



RNase AWAY™

A998

Zur effektiven Beseitigung von RNasen und DNA-Kontaminationen von Oberflächen und Geräten

I. Einleitung

Gentechnische Experimente zeigen eine hohe Anfälligkeit für RNase- bzw. DNA-Kontaminationen, die in der Regel zu falsch positiven bzw. falsch negativen Signalen führen. Es empfiehlt sich eine sorgfältige Reinigung von allen verwendeten Gefäßen oder auch den Flächen, auf denen gearbeitet wird, durch Verfahren, die eine RNase-Kontamination minimieren.

Um kontaminationsfreie Oberflächen zu gewährleisten, ist ein ausgedehntes Backen von Glaswaren bei 280°C über mehrere Stunden erforderlich. Ebenfalls wirksam bei der Entfernung von RNasen sind Diethylpyrocarbonat-(DEPC)-Behandlungen, die allerdings auch über Nacht durchzuführen sind. Weiterhin steht DEPC im Verdacht, krebserregend zu sein. Es darf nur mit Handschuhen und unter zugelassenen Absauganlagen benutzt werden.

Obwohl diese Verfahren RNase-Kontaminationen erfolgreich beseitigen, benötigen Sie viel Zeit und äußerste Vorsicht. Eine gute Alternative für die Verfahren bietet die Anwendung von RNase AWAY™ auf die Oberfläche oder das Laborgeschirr, das mit RNase kontaminiert sein könnte. Weiter unten finden Sie beispielhafte Testergebnisse einer Anwendung von RNase AWAY™ auf Böden von Glasbechern, die zuvor mit RNAsen beschichtet worden waren. Weiterhin zeigt die Untersuchung die RNase AWAY™-Reinigung von unerwünschter DNA (hier eine lineare DNA-Leiter), die in Reaktionsgefäßen eingedampft wurde. Die Ergebnisse zeigen, dass RNase AWAY™-Rückstände keine denaturierende Auswirkung auf die erwünschte Test-DNA haben.

II. Anwendung

II.I. Wischreinigung

RNase AWAY™ unverdünnt auf die Fläche auftragen und 1 Minute einwirken lassen. Mit sauberen Papiertüchern abwischen und trockenreiben.

Alternativ können Oberflächen sorgfältig mit RNase AWAY™ Wischtüchern gereinigt und trockengerieben werden.

II.II. Inkubation

Die zu reinigenden Gegenstände in RNase AWAY™ (unverdünnt) einlegen und über Nacht inkubieren. Mit destilliertem, RNase-freiem Wasser nachspülen und trocknen lassen.

III. Ausgeführter Test

Test zur Fähigkeit von RNase AWAY™, RNase von Oberflächen zu entfernen und zur Wirksamkeit von RNase AWAY™ bei der DNA-Beseitigung.

IV. Befund

Richtig angewandt, beseitigt RNase AWAY™ effektiv RNase-Kontaminationen von Glasoberflächen und entfernt DNA-Kontaminationen. Es wurde kein Abbau erwünschter DNA durch RNase AWAY™-Rückstände nach einer Oberflächenreinigung nachgewiesen. RNase AWAY™ sollte nicht verdünnt angewandt werden.

V. Testverfahren

Um die Fähigkeit zu prüfen, RNase von Glasoberflächen zu beseitigen, wurden die Böden von Glasbechern mit RNase kontaminiert und anschließend mit RNase AWAY™ gewaschen. Nach der RNase AWAY™ Behandlung wurden die Flächen als Test mit RNA überschichtet und zusammen mit mono- und bivalenten Kationen inkubiert, um einen Abbau der Nukleinsäure durch eventuell vorhandene RNAsen zu ermöglichen. Nach der Inkubation wurde die RNA durch Elektrophorese in einem Agarosegel analysiert. Geeignete Kontrollen wurden durchgeführt um auf falsch-positive und -negative Ergebnisse zu prüfen.

Um die Fähigkeit zu prüfen DNA-Kontaminationen zu beseitigen, wurden kleine DNA-Aliquots in Reaktionsgefäße eingebracht und über Nacht eingedampft. Die DNA schlug sich dabei an den Wänden des Reaktionsgefäßes ab. Am nächsten Tag füllte man die Reaktionsgefäße mit RNase AWAY™. Die Lösung wurde wieder entnommen und Wasser in die Reaktionsgefäße gegeben, um zurückgebliebene DNA zurückzugewinnen. Eine Reihe RNase AWAY™-Verdünnungen wurden verwendet, um die Schädigung von DNA in Lösung zu untersuchen. Untersucht werden sollte hierdurch eine mögliche Nachwirkung auf erwünschte DNA, die mit einer mit RNase AWAY™ behandelten Oberfläche in Berührung kommt.

VI. Methoden

VI.I. Vollständige Beseitigung von RNase Kontaminationen mit RNase AWAY™

Alle Vorrichtungen wurden mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt, um mögliche RNase-Kontaminationen von Quellen außerhalb des Experiments zu hemmen. Die Böden von 5 kleinen Bechergläsern wurden durch intensives Befingern ohne Handschuhe mit RNase kontaminiert. Zwei der Bechergläser wurden mit RNase AWAY™ versetzt und über Nacht inkubiert. Eines wurde am nächsten Tag einfach von der Lösung befreit, wobei ein RNase AWAY™ Film zurückblieb (a), das zweite wurde mit destilliertem, RNase-freiem Wasser gespült (b). Zwei weitere Bechergläser wurden mit RNase AWAY™ beschichtet und mit Papiertüchern sauber gewischt (c), eines davon wurde zusätzlich mit destilliertem Wasser gespült (d). Das verbleibende Becherglas stellte die positive Kontrolle für „Hand“-RNase Aktivität dar (f). Als Testsystem wurde 1 Mikrogramm eines RNA-Standards bestehend aus 7,5 kb poly(A) RNA in einer Pufferlösung mit sowohl Natrium- als auch Magnesiumionen auf die Böden der 5 Bechergläser gebracht, für eine Minute inkubiert und in Reaktionsgefäße überführt. Ein intakter RNA-Standard in einem sauberen Reaktionsgefäß diente als negative Kontrolle (e). Alle Proben wurden bei 37°C eine Stunde lang inkubiert. Anschließend wurden sie in einem 1,2 %igen Agarosegel mit Ethidiumbromid in 0,5xTAE elektrophoretisch aufgetrennt (20 Minuten bei 80 Volt). Das Gel wurde fotografiert und die Proben auf RNA-Abbau analysiert.

VI.II. Völliger Abbau von DNA-Kontaminationen mit RNase AWAY™:

In 3 Reaktionsgefäße wurde jeweils ein Mikroliter (1 µg) einer linearen 1 kb DNA-Leiter (1 mg/ml) eingebracht. Die DNA konnte sich über Nacht durch Verdunsten an der Wand abgeschlagen. Am nächsten Tag wurden 100 Mikroliter RNase AWAY™ in die ersten zwei Gefäße pipettiert (a,b) und für 5 Minuten inkubiert. Die Lösung wurde entfernt und die Gefäße für 1 Minute zentrifugiert. Die Restlösung wurde mit einer Pipettenspitze entnommen. Eines der beiden Gefäße wurde noch einmal mit destilliertem Wasser gespült, geleert, zentrifugiert und das Restvolumen mit einer Pipettenspitze entnommen (b). Zehn Mikroliter destilliertes Wasser wurden in die geleerten Gefäße pipettiert, um mögliche Rest-DNA zurückzugewinnen (a,b). In das dritte Reaktionsgefäß wurden zehn Mikroliter RNase AWAY™ gegeben und durch auf- und abpipettieren mit der DNA gemischt (c). Ein Mikroliter derselben 1 kb Leiter-DNA wurde in zwei neue Reaktionsgefäße eingebracht (d,e). Einem Gefäß wurden zusätzlich neun Mikroliter RNase AWAY™ hinzugefügt (d) und dem anderen Gefäß neun Mikroliter destilliertes Wasser (e, Kontrolle). Anschließend wurden alle Proben elektrophoretisch aufgetrennt in einem 1,2 %igen Agarosegel mit Ethidiumbromid in 0,5xTAE (20 Minuten bei 80 Volt). Die Proben wurden fotografiert und analysiert.

Carl Roth GmbH + Co. KG

Schoemperlenstraße 3-5 • 76185 Karlsruhe
Postfach 100121 • 76231 Karlsruhe
Telefon: +49 (0) 721/ 5606-0
Fax: +49 (0) 721/ 5606-149
info@carlroth.de • www.carlroth.de

ip 07/2021

Die Firma ist eine Kommanditgesellschaft mit Sitz in Karlsruhe, Reg. Gericht Mannheim HRA 100055. Persönlich haftende Gesellschafterin ist die Roth Chemie GmbH mit Sitz in Karlsruhe, Reg. Gericht Mannheim HRB 100428.
Geschäftsführer: André Houdelet

VI.III. Die Auswirkungen von RNase AWAY™-Rückständen auf DNA in Lösung:

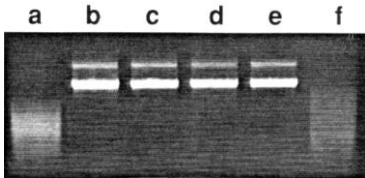
Es wurden eine Reihe RNase AWAY™-Verdünnungen von 100 %, 50 %, 25 %, 10 % und 1 % vorbereitet. Aus jeder Verdünnung wurden fünf Mikroliter mit fünf Mikroliter Wasser mit einem Mikrogramm einer linearen 1 kb DNA-Leiter gemischt und bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert. Dies ergab eine Endverdünnung von 50 %, 25 %, 12,5 %, 5 % und 0,5 % RNase AWAY™ (a-e). Zusätzlich wurden zwei Gefäße mit fünfhundert Mikroliter RNase AWAY™ versetzt und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (f,g). Die Lösung wurde anschließend entfernt, die Gefäße für eine Minute zentrifugiert und die Restlösung mit einer Pipettenspitze entnommen. Ein Gefäß wurde einmal mit destilliertem Wasser gespült (f), das zweite zweimal (g). Ein Mikrogramm linearer 1 kb DNA-Leiter in zehn Mikroliter destilliertem Wasser wurde zu jedem Gefäß hinzugefügt. Eine identisches Aliquot der DNA wurde zur Kontrolle in ein unbehandeltes Gefäß eingesetzt (h). Anschließend wurden alle Proben elektrophoretisch aufgetrennt in einem 1,2 %igen Agarosegel mit Ethidiumbromid in 0,5xTAE (20 Minuten bei 80 Volt). Die Proben wurden fotografiert und analysiert.

VII. Ergebnisse

VII.I. Beseitigung von RNase mit RNase AWAY

Abb.1: Ein 1,2 %iges Agarosegel mit denaturierten oder nichtdenaturierten RNA-Proben.

a-d: 1 µg 7,5 kb poly(A)-tailed RNA wurde wie folgt inkubiert:



(a) auf einer RNase-kontaminierten / mit RNase AWAY™ gereinigten Glasoberfläche (über Nacht in RNase AWAY™ eingeweicht / nicht gespült)

(b) auf einer RNase-kontaminierten / mit RNase AWAY™ gereinigten Glasoberfläche (über Nacht in RNase AWAY™ eingeweicht / mit destilliertem Wasser gespült)

(c) auf einer RNase-kontaminierten / mit RNase AWAY™ gereinigten Glasoberfläche (mit RNase AWAY™ abgewischt)

(d) auf einer RNase-kontaminierten / mit RNase AWAY™ gereinigten Glasoberfläche (mit RNase AWAY™ abgewischt / mit destilliertem Wasser gespült)

e-f: Standards:

(e) RNA-Standard zur negativen Kontrolle

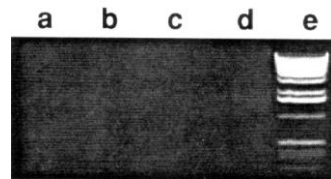
(f) auf einer RNase-kontaminierten gereinigten Glasoberfläche (positive Kontrolle)

Die Inkubation von RNA mit RNase AWAY™ ohne Spülung zeigt einen Abbau der Nukleinsäure auf Grund der Chemikalie (a). Nach Spülgängen mit destilliertem, RNase freiem Wasser sind Reste des RNase AWAY™ sowie alle RNasen verschwunden, die RNA bleibt intakt (b). Bereits das Abwischen der Glasfläche mit RNase AWAY™ entfernt bzw. inhibiert alle RNasen (c,d).

VII.II. Beseitigung von DNA-Kontaminationen mit RNase AWAY™

Abb.2: Ein 1,2 %iges Agarosegel mit abgebauter bzw. nicht-abgebauter DNA

(a) DNA-Niederschlag inkubiert in RNase AWAY™ / DNA in Wasser



eluiert

(b) DNA-Niederschlag inkubiert in RNase AWAY™ / gespült mit destilliertem Wasser / DNA in Wasser eluiert

(c) DNA-Niederschlag inkubiert in RNase AWAY™ / direkt aufgetragen

(d) 1 µl DNA in Lösung + 9 µl RNase AWAY™

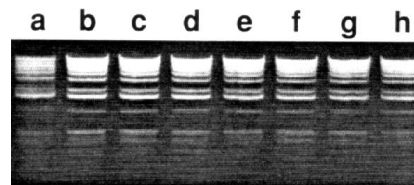
(e) 1 µl DNA in Lösung + 9 µl destilliertes Wasser (Kontrolle)

Alle Röhren, die mit RNase AWAY™ in Kontakt kamen (a-e), zeigen einen vollständigen Abbau der DNA.

VII.III. Auswirkungen von RNase AWAY™-Rückständen auf DNA in Lösung

Abb.3: Ein 1,2 %iges Agarosegel mit Proben mit abgebauter bzw. nicht abgebauter DNA.

(a) 1 µg DNA in 50 %igem RNase AWAY™



(b) 1 µg DNA in 25 %igem RNase AWAY™

(c) 1 µg DNA in 12,5 %igem RNase AWAY™

(d) 1 µg DNA in 5 %igem RNase AWAY™

(e) 1 µg DNA in 0,5 %igem RNase AWAY™

(f) 1 µg DNA in 10 µl destilliertem Wasser versetzt / inkubiert in einem Reaktionsgefäß mit RNase AWAY™ gewaschen und 1x ausgespült

(g) 1 µg DNA in 10 µl destilliertem Wasser versetzt / inkubiert in einem Reaktionsgefäß mit RNase AWAY™ gewaschen und 2x ausgespült
(h) 1 µg DNA in 10 µl Wasser (Kontrolle)

Nur in 50%iger Verdünnung zeigt RNase AWAY™ eine schwache denaturierende Wirkung auf DNA in Lösung (a). Alle weiteren Verdünnungen sind unschädlich für DNA in Lösung (b-e). Auch leichte Restspuren von RNase AWAY™, die sich auf gereinigten Oberflächen finden können, haben keine Wirkung auf gelöste DNA (f,g).

VIII. Schlußfolgerungen

- Das Einweichen mit RNase AWAY™ über Nacht mit anschließendem Spülgang beseitigt RNase-Kontaminationen vollständig.
- Das Abwischen mit RNase AWAY™ beseitigt ebenfalls RNase-Kontaminationen von Glasoberflächen vollständig. Nachspülen mit RNase freiem Wasser ist nicht notwendig, die Restspuren des RNase AWAY™ sind nicht schädlich für die zu untersuchende DNA.
- RNase AWAY™ ist bei voller Stärke wirksam bei der Beseitigung von DNA.
- RNase AWAY™ Spuren sind nicht schädlich für „erwünschte“ DNA, die in Berührung mit einem laut Etikettenanweisungen gewaschenen Gerät kommt.

Nach: Mark Brolaski and Vince Moroney; San Diego, California, USA

IX. Referenz

Fritsch E.F T. Maniatis, J. Sambrook. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

RNase AWAY ist ein Warenzeichen der MBP. © MOLECULAR BIO-PRODUCTS, inc. 1994

⚠ Achtung H315-H319
P280-P302+P352-P305+P351+P338

RNase AWAY™	250 ml	A998.1
	1 l	A998.2
	4 l	A998.3
	Sprühlösung (475 ml)	A998.4