



DNA/RNA-ExitusPlus™ y DNA/RNA-ExitusPlus™ IF

Reactivo para la eliminación de contaminaciones de ADN y ARN
Códigos de producto A7089 y A7409

Descripción

DNA/RNA-ExitusPlus™ es una solución lista para usar, rápida y eficaz, para superficies y equipos de laboratorio. La descontaminación se inicia instantáneamente tras la pulverización sobre una superficie contaminada. La ventaja del producto es que no es tóxico para las personas ni corrosivo para el material de laboratorio. Los productos de la competencia utilizan agentes nocivos para la salud y corrosivos.

DNA/RNA-ExitusPlus™ es un reactivo patentado para la eliminación de la contaminación por ácidos nucleicos de las superficies y equipos de laboratorio (1). La solución emplea una química suave no corrosiva para una rápida degradación no enzimática de los ácidos nucleicos. Incluso un corto tiempo de incubación con DNA/RNA-ExitusPlus™ elimina completamente el ADN y el ARN contaminante de las superficies de trabajo y herramientas (1, 2).

Hay dos versiones diferentes de DNA/RNA-ExitusPlus™ disponibles: DNA/RNA-ExitusPlus™ (A7089) incluye un indicador de color para visualizar fácilmente la superficie cubierta con el reactivo. DNA/RNA-ExitusPlus IF™ (A7409) es casi incoloro. Ambas soluciones se oscurecen con el tiempo debido a los componentes redox activos contenidos en las soluciones.

Nota: No hay diferencias en los protocolos de aplicación de DNA/RNA-ExitusPlus™ y DNA/RNA-ExitusPlus IF™. Por lo tanto, no nombramos la forma IF en las siguientes instrucciones de uso.

Propiedades únicas y excepcionales de DNA/RNA-ExitusPlus™

1. Los efectos catalíticos y cooperativos causan una muy rápida degradación inespecífica, no enzimática, de moléculas de ADN y ARN.
2. Todos los componentes de **DNA/RNA-ExitusPlus™** son fácilmente biodegradables y no perjudiciales o tóxicos para los seres humanos.
3. Las soluciones no contienen ácidos minerales agresivos o sustancias alcalinas. Los equipos y materiales no resultan dañados o corroídos incluso después de tiempos de incubación prolongados.
4. Sin vapores tóxicos.
5. Temperaturas elevadas por encima de aprox. 50°C aceleran la reacción y la actividad.



Instrucciones de uso

1. El tiempo de incubación óptimo para la descontaminación de las superficies es de 10 minutos a una temperatura superior a 20°C. Después de la incubación, el DNA/RNA-ExitusPlus™ residual se elimina con una toalla de papel, sin necesidad de limpiar posteriormente con agua estéril.
2. Una vez que la solución se seca completamente, no se produce ninguna otra reacción de descontaminación. Por lo tanto, un tiempo de incubación de más de 30 minutos no es necesario ni útil. En caso de graves contaminaciones se recomienda una segunda aplicación de la solución para una mayor efectividad.
3. Para la eliminación de trazas secas residuales no deseadas de reactivo, se recomienda eliminarlas con agua estéril o un tampón 10X TE y una toalla de papel.

Instrucciones detalladas

Para descontaminar las superficies del laboratorio: Aplicar DNA/RNA-ExitusPlus™ directamente sobre las superficies del laboratorio. Incubar durante 10 minutos. Limpiar bien los residuos de DNA/RNA-ExitusPlus™ con una toalla de papel (eliminar los residuos secos con agua estéril/tampón TE 10X). No es necesario enjuagar con agua.

Para descontaminar los aparatos de laboratorio: Aplicar generosamente DNA/RNA-ExitusPlus™ sobre una toalla de papel y limpiar a fondo todas las superficies expuestas del aparato. Secar con una toalla de papel limpia. Para limpiar las partes pequeñas, sumergirlas brevemente en DNA/RNA-ExitusPlus™ y secarlas.

Para descontaminar los vasos de plástico y vidrio: Añadir una cantidad suficiente de DNA/RNA-ExitusPlus™ que permita cubrir toda la superficie del recipiente por movimiento rotatorio (remolino o vórtice). Descartar la solución y secar. Enjuagar bien los vasos con agua destilada y secar.

Para descontaminar pipetas: Siguiendo las instrucciones del fabricante; quitar el eje y las juntas de la pipeta. Sumergir el eje durante un minuto en DNA/RNA-ExitusPlus™, enjuagar el eje minuciosamente con agua, dejar secar y volver montar.

Una excelente tecnología para la descontaminación de ácidos nucleicos

La amplificación del ADN es una de las técnicas más utilizadas en el laboratorio de investigación moderno.

La presencia de ADN contaminante en las estaciones de trabajo de PCR y alrededores puede provocar artefactos no deseados durante la amplificación. Principalmente, hay dos maneras de hacer que el ADN no se amplifique:

1. por degradación del ADN (por ejemplo, por adición de DNasas o destrucción química), o
2. por modificación de las bases - dejando la cadena de ADN intacta, pero bloqueada para su lectura por polimerasas.

Utilizando un ensayo de rotura de cadenas de ADN (ver Fig. 1), se ha demostrado que no todas las soluciones de descontaminación de ADN en el mercado degradan totalmente el ADN. DNA/RNA-ExitusPlus™ es una mejora con respecto a esos productos y causa tanto la ruptura de las cadenas como su degradación. Cuando se utiliza correctamente en el área de trabajo, elimina totalmente la amplificación del ADN no deseado (Fig. 3). DNA/RNA-ExitusPlus™ es una solución limpiadora no alcalina, no corrosiva y no cancerígena que es efectiva en todas las superficies.

Una grave desventaja de los reactivos de descontaminación convencionales se muestra en una prueba realizada sobre el potencial corrosivo de sus componentes. Para ello, se incubaron diferentes placas de metal durante 20 minutos con alícuotas idénticas de los reactivos. Los metales seleccionados son representativos del equipo y los materiales que se encuentran en los laboratorios. El resultado de esta prueba de corrosión está documentado en la figura 2, mostrando que todos los productos comerciales conocidos contienen sustancias químicas agresivas con efectos corrosivos, dañinos o incluso tóxicos. Se sabe que estos reactivos convencionales contienen azidas, ácidos minerales como el ácido fosfórico o el ácido clorhídrico, peróxidos agresivos o sustancias alcalinas fuertes como el hidróxido de sodio. Incluso después de una incubación de sólo 20 minutos, se observan en muchos casos daños irreversibles en las superficies metálicas (véase la figura 2). La solución patentada DNA/RNA-ExitusPlus™ muestra sus características únicas especialmente en esta prueba de corrosión. En todas las superficies metálicas sometidas a prueba no se observan daños ni corrosión después del tratamiento. DNA/RNA-ExitusPlus™ también se probó en condiciones idénticas en muchas superficies plásticas diferentes sin que se observaran indicios de daños.

El reactivo es estable durante al menos 12 meses (en frasco cerrado) y es estable al calor.

Referencias:

- (1) Esser, K.-H. et al. (2006) DNA decontamination: DNA/RNA-ExitusPlus™ in comparison with conventional reagents. *Nature Methods* **3**, 151.
- (2) Arena, A. (2010) DNA/RNA-ExitusPlus™ versus standard bleach solution for the removal of DNA contaminants on work surfaces and tools. *Investigative sciences journal* **2**, 20-29.

Control de calidad

Cuantificación de la degradación del ADN por electroforesis analítica en gel de agarosa o PCR

Cada vez es más importante controlar con exactitud la degradación del ADN tras las medidas de descontaminación en los laboratorios.

Si el ADN se incuba con DNA/RNA-ExitusPlus™ o cualquier otro reactivo de descontaminación y se carga una muestra de la mezcla de reacción en un gel de agarosa sin neutralización o desnaturalización previas, no será posible realizar una determinación cuantitativa de la degradación del ADN. Muchos fragmentos se unirán entre sí para formar unidades más grandes, incluso después de la rotura de las hebras (10 a 20 pares de base homólogos serán suficientes para hibridar formando unidades más grandes). Este fenómeno de hibridación se observa en los fragmentos de ADN con extremos cohesivos, por ejemplo, en el marcador del tamaño de ADN λ para la electroforesis en gel. Esta es la razón por la que este marcador de ADN se desnaturaliza antes de ser cargado en un gel.

Los reactivos de otros proveedores suelen contener altas concentraciones de ácidos o bases fuertes. Si no se neutralizan estas mezclas de reacción antes de cargarlas en el gel, se observará un cambio en el color del indicador de pH azul de bromofenol (intervalo de transición a pH 2 - 4,6 de amarillo verdoso a azul-violeta). Si se carga una muestra no neutralizada en un gel, se puede observar la destrucción del pocillo (slot) por los productos químicos. El bromuro de etidio se destruirá en estas condiciones y por lo tanto no se puede aplicar ya que no se teñirá para el ADN. Las bandas del gel serán claras, incluso si hay grandes cantidades de ADN no teñido. Al neutralizar la muestra con tampón Tris, el color correcto del azul de bromofenol se hará visible. Dependiendo de la composición del reactivo de descontaminación, la neutralización tiene que realizarse con 100 mM Tris pH 12 o 100 mM Tris pH 3, respectivamente. En el caso de DNA/RNA-ExitusPlus™, la capacidad del tampón de carga es suficiente para tamponar incluso una mezcla 1:1 del reactivo de descontaminación y la muestra.

Cuando la neutralización del azul de bromofenol muestra el pH correcto, las muestras se desnaturalizan a 90°C durante 2 minutos.

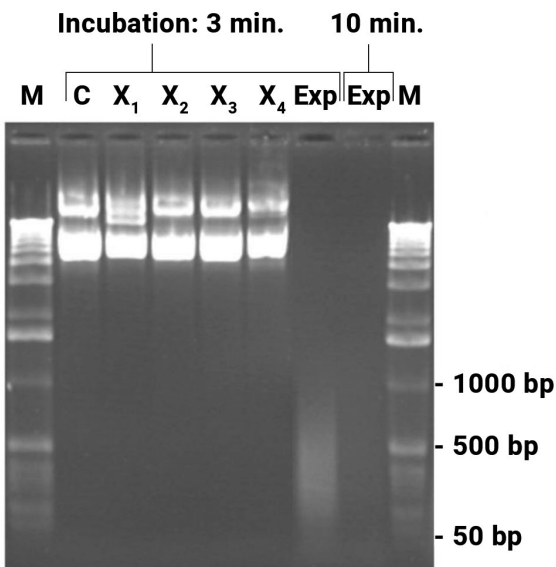


Fig. 1. Comparación de la degradación de ADN con DNA/RNA-ExitusPlus™ y con reactivos convencionales de descontaminación de ADN.

Las alícuotas de un ADN de un plásmido de CCC (7 kb), 200 ng por cada muestra, se disolvieron en 10 μ L de agua y se trataron con 5 μ L de uno de los reactivos enumerados durante 3 o 10 minutos, respectivamente, a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se mezclaron con tampón de carga de azul de bromofenol y se desnaturalizaron durante 3 min a 92°C. Las muestras desnaturalizadas se colocaron en hielo y la mezcla de reacción completa se cargó en un gel de agarosa al 1%. Después de la electroforesis en gel, el gel de agarosa se tiñó con bromuro de etidio y se fotografió. El control (C) contiene el ADN del plásmido de CCC intacto (200 ng) después del tratamiento con 5 μ L de agua estéril. Las mellas y daños de las cadenas de ADN generan fragmentos de menor peso molecular. Estos fragmentos de ADN más pequeños pueden ser identificados en el gel por comparación con la muestra de control y el marcador de peso molecular (M; ladder de 1 kb). Los productos X₁-X₄ únicamente causan muy poca degradación del ADN de prueba. Solo el producto DNA/RNA-ExitusPlus™ (Exp) causa una degradación muy rápida y casi completa del ADN después de 3 min. Por lo tanto, solo se observan fragmentos residuales de ADN menores de 500 pares de bases. La incubación prolongada (10 min) destruyó todo el ADN del plásmido.

La alta concentración de productos químicos en los reactivos de otros proveedores provoca graves problemas durante el análisis de la PCR. Las muestras recogidas al limpiar las mesas de trabajo tratadas con esos reactivos contenían productos químicos en concentraciones tan altas que la PCR se inhibía, incluso después de la dilución. Por lo tanto, se requiere un control positivo de la PCR con una mezcla de un patrón definido y una alícuota de la muestra recogida para excluir los resultados negativos falsos. En nuestras manos tal control negativo-PCR todavía contenía ingredientes de los reactivos en concentraciones inhibitorias, lo que hacía necesaria una mayor dilución o neutralización.

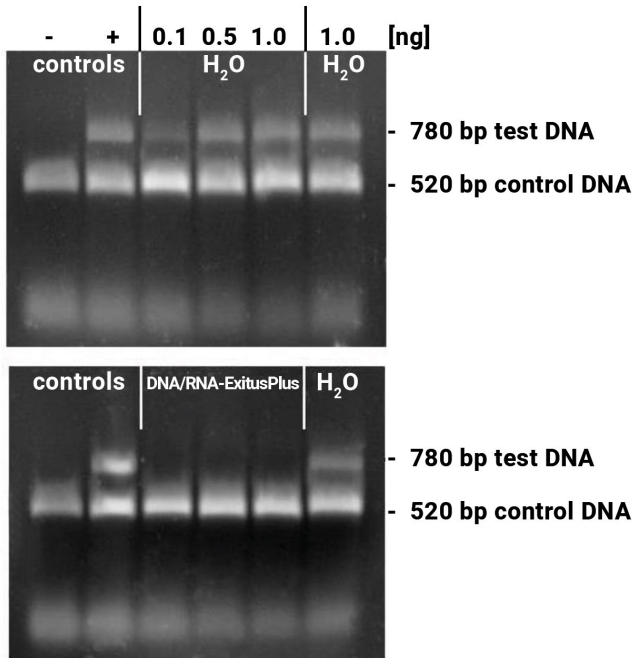
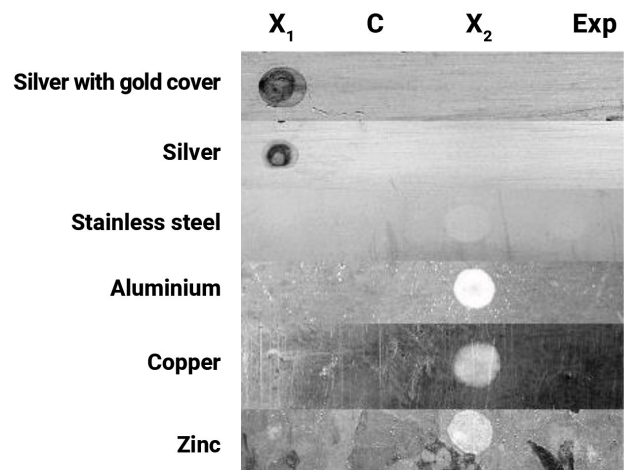


Fig. 2. Eliminación completa de ADN con DNA/RNA-ExitusPlus™ determinado mediante ensayo PCR alta sensibilidad.

Cantidades seleccionadas (0,1 a 1 ng) de un ADN de prueba fueron liofilizadas en la superficie interior de los tubos de PCR. Los tubos de PCR con la muestra de ADN liofilizado se incubaron durante 20 segundos con agua estéril o con DNA/RNA-ExitusPlus™. A continuación, los tubos se lavaron dos veces con 100 µL de agua estéril. Para la reacción de la prueba de PCR, se añadieron mezclas de 50 µL a cada tubo. Esta mezcla de reacción contiene primers para la amplificación del ADN de control y el ADN de prueba. El ADN de control (1 ng) se añade a cada muestra y demuestra que la reacción de PCR no se inhibe. La amplificación de una banda de ADN correspondiente al ADN de prueba indica que las moléculas de ADN intactas de esta plantilla están todavía presentes. Tras la completa degradación y eliminación del ADN de prueba, la reacción de PCR no debería amplificar ningún fragmento de ADN de esta plantilla. Después de la electroforesis a través de un gel de agarosa al 1%, el gel se tiñó con bromuro de etidio y se documentó. El control negativo con agua estéril (H₂O) muestra bandas de ADN para la prueba y los patrones de control. La reacción de PCR después del tratamiento con DNA/RNA-ExitusPlus™ amplifica sólo el fragmento del ADN de control. Esto demuestra que el tratamiento con DNA/RNA-ExitusPlus™ destruye y elimina todos los rastros del patrón de ADN de prueba.

Fig. 3. DNA/RNA-ExitusPlus™ no tiene potencial corrosivo comparado con reactivos convencionales de descomposición de ADN.

Para esta prueba se eligieron placas de metal que son típicas para los materiales y equipos de laboratorio. Se aplicaron alícuotas de 10 µL de cada reactivo en las diferentes superficies metálicas. Se utilizó agua estéril como control (C). Después de un tiempo de incubación de 20 minutos, los reactivos se limpiaron y los metales se lavaron ligeramente con agua estéril. Después de secarse completamente las placas de metal fueron fotografiadas. Los reactivos X₁ y X₂ para la descontaminación del ADN causan corrosión irreversible y daños en muchas de las superficies metálicas. En el caso de DNA/RNA-ExitusPlus™ (Exp) no se observa ningún daño en ninguna de las superficies.



Degradación de pequeños fragmentos de ADN

La actividad de ruptura de cadenas de DNA/RNA-ExitusPlus™ es independiente del tamaño de los fragmentos de ADN, ya que la destrucción se basa en una acción química y no en una actividad enzimática. Por lo tanto, se ha incubado un producto de PCR de 750 pb durante diferentes tiempos con DNA/RNA-ExitusPlus™ (Fig. 4). Según lo esperado, los primers no pueden ser detectados ni siquiera después del tiempo de incubación más corto. Al cabo de 5 minutos de incubación con DNA/RNA-ExitusPlus™ se destruye casi todo el ADN. Queremos dejar claro por qué es así: Asumiendo que existe una actividad de mellado teórica de 100.000 mellas por minuto, todos los fragmentos de ADN serán destruidos, independientemente de su tamaño. Los fragmentos más pequeños desaparecerán antes que los más grandes.

Por lo tanto, transfiriendo esta teoría a una molécula de prueba (forma ccc, plásmido de 6 kb), después de 5 minutos solo quedará una pequeña fracción de fragmentos con 200 a 500 pb de tamaño. Las mellas se introducirán estadísticamente en cualquier sitio, sin dejar ni una sola clase de fragmentos. Por lo tanto, el análisis de PCR será negativo. Cuando se rocíe DNA/RNA-ExitusPlus™ en las superficies del laboratorio, se aplicará un enorme exceso de reactivo de aproximadamente 1 a 5 mL a las cantidades más pequeñas de ADN.

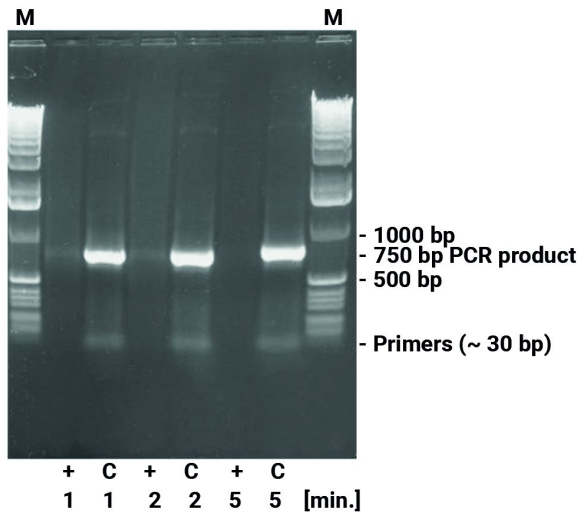
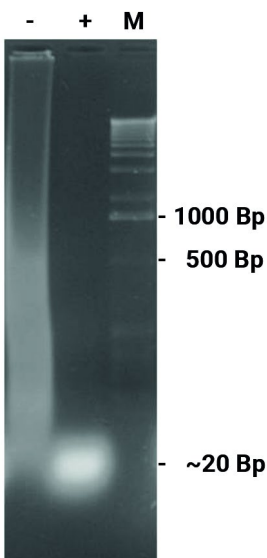


Fig. 4. Degradación de un producto de PCR por DNA/RNA-ExitusPlus™.

Para probar la degradación de pequeños fragmentos de ADN, se han incubado con DNA/RNA-ExitusPlus™, durante los períodos indicados (1, 2 y 5 minutos), 500 ng de ADN de una reacción de PCR que ha dado lugar a un fragmento de PCR de 750 bp. Después del tratamiento, el ADN se desnaturalizó a 95°C durante 2 minutos.

(+) 5 µl de ADN más 5 µl de DNA/RNA-ExitusPlus™
 (C) control 5 µl de ADN más 5 µl de agua
 (M) marcador de peso molecular 1 kb ladder

Mejora de la eficiencia mediante el aumento de la temperatura de incubación



Es extremadamente difícil eliminar y destruir el ADN seco en cualquier superficie o el ADN "protegido", por ejemplo, por la envoltura de un virus. Incluso el autoclave no logra en algunos casos degradar dicho ADN. El genoma completo de un virus aviar podría detectarse después de la esterilización en autoclave [Elhafi, G., Naylor, C.J., Savage, C.E. y Jones, R.C. (2004)]. Los tratamientos con microondas o autoclaves destruyen la capacidad de infección del virus de la bronquitis infecciosa y del neumovirus aviar, pero permiten la detección mediante la reacción en cadena de la transcriptasa inversa-polimerasa. [Avian Pathology 33, 303-306]. Se ha probado la actividad de DNA/RNA-ExitusPlus™ como aditivo de soluciones durante el autoclave. Se pudo demostrar, que el aumento de la temperatura mejoró la actividad de degradación del ADN de DNA/RNA-ExitusPlus™.

Fig. 5. El autoclave de las bacterias recombinantes lleva a una degradación parcial del ADN.

50 ml de cultivos de cepas de *E. coli* recombinantes se esterilizaron en autoclave a 120 °C y 1,2 bares durante 20 minutos con la adición de volúmenes iguales de agua (-) o de DNA/RNA-ExitusPlus™ (+). Posteriormente, se investigaron alícuotas de 10 µl de estos cultivos mediante geles analíticos de agarosa de ADN. La muestra con agua estéril añadida (-) muestra grandes cantidades de fragmentos de ADN de alto peso molecular. La adición del mismo volumen de DNA/RNA-ExitusPlus™ (+) conduce a la degradación del ADN, mostrando tamaños de fragmentos inferiores a 20 pares de bases.



FAQs – Preguntas frecuentes

¿Cuál es el tiempo de aplicación sugerido?

Para contaminaciones con pequeñas cantidades de ADN son suficientes de 5 a 10 minutos a temperatura ambiente. Para cantidades más elevadas de ADN se recomienda repetir el procedimiento después de retirar el DNA/RNA-ExitusPlus™. Además, el aumento de la temperatura de la solución a 50°C o 60°C aumenta sustancialmente la tasa de degradación del ADN.

¿Existen métodos para detectar los residuos de los materiales componentes del DNA/RNA-ExitusPlus™?

La nueva formulación de DNA/RNA-ExitusPlus™ contiene una baja cantidad de indicador de color que puede ser detectado en las superficies después del secado. En caso de que haya que eliminar cualquier pequeño rastro residual de DNA/RNA-ExitusPlus™, se puede limpiar fácilmente de las superficies con un papel de filtro empapado en agua estéril. Para la inactivación de cantidades residuales más grandes de DNA/RNA-ExitusPlus™ las superficies pueden tratarse con una solución de tampón estéril 10X TE, pH 8,0. Asegúrese de prevenir nuevas contaminaciones durante este tratamiento.

Su equipo incluye polipropileno, acero inoxidable, EPDM y juntas de silicona. ¿Qué información tenemos en lo que respecta al "recubrimiento" o la adherencia de estos materiales?

EPDM = Etileno-Propileno-Dieno-Monómero

El polipropileno, el acero inoxidable, el EPDM y las juntas de silicona no se dañan con el DNA/RNA-ExitusPlus™ y la solución se puede lavar fácilmente con agua estéril o con un tampón 10X TE de pH 8,0. Las cantidades residuales de DNA/RNA-ExitusPlus™ que se han secado en estas superficies se pueden eliminar fácilmente con un solo paso de lavado con las mismas soluciones enumeradas y limpiando la solución con toallas de papel limpias.

Tubos pequeños - ¿cómo puedo eliminar el DNA/RNA-ExitusPlus™ residual?

DNA/RNA-ExitusPlus™ tiene la ventaja sobre otros productos comerciales, especialmente en el caso de los tubos de pequeño diámetro, porque la fuerza iónica de todos los componentes es sustancialmente menor que la de otros productos comerciales.

Además, todos los componentes de DNA/RNA-ExitusPlus™ son altamente solubles en agua y no modifican significativamente la viscosidad del agua. Todos tienen una afinidad muy baja con las superficies de metal o plástico.

Por lo tanto, incluso para los tubos con un diámetro muy pequeño un único enjuague con tampón 10X TE, pH 8,0, y un enjuague final con agua estéril es suficiente para la eliminación completa de DNA/RNA-ExitusPlus™.

Como control final, determinar el pH del agua estéril después del enjuague final. Un pH entre 6 y 8 es aceptable. Por favor, compruebe el pH del agua estéril antes de la aplicación. Precaución: el agua estéril preparada con resinas de intercambio de aniones puede tener un pH bajo.

Productos relacionados

Autoclave-ExitusPlus™ (A7600)

El tratamiento en autoclave no destruye totalmente los ácidos nucleicos. El autoclavado está considerado como un método efectivo para la descontaminación de ADN, aunque limitado para el uso de materiales resistentes al calor y equipos que quepan en el autoclave. Bajo condiciones estándar de autoclavado se cree que las moléculas de ADN se degradan en fragmentos muy pequeños. Sin embargo, el análisis por PCR demuestra que incluso después de autoclavar, es posible identificar fragmentos largos de ADN, especialmente cuando los ácidos nucleicos están protegidos por una envoltura proteica como en el caso de los virus, o en microorganismos con pared celular, como las bacterias. Por ello, se ha diseñado Autoclave-ExitusPlus™, una mezcla en polvo basada en la tecnología ExitusPlus™ para usar como aditivo en la descontaminación de líquido residual. Debido a su composición química (lo que se hace extensivo a todos los demás reactivos ExitusPlus™) Autoclave-ExitusPlus™ no es sensible al calor y no contiene ingredientes volátiles o nocivos. La figura 6 muestra los efectos de Autoclave-ExitusPlus™ en cultivos bacterianos y ácidos nucleicos después de autoclavar. Únicamente con la adición de Autoclave-ExitusPlus™ se consigue una degradación completa de ADN bacteriano, mientras que en condiciones estándar, por ejemplo, autoclavado en solución acuosa o en medio de cultivo, permanece siempre ADN sin degradar o parcialmente degradado. Por lo tanto, el uso de autoclave para eliminar ADN procedente de microorganismos debe ser reevaluado. Los últimos datos muestran que los ácidos nucleicos procedentes de virus y bacterias no son apropiadamente desactivados por simple autoclavado.

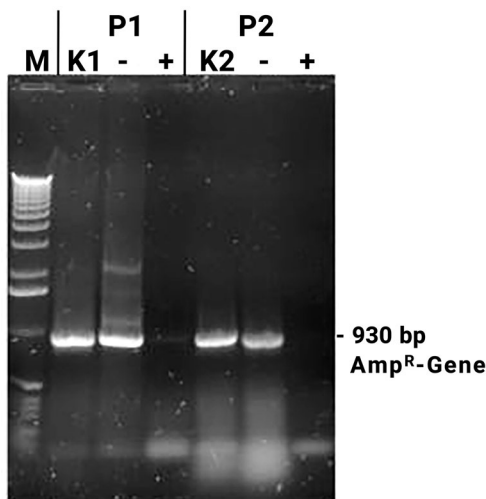


Fig. 6. Análisis de dos cultivos de *E. coli* mediante PCR, después de la esterilización en autoclave con o sin Autoclave-ExitusPlus™.

Dos cultivos recombinantes de *E. coli* (P1 y P2) conteniendo un plásmido con el gen de resistencia a la ampicilina (Amp^R-Gen) tratados en autoclave. Alícuotas (2 µl) de los cultivos tratados en autoclave se analizaron por PCR para la presencia del gen completo Amp^R.

(M) marcador de tamaño molecular
 (-) = *E. coli* más agua
 (+) *E. coli* más Autoclave-ExitusPlus™
 (K1 y K2) = controles de amplificación de PCR:
E. coli más Autoclave-ExitusPlus™ más 2 ng de gen Amp^R patrón.

Solo el análisis PCR en combinación con un ensayo de degradación de ADN mostrará el verdadero potencial descontaminante de un reactivo, evitando resultados falsos por enmascaramiento o modificación del material de ácido nucleico. DNA/RNA-ExitusPlus™ no sólo introduce roturas de cadena en el DNA y el RNA, sino que también divide el DNA/RNA en sus componentes. La amplificación por PCR ya no es posible.

Basándose en este producto patentado, se desarrolló Autoclave-ExitusPlus™. La adición de Autoclave-ExitusPlus™ a los medios de cultivo residuales o a las soluciones tampón degrada eficazmente los ácidos nucleicos durante la esterilización en autoclave.

La investigación ha demostrado que las altas temperaturas, especialmente las que se producen durante el autoclave, multiplican la velocidad de reacción. La degradación del ADN y el efecto de esterilización "adicional" se consiguen incluso si no se alcanza la temperatura de autoclave, debido a ajustes incorrectos o a un defecto en el autoclave, o si una mayor cantidad del líquido simplemente no alcanzó los 120°C.