D 30 121 E

GIT LABOR-FACHZEITSCHRIFT

1

47. Jahrgang
Januar 2003

Belegexemplar für
Anzeige
Seite 53
Kenn-Nr. 525

Schwerpunkt
Chromatographie

Sicherheit

LIMS

Umweltanalytik

Liquid Handling

Sonderteil
Imaging

DIONEX

GIT VERLAG
A Wiley Company

Inaktivierung luftgetragener DNA-Aerosole mit Hilfe einer UVC-Arbeitskabine

Luftgetragene DNA-Moleküle können bei bestimmten PCR-Anwendungen zu falsch positiven Ergebnissen führen. Insbesondere in PCR-Laboratorien, in denen routinemäßig mit den gleichen diagnostischen Systemen gearbeitet wird, kann es über kurz oder lang zu einer Anreicherung der nachzuweisenden Target-Moleküle kommen. DNA-Partikel können durch die Adsorption an Oberflächen oder durch die Verbreitung der Partikel über die Luft Geräte, Reagenzien, Proben, Kontrollen, Wasser usw. kontaminieren.

Durch den Einsatz starker UVC-Strahler (253,7 nm) entstehen in der DNA typische Photoprodukte wie Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere und 6-4-Photoprodukte [1]. Diese Photoprodukte führen zu einer Blockierung der Polymerisations-Enzyme [2], wie z.B. bei der in der PCR-Technik häufig eingesetzten Taq-Polymerase [3].

Luftgetragene DNA-Moleküle sollten also durch UVC-Bestrahlung inaktiviert werden, wenn in dem zu amplifizierenden DNA-Bereich benachbarte Pyrimidine zu finden sind. Damit ergibt sich eine einfache Möglichkeit, luftgetragene Kontaminationen zu vermeiden, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in der routinemäßigen Diagnostik zu verbessern.

Die technische Umsetzung einer PCR-Kabine erfolgte durch Integration eines 55 Watt UVC-Strahlers in den oberen Teil einer mit poliertem Edelstahl ausgekleideten Arbeitskabine (Abb. 1). Der Strahler befindet sich in einer Brennerkammer, in die die Kabinenluft mittels Ventilator eingeführt wird. Durch die Einkapselung des UVC-Strahlers wird das Problem der „offenen UV-Strahlung" umgangen. Die Strahlendosis wird dahingehend optimiert, dass der Luftstrom in geringem Abstand an dem UV-Brenner vorbeigeführt wird. Die dekontaminierte Luft wird anschließend über ein Düsensystem in den Arbeitsraum zurückgeführt, so dass das System als Umluftsystem arbeitet und hierdurch eine additive Wirkung erzielt wird. Die verwendeten UVC-Strahler sind aufgrund der Ausführung mit einem Spezialglas nicht ozoninduzierend.

Arbeitsfläche: B = 920 mm, T = 520 mm, H = 540 mm

Neben der geschlossenen Brennerkammer zur Dekontamination von luftgetragenen DNA-Aerosolen ist zusätzlich ein separat zuschaltbarer 55-Watt Radiator im Arbeitsraum integriert, der bei geschlossener Frontscheibe die Desinfektion der Kabinenoberfläche und eingebrachter Materialien erlaubt.

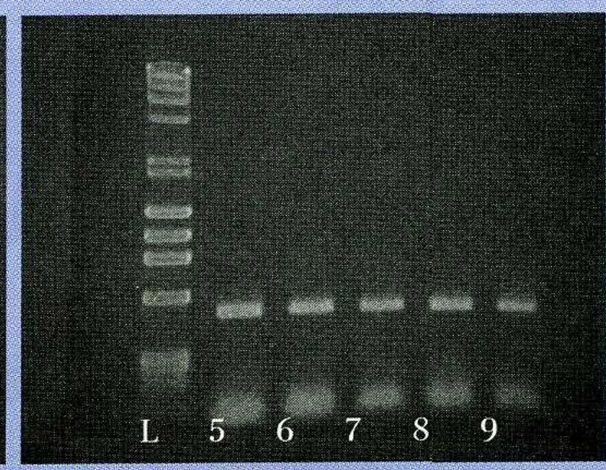
Material und Methoden

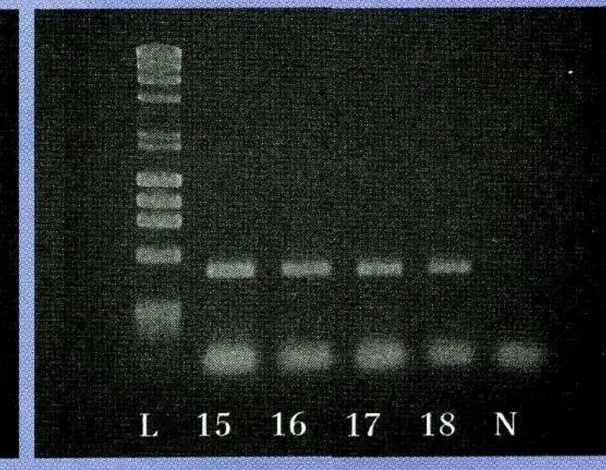
Der Wirkungsnachweis erfolgte mit einem 500 bp großem Fragment der DNA des Bakteriophagen Lambda. 1,05 ml des aufgereinigten Fragments mit einer Konzentration von 0,894 µg/ml wurde bei geschlossener Frontscheibe in der Kabine vernebelt. Für die Vernebelung wurden ein Pari Lc Plus Turbo Vernebler und ein Pari Boy Kompressor eingesetzt. Die Isolation der DNA-Aerosole erfolgte durch die Adsorption der Aerosole in H_2O (10 µl) gefüllten Wells einer gekühlten Mikrotiterplatte. Diese Mikrotiterplatte blieb nach der Vernebelung 60 min. vor Kontaminationen geschützt. Dann wurde sie für 30 min. dem Luftstrom in der Kabine ausgesetzt. Das Wasser aus 18 Wells wurde anschließend als Probe in einer PCR (Polymerase Kit F-551L von Finnzymes ohne Template, 35 Zyklen) eingesetzt, die das vernebelte Fragment amplifiziert. Als positive Kontrolle diente Fragment-DNA aus der vernebelten Suspension und als negative Kontrolle wurde Wasser verwendet. Die Auftrennung der Amplifikate erfolgte in vier 1,5 % Agarose-Minigelen. Als Längenstandard diente ein Mix aus λ-DNA Hind III geschnitten und ϕX174-DNA Hae III geschnitten.

Nach Anfärbung mit SYBR Gold wurden die Gele mit einem GelCam-System und Polaroid 667 black-and-white Filmen fotografiert. Das Experiment wurde einmal ohne die UVC-Bestrahlung der Umluft und einmal mit UVC-Bestrahlung der Umluft durchgeführt.

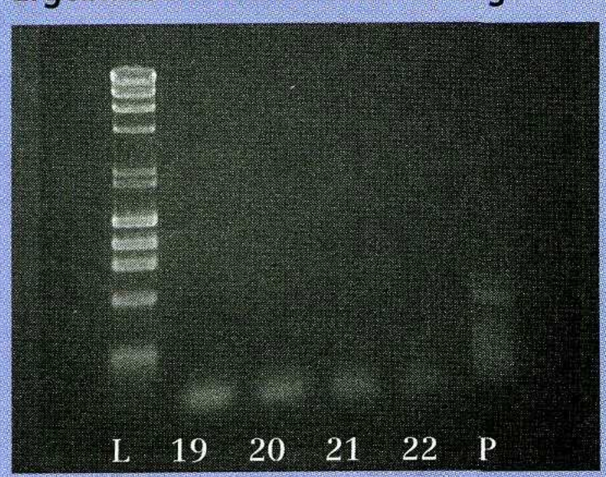
Die L-Spuren weisen den Längenstandard auf, die P-Spuren zeigen die positiven Kontrollen und in den N-Spuren befinden sich die negativen Kontrollen. In die Spuren 1 bis 36 wurden je 10 µl Amplifikat + 3 µl Blaumarker aufgetragen. Die Ergebnisse ohne UVC-Bestrahlung zeigen, dass 17 von 18 Wells (Spuren 1

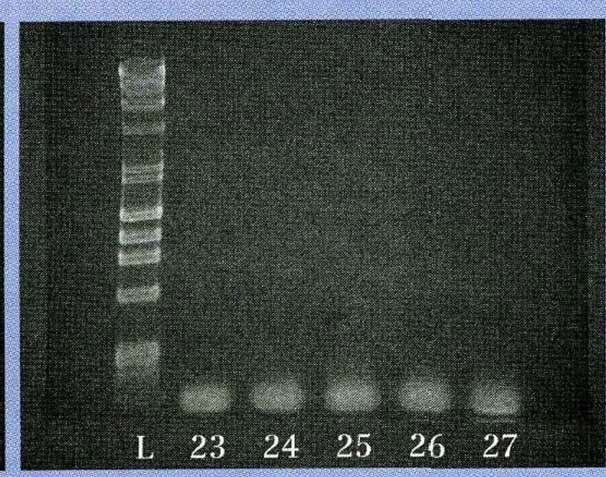
Ergebnisse ohne UVC-Bestrahlung:

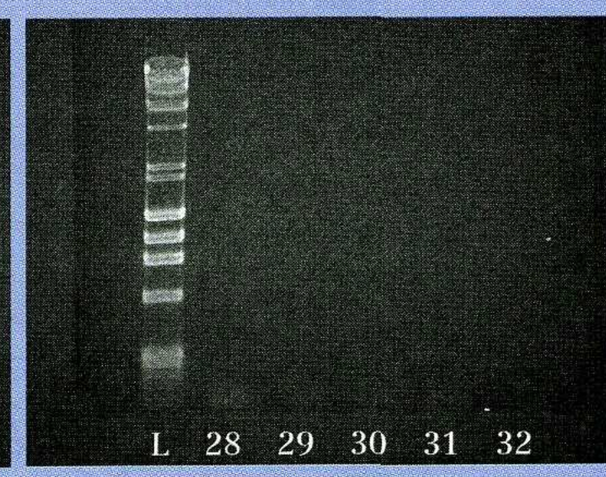


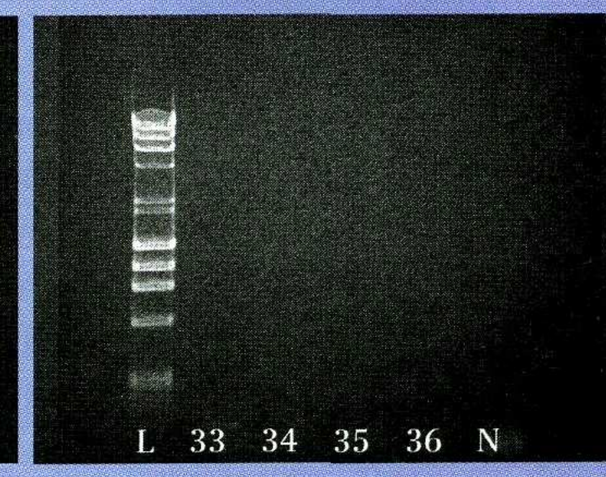


Ergebnisse mit UVC-Bestrahlung:









bis 18) der Mikrotiterplatte mit Aerosolen, die das 500 bp Fragment beinhalten, kontaminiert wurden. Bei der Wiederholung des Experimentes mit der UVC-Bestrahlung der Kabinenumluft konnte in keinem der 18 Wells (Spuren 19 bis 36) eine Kontamination durch Aerosole nachgewiesen werden.

Fazit

Die Ergebnisse zeigen, dass mittels der UVC-Bestrahlung der Umluft in der Kabine DNA-Aerosole inaktiviert werden. Wesentlich hierbei ist eine effektive Strahlendosis, die in der Brennerkammer erreicht wird, denn die Entstehung von UVC induzierten Strahlenschäden an der DNA nimmt mit der Dosis zu [1,4,5].

Die Sensitivität der PCR bzgl. des vernebelten Fragments liegt bei ≥ 8 Molekülen [6]. Aufgrund der DNA Konzentration der vernebelten Lösung kann ein Aerosol mit einem Durchmesser von 2,1 µm bereits kontaminös sein. Verglichen mit den Angaben des Verneblerherstellers (Pari, 1997), die sich auf die Vernebelung einer Lösung mit vergleichbarer Dichte beziehen, sind in diesem Experiment mehrere Milliarden potentiell kontaminöse Partikel entstanden. Die Anzahl der in den Luftraum der Kabine eingebrachten DNA-Aerosole übersteigt damit die in einem PCR-Labor zu erwartenden Kontaminationen erheblich und unterstreicht den Kontaminationsschutz, der mit der Kabine erreicht wird. Dabei kann die Kabine nicht nur vor bereits in der Luft befindlichen DNA-Molekülen schützen, sondern auch vor der unbeabsichtigten Freisetzung von Template-DNA bei der Herstellung der PCR-Ansätze.

Diese Arbeit wurde unterstützt vom Carl-Severing Berufskolleg Bielefeld, Abteilung Biologisch Technische Assistenz, sowie von der WEGEmbH Wirtschaftsentwicklungsgesellschaft Bielefeld.

Literatur

[1] Friedberg, E.C., Walker, G.C. and Siede, W. (1995) DNA Repair and Mutagenesis. ASM Press, Washington, D.C.

[2] Chan, G.L., Doetsch, P.W. and Haseltine, W.A. (1985) Biochemistry, 24, 5723–5728

[3] Wellinger, R.E. and Thoma, F. (1996) Nucleic Acids Research, 24, No.8, 1578–1579

[4] Ciarrocchi, G. and Pedrini, A.M. (1982) J. Mol. Biol., 155, 177–183

[5] Govan, H.L., Valles-Ayoub, Y., and Braun, J. (1990) Nucleic Acid Research, 18, No.13, 3823–3830

[6] Schulz, J. (2001) Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie und Gentechnologie der Universität Bielefeld

[7] Pari (1997) Verneblercharakterstik Pari Boy + Pari Lc Plus Turbo

Die Autoren

Jochen Schulz
Andreas Bermpohl
Brigitte Dreiseikelmann

Biotec Umwelt Service GmbH
Elbrachtsweg 76
33332 Gütersloh
Fax: 05241/904124

Easy Info • 623

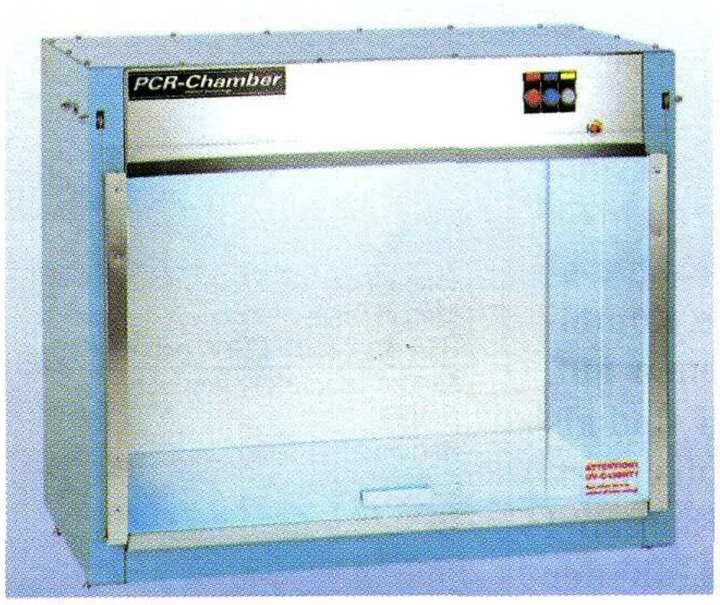
Der sichere Schutz vor Luftkontaminationen – *PCR-Chamber*

Die PCR-Kabine ist das leistungsfähige UVC-Umluftsystem zur Dekontamination von luftgetragenen DNA-Aerosolen.

Leistungsmerkmale:

- hochwirksames UVC-Umluftsystem.
- Edelstahlinnenoberfläche, B 920 mm, T 520 mm, H 540 mm.
- Separat zuschaltbarer UVC-Strahler zur Oberflächendesinfektion.
- TRUEDAY-Innenbeleuchtung.
- Steckdose (220 V) im Innenraum.
- Generell auch hervorragend geeignet für das sterile Abeiten im mikrobiologischen Labor.

Einführungspreis: 3.570,– € zzgl. 16% MwSt.



Vertrieb: **biotec GmbH**
Umwelt-Analytik-Service
Telefon: 05241/30720-0
Telefax: 05241/30720-79
E-Mail: biotec_GmbH@t-online.de

Easy Info • 525