а также вредно влияющие на здоровье. Краспространенным компонентом традиционных средств деконтаминации относятся азиды, неорганические кислоты, например, ортофосфорная и хлористоводородная, агрессивные пероксиды или сильные щелочи, например, гидроксид натрия. Сильная необратимая коррозия различных металлических поверхностей наблюдалась уже через 20 минут воздействия этих веществ (рис. 4). В противоположность этому недавно разработанный и запатентованный раствор DNA-ExitusPlus™ с новым составом и принципом действия показал себя в этом испытании очень хорошо. Ни на одной из металлических поверхностей не было обнаружено следов коррозии

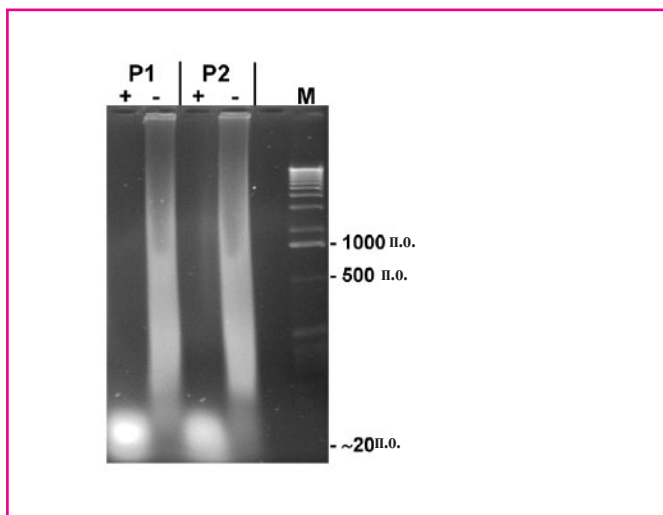


Рис. 5. Автоклавирование клеток рекомбинантных бактерий вызывает лишь частичное разрушение ДНК. 50 мл культуры рекомбинантной *E. coli* автоклавировали с равным объемом воды (-) или средства Autoclave-ExitusPlus™ (+) при 120°C и 1,2 бар в течение 20 минут. Затем аликвоты этих культур по 10 мл анализировали методом электрофореза в агарозном геле. В пробах с добавлением стерильной воды (-) после автоклавирования все еще присутствует значительное количество высокомолекулярных фрагментов ДНК. В таких же культурах с добавлением Autoclave-ExitusPlus™ (+) ДНК разрушилась на фрагменты длиной менее 20 пар оснований. Пробы для сравнения брали из одного источника.

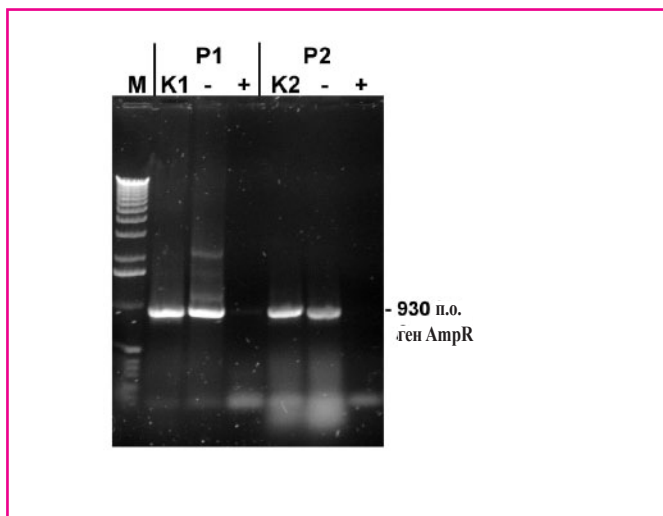


Рис. 6. ПЦР-анализ образцов культур *E. coli* после автоклавирования, показанных на рис. 5. Рекомбинантные культуры *E. coli* содержат плазмиду, несущую ген устойчивости к ампицилину (ген AmpR). Для исследования брали аликвоты культуры после автоклавирования объемом 2 мкл и проводили ПЦР с праймерами, прошедшими проверку с полным геном AmpR. В продукте ПЦР пробы с добавлением стерильной воды (-) видны четкие полосы полного гена AmpR. В продукте ПЦР пробы с добавлением Autoclave-ExitusPlus™ (+) неразрушенные фрагменты гена AmpR отсутствуют. В качестве положительного контроля (К) использовались аликвоты пробы с добавлением Autoclave-ExitusPlus™, содержащие 2 нг ДНК-матрицы гена AmpR объемом 2 мкл. Амплификация ДНК в этой реакционной смеси, дающая соответствующие полосы, свидетельствует о возможности нормального протекания реакции ПЦР в данных условиях. Две пробы для сравнения брали из одного источника.

или повреждения. При тех же условиях раствор также испытывали на разнообразных поверхностях из синтетических материалов, при этом признаков коррозии или других повреждений обнаружено не было (данные не показаны). Таким образом, раствор DNA-Exitus-Plus™ является очень эффективной и, одновременно, щадящей по отношению к материалам альтернативой традиционным средствам.

Одного автоклавирования недостаточно!

Автоклавирование считается общепризнанным способом эффективной деконтаминации от остаточной ДНК. После него остаются в основном фрагменты длиной 20 – 30 пар оснований – по крайней мере, так считается. Однако новые исследования показали, что после автоклавирования могут оставаться единичные более крупные фрагменты ДНК, пригодные для амплификации с помощью ПЦР [1]. В особенности, это происходит в случаях, когда нуклеиновые кислоты окружены белковой оболочкой (например, у вирусов) или находятся внутри микроорганизмов (например, бактерий). Кроме того, этот метод подходит только для деконтаминации термостойких поверхностей и мелких предметов, но не применим для обработки рабочих мест и лабораторных столов. Время реакции с раствором DNA-ExitusPlus™ соответствует времени его воздействия. Через 10–20 минут нанесенный раствор высыхает. Поскольку раствор DNA-ExitusPlus™ нечувствителен к высокой температуре благодаря своему химическому составу, а также не содержит летучих вредных веществ, на его основе было произведено порошковое средство Autoclave-ExitusPlus™, эффективность которого в отношении бактерий и их нуклеиновых кислот была испытана при высокой температуре (рис. 5 и 6). Испытание показало, что только добавка средства Autoclave-ExitusPlus™ обеспечивает эффективное разрушение бактериальной ДНК, в то время как после автоклавирования в стандартных условиях – в питательной среде или воде – результат определения нуклеиновых кислот всегда был положительным, что оказалось неожиданным и, в сущности, ужасным. Кроме того, обнаружилось, что автоклав является одним из главных источников контаминации лаборатории нуклеиновыми кислотами, поскольку при открывании крышки аэрозоль, содержащий фрагменты нуклеиновых кислот, распространяется по всему помещению!

В свете описанных выше новых результатов следует критически относиться к использованию для контроля эффективности очистки от ДНК одного только анализа ПЦР. После обработки средствами, модифицирующими или маскирующими молекулы ДНК без разрушения цепи, такой ПЦР-тест покажет отрицательный результат, хотя молекулы ДНК при этом не удалены и не разрушены. Поэтому достоверная оценка эффективности деконтаминации каким-либо средством возможна только с помощью ПЦР в сочетании с тест-системой для оценки деградации ДНК. То же самое относится к распространенным стандартным методам автоклавирования, поскольку, как показала недавняя оценка эффективности, инактивация молекул ДНК в составе вирусов или микроорганизмов при этом недостаточна.

Резюме

- I. Каталитическое и взаимодополняющее действие компонентов раствора приводит к очень быстрому неферментативному расщеплению молекул ДНК и РНК.
- II. Все компоненты раствора ExitusPlus™ биологически разложимы, не вредны для здоровья людей и не токсичны.
- III. В составе раствора нет едких неорганических кислот или щелочей, поэтому даже длительная обработка не вызывает повреждения, коррозии или разрушения материалов и оборудования.
- IV. При распылении на поверхности не образуется вредных для здоровья аэрозолей.
- V. После автоклавирования не образуется аэрозолей, содержащих нуклеиновые кислоты, так как последние эффективно разрушаются.

Литература

- [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.

Наименование	№ для заказа	Количество
Autoclave-ExitusPlus™	A7600,0100	1,2 л
	A7600,0250	3 л
	A7600,0500	6 л
	A7600,1000	6 л
DNA-ExitusPlus™	A7089,0100	100 мл
	A7089,0250	250 мл
	A7089,0500	500 мл
	A7089,1000	1 л
	A7089,1000RF*	1 л
	A7089,2500RF*	2,5 л
DNA-ExitusPlus™ IF**	A7409,0100	100 мл
	A7409,0250	250 мл
	A7409,0500	500 мл
	A7409,1000	1 л
RNase-ExitusPlus™	A7153,0100	100 мл
	A7153,0250	250 мл
	A7153,0500	500 мл
	A7153,1000	1 л
	A7153,1000RF*	1 л
	A7153,2500RF*	2,5 л

* Возможно повторное заполнение

** Не содержит индикаторов



Более подробная информация:
service@applichem.com

