

Ist das wirklich DNA in Ihrem Gefäß? Vergleichende Analyse von UV-absorbierenden Leachables in Mikroliter-Reaktionsgefäßen

RAFAL GRZESKOWIAK UND DIANA HÜBLER, EPPENDORF AG, HAMBURG

Zusammenfassung

Bioaktive Kontaminanten, die aus Laborverbrauchsartikeln entweichen, sog. „Leachables“, können Experimente erheblich beeinflussen und stellen eine wahrscheinliche Fehlerquelle für viele Assay-Systeme dar. Jüngste wissenschaftliche Erkenntnisse liefern zahlreiche Beispiele von biologischen Assays, welche nachweislich durch Leachables beeinflusst wurden, u.a. Routineanwendungen wie z.B. Nukleinsäure-Messungen im Spektrophotometer. Die vorliegende Arbeit zeigt eine vergleichende Analyse von UV-absorbierenden Leachables und daraus resultierenden verfälschten DNA-Messungen nach Inkubation von Wasserproben in 1,5 mL Mikroliter-Reaktionsgefäßen verschiedener Hersteller.

Eine Mehrzahl der getesteten Gefäße (s. Abb. 1 und 2) wiesen im Gegensatz zu Gefäßen von Eppendorf hohe bis sehr hohe falsche DNA-Konzentrationen auf.

Einleitung

Die Wissenschaft liefert zunehmend Erkenntnisse darüber, dass aus Kunststoff-Verbrauchsartikeln austretende chemische Substanzen (Leachables) einen erheblichen Einfluss auf Experimente haben und eine wahrscheinliche Fehlerquelle für viele Assay-Systeme darstellen [1, 2, 3, 4]. Dies betrifft nicht nur verschiedene enzymatische Assays [1, 2, 3], Rezeptor-Bindungs-Assays [1, 5], Zellkultur [3, 6] und hochqualitative analytische Assays [7], sondern auch gewöhnliche Labormethoden wie z.B. spektrophotometrische Messungen von Nukleinsäuren [8].

Im letzteren Fall führen die UV-absorbierenden Leachables zu falsch-positiven Messwerten. Dies kann nachfolgende Anwendungen beeinträchtigen, die auf genauen DNA-/RNA-Messungen beruhen, wie z.B. PCR, qPCR, Sequenzierungen und NGS sowie forensische und Microarray-Anwendungen. In der vorliegenden Arbeit wurde eine vergleichende Analyse UV-absorbierender Leachables durchgeführt, welche nach Inkubation von Wasserproben in 1,5 mL Mikroliter-Reaktionsgefäßen verschiedener Hersteller zu verfälschten DNA-Messungen führten. Die Mehrzahl der getesteten Gefäße zeigten hohe bis sehr hohe falsche DNA-Konzentrationen, mit Ausnahme von Eppendorf Tubes®.

Material und Methoden

Eppendorf Safe-Lock Tubes und Standard 1,5 mL Mikroliter-Reaktionsgefäße von zehn weiteren Herstellern (24 Gefäße pro Hersteller) wurden mit 1,5 mL ultrareinem Wasser befüllt und entweder 30 min bei 95°C oder 24 h bei 40°C inkubiert (s. Ergebnisteil). Die Inkubationen wurden sowohl mit autoklavierten (120°C, 20 min, 10 bar) als auch mit nicht autoklavierten Gefäßen durchgeführt.

Die Proben jedes einzelnen Herstellers wurden zusammengelegt, und spektrophotometrische Messungen wurden mit Hilfe des Eppendorf BioSpectrometer® und der UVette® durchgeführt.

Absorption bei 260 nm sowie der Faktor 50 µg/mL wurden herangezogen, um die falschen DNA-Konzentrationen zu bestimmen, die auf die UV-absorbierenden Leachables innerhalb einer jeden Probe zurückzuführen waren.

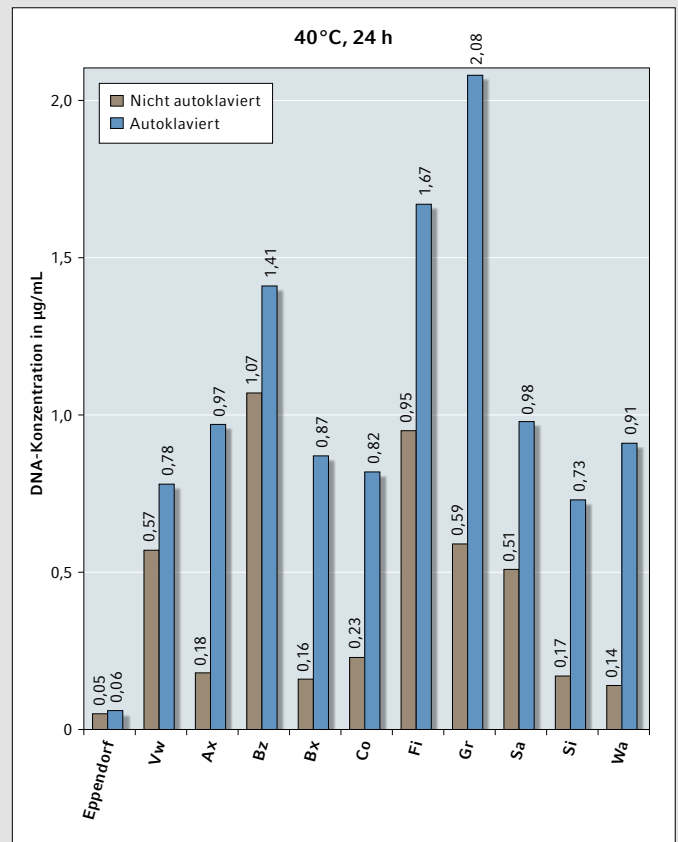


Abb. 1: Falsche DNA-Konzentration (µg/mL) durch UV-absorbierende Leachables, die während 24 h Inkubation bei 40°C aus Reaktionsgefäßen in die Probe aus ultrareinem Wasser abgegeben wurden. Abgebildet sind die Mittelwerte aus 24 zusammengelegten Proben aus nicht autoklavierten (braune Balken) sowie autoklavierten (blaue Balken) Reaktionsgefäßen.

Ergebnisse und Diskussion

Abb. 1 zeigt, dass sogar unter relativ milden Temperaturbedingungen die meisten Reaktionsgefäße beträchtliche Mengen an UV-absorbierenden Kontaminanten abgeben können, was zu verfälschten DNA-Messungen führt (bis zu 1,1 µg/mL falscher dsDNA), und dass dieses Phänomen durch Autoklavieren noch dramatisch verstärkt werden kann (bis zu 2,1 µg/mL falscher dsDNA). Die Zunahme an Leaching nach Autoklavierung war für die folgenden Hersteller am höchsten: Wa (6,4-fach), Bx (5,6-fach), Ax (5,3-fach), Co (3,6-fach), Si (4,4-fach) und Gr (3,5-fach). Im Gegensatz dazu wiesen die Messungen der Proben, welche in nicht autoklavierten sowie in autoklavierten Eppendorf Safe-Lock Tubes inkubiert worden waren, sehr niedrige Werte auf: 0,05 µg/mL bzw. 0,06 µg/mL.

Dieser deutliche Anstieg des Leaching nach dem Autoklavieren in den Reaktionsgefäßen der meisten Hersteller kann u.U. auf unterschiedliche molekulare/chemische Zusammensetzungen

Ist das wirklich DNA in Ihrem Gefäß? Vergleichende Analyse von UV-absorbierenden Leachables in Mikroliter-Reaktionsgefäßen

der eingesetzten Polymere zurückzuführen sein, welche anfälliger gegenüber Veränderungen oder Beschädigungen während des Autoklavivorganges sind. Dies führt sodann zu erhöhter Freisetzung von Nebenprodukten der Polymerisation und/oder Zusatzstoffen, die bei der Produktion eingesetzt werden. Eppendorf Tubes werden aus hochreinem Polypropylen gefertigt, und weder Weichmacher noch Gleitmittel oder Biocide werden der Produktion beigemischt.

Bisher wurden noch keine umfassenden Studien zum Einfluss des Autoklavierens auf das Leaching veröffentlicht. Da es sich beim Autoklavieren jedoch um eine sehr gängige Methode handelt, sollten deren Auswirkungen auf Experimente im Rahmen der normalen Laborroutine sorgfältiger bedacht werden.

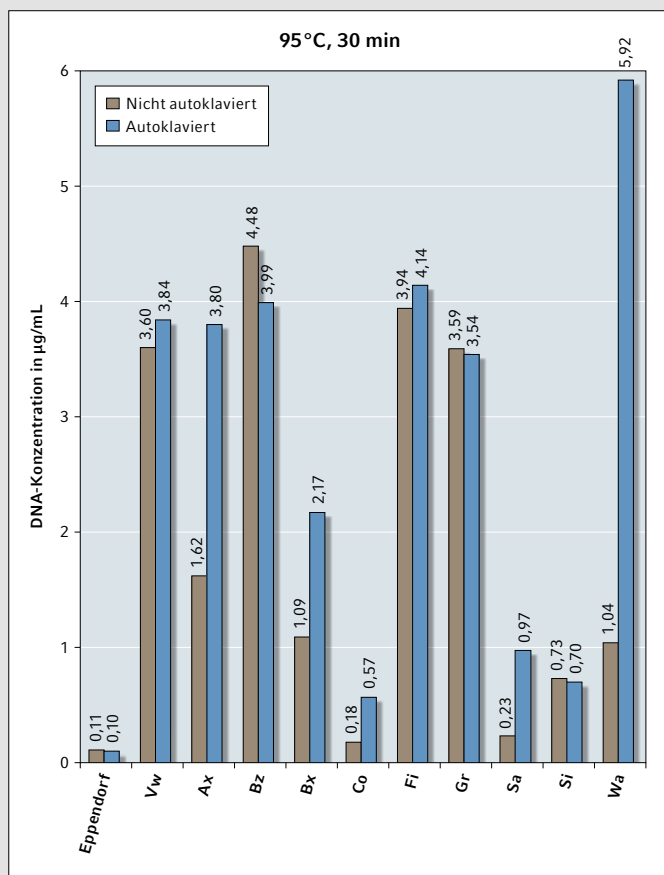


Abb. 2: Falsche DNA-Konzentration (µg/mL) durch UV-absorbierende Leachables, die während 30 min Inkubation bei 95 °C aus Reaktionsgefäßen in die Probe aus ultrareinem Wasser abgegeben wurden. Abgebildet sind die Mittelwerte aus 24 zusammengelegten Proben aus nicht autoklavierten (braune Balken) sowie autoklavierten (blaue Balken) Reaktionsgefäßen.

Wie in Abb. 2 dargestellt, stiegen die durchschnittlichen Werte der nachgewiesenen UV-absorbierenden Leachables weiter an, wenn die Wasserproben für 30 min bei 95 °C inkubiert wurden. Sogar innerhalb dieser kurzen Zeit war der durchschnittliche Leaching-Level (sowohl für autoklavierte als auch nicht autoklaverte Gefäße) beträchtlich und erreichte Werte bis zu 2,51 µg/mL falscher dsDNA, im Vergleich zu einem Durchschnittswert von 0,79 µg/mL falscher dsDNA nach Inkubation über 24 h bei 40 °C (3,17-facher Anstieg).

Dies weist darauf hin, dass die Temperatur einen kritischen Faktor für das Leaching darstellt, was auch aus früheren Berichten hervorgeht [8]. Ähnlich den Inkubationen bei niedrigeren Temperaturen wurden die weitaus niedrigsten Werte für die in Eppendorf Safe-Lock Tubes inkubierten Wasserproben ermittelt (Abb. 2). Hierdurch lässt sich das Risiko von Artefakten durch Leachables sowie von verfälschten Messwerten für Nukleinsäuren signifikant reduzieren.

Fazit

Insgesamt zeigte die Mehrzahl der getesteten Gefäße hohe bis sehr hohe Werte von UV-absorbierenden Leachables in Wasserproben, welche bei 40 °C bzw. 95 °C inkubiert worden waren. Zusätzlich wurden die Leachables-Werte durch den Autoklavivorgang erheblich erhöht. UV-absorbierende Leachables führten nachweislich zu falsch-positiven Messwerten, was möglicherweise nachfolgende Anwendungen beeinträchtigt, die auf genauen DNA-/RNA-Messungen beruhen, wie z.B. PCR, qPCR, Sequenzierungen und NGS sowie forensische und Microarray-Anwendungen. Unter sämtlichen experimentellen Bedingungen und unabhängig vom Autoklavivorgang wiesen Eppendorf Tubes gleichbleibend niedrige Leaching-Werte auf und reduzieren somit das Risiko von falschen spektrophotometrischen Messwerten signifikant.

Literatur

- [1] McDonald GR, Hudson AL, Dunn SM, You H, Baker GB, Whittall RM, Martin JW, Jha A, Edmondson DE, Holt A. Bioactive contaminants leach from disposable laboratory plasticware. *Science* 2008; 322(5903):917.
- [2] McDonald GR, Kozuska JL, Holt A. Bioactive Leachates from Lab Plastics. *G.I.T. Laboratory Journal* 2009; 9-10: 2-4.
- [3] Olivieri A, Degenhardt OS, McDonald GR, Narang D, Paulsen IM, Kozuska JL, Holt A. On the disruption of biochemical and biological assays by chemicals leaching from disposable laboratory plasticware. *Can J Physiol Pharmacol* 2012; 90(6):697-703.
- [4] Grzeskowiak R, Gerke N. Leachables: Minimizing the Influence of Plastic Consumables on the Laboratory Workflows. *White Paper 026*; www.eppendorf.com/wp26
- [5] Watson J, Greenough EB, Leet JE, Ford MJ, Drexler DM, Belcastro JV, Herbst JJ, Chatterjee M, Banks M. Extraction, identification, and functional characterization of a bioactive substance from automated compound-handling plastic tips. *J Biomol Screen* 2009; 14(5):566-72.
- [6] Lee TW, Tumanov S, Villas-Bôas SG, Montgomery JM, Birch NP. Chemicals eluting from disposable plastic syringes and syringe filters alter neurite growth, axogenesis and the microtubule cytoskeleton in cultured hippocampal neurons. *J Neurochem* 2015; 133(1):53-65.
- [7] Schauer KL, et al. Mass Spectrometry Contamination from Tinuvin 770, a Common Additive in Laboratory Plastics. *Journal of Biomolecular Techniques* July 2013; 24(2):57-61.
- [8] Lewis LK, Robson M, Vecherkina Y, Ji C, Beall G. Interference with spectrophotometric analysis of nucleic acids and proteins by leaching of chemicals from plastic tubes. *Biotechniques* 2010; 48(4):297-302.