



ELGA  VEOLIA

Wie Sie Wasserprobleme in Laborexperimenten beheben

Teil 3: Tipps und Tricks für Molekularbiologie

Whitepaper

ELGA LabWater | Veolia Water Technologies

WATER TECHNOLOGIES

Inhalt

1. Allgemeine Tipps zur Vermeidung von Wasser-Verunreinigungen.....	3
Good Laboratory Practice.....	3
Wie Laborwasser normalerweise gereinigt wird.....	4
Die richtige Wasserreinheit für Ihre Anwendung wählen	4
Fehlerbeseitigung bei empfindlichen Anwendungen.....	5
3. Molekularbiologie	6
Probleme und Ursachen.....	6
Fehlerbeseitigung.....	8
Checkliste Molekularbiologie	9
Schlussfolgerung	10
Wie Sie ein geeignetes Aufbereitungssystem auswählen	10
Ein System, das zu Ihren Bedürfnissen passt.....	10
Kurzanleitung	11
Über ELGA LabWater	16

1. Allgemeine Tipps zur Vermeidung von Wasser-Verunreinigungen

Wir empfehlen die Einhaltung der Richtlinien „Good Laboratory Practice“ (GLP) in allen experimentellen Abläufen, um die Konsistenz, Verlässlichkeit, Reproduzierbarkeit, Qualität und Integrität Ihrer Forschung sicherzustellen. Wie wir später zeigen werden, können zahlreiche Fehler in Experimenten auftreten, wenn Sie Wasser in schlechter

oder nicht passender Qualität verwenden. Hier finden Sie eine kurze Zusammenfassung von allgemeingültigen Methoden, mit denen Sie Verunreinigungen aus Ihrem Laborwasser entfernen können oder mit denen Sie verhindern, dass diese Verunreinigungen überhaupt in Ihr System gelangen können:

Good Laboratory Practice

GLP wird definiert als³:

„Ein Qualitäts-System, das den organisatorischen Ablauf und die Bedingungen festlegt, unter denen nicht-klinische gesundheits- und umweltrelevante Sicherheitsprüfungen geplant, durchgeführt, überwacht, aufgezeichnet, archiviert und berichtet werden.“

GLP ist eine Vorgabe für viele Industrielabore. Während sich akademische Labore meist nicht ganz so streng daran halten, bilden viele dieser Prinzipien dennoch die Grundlage für eine erfolgreiche Forschungsarbeit. Klar definierte Laborprozesse helfen, das Risiko für Kontaminationen und Fehler zu minimieren.

- Die festgelegten Prozesse sollten Protokolle und Pläne zur Reinigung Ihres Labors sowie Details zu den jeweiligen Bereichen und Anlagen

enthalten (z.B. prä-PCR-Bereich vs. post-PCR-Bereich).

- Sie sollten die angemessene persönliche Schutzkleidung wie Laborkittel und Laborhandschuhe aufführen und hervorheben, wie wichtig eine aktuelle Dokumentation ist. Informationen wie Chargennummern können nämlich dabei helfen, die Quelle für Probleme zu identifizieren und sie künftig zu vermeiden.
- Sie sollten alle Laborsysteme regelmäßig warten und überprüfen, um Unfälle zu vermeiden.
- Und selbstverständlich sollte jeder Labormitarbeiter die Standard Operating Procedures (SOPs) für Experimente, Wartung und Reinigung kennen und befolgen.

„Es ist wichtig, dass Sie die für Ihre Anwendung passende Wasserreinheit verwenden.“

³ Quelle: World Health Organization: <http://www.who.int/tdr/publications/>

Wie Laborwasser normalerweise gereinigt wird

GLP leistet einen großen Beitrag zur Vermeidung von Verunreinigungen in Laboren. Zusätzliche ist es sinnvoll, die unterschiedlichen Verfahren zur Wasseraufbereitung zu kennen und zu wissen, welche Arten von Verunreinigungen sie jeweils entfernen. Dieses Wissen hilft Ihnen, das richtige Wasseraufbereitungssystem für die in Ihrem Labor

benötigten Wasserqualitäten zu wählen. Wir empfehlen die Kombination mehrerer Aufbereitungsverfahren wie Umkehrosmose, Ionenaustausch, Elektroentionisierung, UV-Photooxidation und Ultrafiltration. Details dazu finden Sie in unserem [kostenfreien Pure Labwater Guide](#).

Die richtige Wasserreinheit für Ihre Anwendung wählen

Manche Anwendungen reagieren empfindlich auf Kontaminationen und erfordern deshalb eine höhere Wasserreinheit. Sie sollten immer sichergehen, dass die Wasserqualität, die Sie nutzen, auch für Ihre Anwendung geeignet ist. Die Wasserreinheit reicht von Typ I⁺-Reinstwasser mit einem spezifischen Widerstand von 18,2 MΩ cm für hoch-

sensible Experimente bis hin zu Typ III-Primärgradwasser mit einem Widerstand von >0,05 MΩ cm zur Speisung von Spülmaschinen, Autoklaven und Wasseraufbereitungssystemen. Tabelle 1 zeigt die Reinheitsparameter. Den passenden Reinheitsgrad für Ihre Laboranwendungen können Sie unserer [Infografik \(englisch\)](#) entnehmen.

Reinheitsgrad	Spezifischer Widerstand (MΩ cm)	TOC (ppb)	Bakterien (KBE/ml)	Endotoxine (EU/ml)
Typ I ⁺	18,2	<5	<1	<0,03
Typ I	>18	<10	<10	<0,03
Typ II ⁺	>10	<50	<10	-
Typ II	>1	<50	<100	-
Typ III	>0,05	<200	<1000	-

Tabelle 1: Wasserreinheitsgrade

Eine Versorgung mit Wasser in konstanter Qualität ist für Labore unerlässlich. Dafür sollten Sie ein System wählen, das Ihr Speisewasser nicht nur aufbereitet, sondern den Gehalt an Verunreinigungen überwacht und auch in Nutzungspausen aufrechterhält (z.B. PURELAB® Chorus-Anlagen von ELGA). Nur so können Sie sich darauf verlassen, wirklich immer die nötige Wasserqualität zu erhalten. Sie sollten Ihr Wasseraufbereitungssystem

regelmäßig warten und die Bevorratung von aufbereitetem Laborwasser überprüfen. Manche Vorratsbehälter können mit der Zeit unerwünschte Stoffe an das Wasser abgeben und die Menge der im Wasser gelösten Gase kann sich verändern, wenn das Wasser längere Zeit ruht. Die Vorrattanks der Chorus-Systeme nutzen beispielsweise inerte Materialien, totraumoptimiertes Design und sterile Luftfilter, um dies zu vermeiden.

Fehlerbeseitigung bei empfindlichen Anwendungen

Wenn Sie die GLP-Richtlinien beachten, die passende Wasserreinheit für Ihre Anwendung verwenden und Ihr Wasseraufbereitungssystem regelmäßig warten, reduzieren Sie das Risiko für Verunreinigungen signifikant. Manche Anwendungen sind jedoch besonders empfindlich und erfordern eine erhöhte Achtsamkeit, dazu gehören Flüssigchromatographie, Zellkulturen und Molekularbiologie. Auf den folgenden Seiten zeigen wir, welche Verunreinigungen im Wasser bestimmte Fehler verursachen können und wie Sie diese Probleme bei der Durchführung Ihrer Experimente beseitigen und vermeiden können.

sigchromatographie, Zellkulturen und Molekularbiologie. Auf den folgenden Seiten zeigen wir, welche Verunreinigungen im Wasser bestimmte Fehler verursachen können und wie Sie diese Probleme bei der Durchführung Ihrer Experimente beseitigen und vermeiden können.



3. Molekularbiologie

Zur Molekularbiologie gehört die Synthese, Modulation und Untersuchung von Molekülen wie RNA, DNA und Proteinen. Vor der Analyse der Moleküle müssen diese mittels quantitativer PCR (qPCR), Endpunkt-PCR, In-vitro-Transkription, Ligation, Chromatin-Immunpräzipitation, Elektrophorese, Western Blot usw. extrahiert werden. Faktoren wie ein schlechtes Primerdesign, suboptimale Bedingungen beim Thermocycling und die falsche Verwendung des Puffers können die Ergebnisse jedoch verfälschen. Zusätzlich können durch eine schlechte Wasserqualität potentiell gefährliche Verunreinigungen wie

abbauende Enzyme, Ionen, $MgCl_2$ und Fremd-DNA eingeschleust werden. Mögliche Folgen sind erfolglose Extraktionen, nicht-spezifische oder fehlgeschlagene Vervielfältigungen und Schäden an den Geräten.

Obwohl es eine riesige Anzahl an Verfahren in der Molekularbiologie gibt, verlassen sich viele auf den Einsatz von Agarose- oder Polyacrylamidgel. Daher konzentrieren wir uns im Folgenden auf die Extraktion von Produkten oder Templates, die Vervielfältigung von RNA-/DNA-Produkten und die Analyse von Produkten mittels Gelelektrophorese oder qPCR.

Probleme und Ursachen

Problem 1: Template nicht extrahiert

Die meisten Experimente im Rahmen der Molekularbiologie drehen sich um RNA, DNA oder Proteinmoleküle. Bei der Extraktion aus Gewebe, Zellen und In-Vitro-Systemen wird

Wasser benötigt. Das verwendete Wasser muss frei von Verunreinigungen sein, um sicherzustellen, dass das Experiment ohne Probleme durchgeführt werden kann.

Ursache: Abbauende Enzyme

Zu den abbauenden Enzymen gehören Nucleasen (Ribonucleasen und Desoxyribonucleasen) und Proteasen, die RNA, DNA bzw. Proteine zerstören. Sind diese Enzyme im verwendeten Wasser enthalten, kann der

Extraktionsprozess behindert und das Template zerstört werden, insbesondere wenn das Wasser als Eluent oder als Teil des Resuspensionspuffers genutzt wird.

Problem 2: Probleme bei der Gelelektrophorese

Vor der Durchführung von weiterführenden Experimenten wie der Sequenzierung oder Klonierung werden PCR-Produkte üblicherweise auf ein Gel aufgebracht. Beim Wes-

tern Blot werden auch Proteine oft auf ein Gel aufgebracht, bevor sie auf eine Membran für die Antikörperfärbung übertragen werden.

Bei der Gelelektrophorese wird an ein mit einem Puffer gefülltes Behältnis elektrischer Strom angelegt, um die negativ geladenen Teilchen dazu zu bringen, sich in Richtung der positiv geladenen Elektrode zu bewegen und die Teilchen so auf Grundlage der Mole-

kulargröße zu trennen. Lauf- und Transferpuffer werden mit Wasser zubereitet, das unbedingt frei von Verunreinigungen sein muss, beispielsweise von Ionen, die den Elektrophoresevorgang in dem Gelbehältnis unterbrechen könnten.

Ursache: Ionen

Ionen finden sich oft in Wasser von geringer Reinheit. Sie können den elektrischen Fluss unterbrechen. Findet sich eine hohe Ionenkonzentration in einem Puffer, kann das Gel

nicht ordentlich laufen. Die Folgen können ein Trockenlaufen der Elektrophoresekammer und falsche Ergebnisse sein.

Problem 3: Keine Vervielfältigung bei der PCR

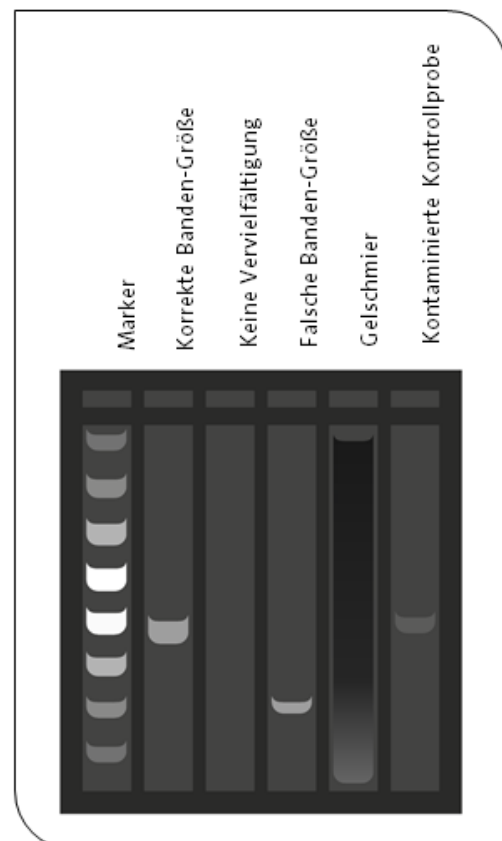
Für eine Analyse muss die DNA und RNA oftmals mit Hilfe der PCR und reversen Transkription vervielfältigt werden. Für eine erfolgreiche Vervielfältigung sind ein intaktes Template und Polymerase-Enzyme wie bei-

spielsweise *Taq* notwendig. Für die Zubereitung des Reaktionspuffers sollte nur Wasser verwendet werden, das frei von Verunreinigungen ist.

Ursache: Abbauende Enzyme

Enthält das für den Reaktionsmix verwendete Wasser Enzyme wie Nukleasen, bauen diese das Template ab. Darüber hinaus können Proteasen die Polymerase zerstören und somit die Möglichkeit zur Vervielfältigung des Templates (Grafik 9).

Grafik 9: Darstellung eines Agarose-Gels mit verschiedenen Fehlerarten, die bei der PCR auftreten können, wenn Wasser von schlechter Qualität verwendet wurde.



Problem 4: Falsche Produktgröße und Gelschmier bei der PCR

Fehler bei der Vervielfältigung sind lästig und können die weiteren Forschungsschritte negativ beeinflussen. Oftmals treten sie in Form von Primer-Dimeren auf und resultieren aus einem schlechten Versuchsplan. Im

Folgenden erörtern wir, wie Wasserverunreinigungen wie $MgCl_2$ und Nukleasen zu falschen Größen der Banden und zu Gelschmier führen können (siehe Grafik 9).

Ursache: Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)

$MgCl_2$ ist ein wichtiger Cofaktor für die Polymerasefunktion. Obwohl $MgCl_2$ die Funktion der Polymerasen in einer PCR unterstützen kann, geht dies oftmals auf Kosten der Genauigkeit. Gelangt über unreines Wasser

zu viel $MgCl_2$ in den Reaktionsmix, kann dies zu unspezifischen Vervielfältigungen führen, was sich als Schmier oder durch unerwartete Produkte im Gel zeigt.

Ursache: Nukleasen

Ein Abbau des Templates kann in einigen Fällen zu der Vervielfältigung von fragmentierter DNA führen. In anderen Fällen wird das Produkt zwar generiert, beginnt sich

dann aber abzubauen. In beiden Fällen erscheint ein Gelschmier bei der Gelelektrophorese.

Problem 5: Keine Verunreinigung der Templatekontrolle bei der PCR

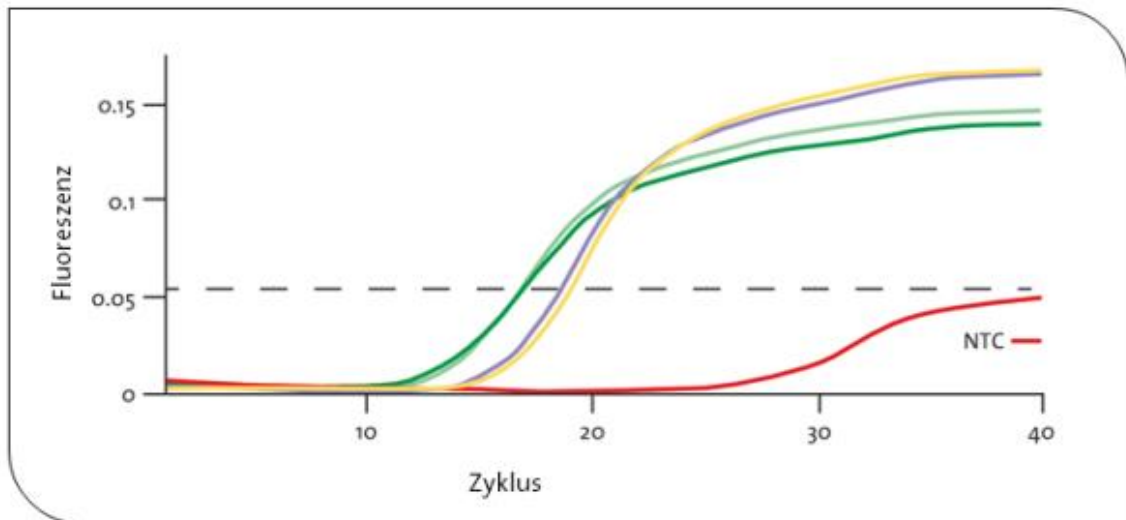
Gut geplante Experimente beinhalten Negativkontrollen oder „Nullproben“. Damit wird sichergestellt, dass die Ergebnisse gültig sind und keine ungewollte Vervielfältigung durch unerwartete Faktoren wie verunreinigende DNA stattgefunden hat. Standardmäßige Kontrollen beinhalten kein Template, dafür wird im Reaktionsmix oftmals die Probe (oder das Template) durch Wasser ersetzt. Probleme können dann entstehen, wenn das

verwendete Wasser mit Fremd-DNA verunreinigt ist, wie beispielsweise von Bakterien. Nach ausreichenden Zyklen wird diese vervielfältigt und ist sowohl in den Proben als auch in den Kontrollen sichtbar (siehe Grafiken 9 und 10). Es kann dabei auch zu einer Konkurrenz zum gewünschten Template kommen, wodurch die Genauigkeit der Daten und die Effizienz des Experiments an sich negativ beeinflusst werden.

Fehlerbeseitigung

Anwendungen im Bereich Molekularbiologie reagieren sensibel auf Wasserverunreinigungen. Daher sollte im Idealfall nur steriles, Nuklease-freies und mit Diethyldicarbonat (DEPC) behandeltes Reinstwasser des Typs I⁺

für alle Anwendungen verwendet werden, in denen es um RNA, DNA und Proteine geht. Gleiches gilt auch für die Zubereitung von Reaktionspuffern, Nullproben und Template-Elutionen.



Grafik 10: Darstellung einer typischen qPCR mit Darstellung der Vervielfältigung der kontaminierten Nullprobe (NTC, rot).

Zur Erhaltung einer Probe müssen alle verwendeten Lösungen einen geeigneten pH-Wert aufweisen.

Nachdem Sie sichergestellt haben, dass Sie nur Wasser in der höchsten Qualität verwenden, sollten Sie Ihr Wasser aliquotieren, dass Sie nicht immer wieder verunreinigtes Wasser verwenden. Das Risiko einer Verunreinigung lässt sich des Weiteren durch den Einsatz von Pipettenspitzen mit Filtern deutlich senken, da diese als physikalische Barriere

zu Verunreinigungen aus der Luft dienen. Eine Kreuzkontamination lässt sich auch durch das Arbeiten unter einer Werkbank oder in einem speziellen Bereich vermeiden.

Für die Zubereitung des Elektrophorese-puffers sollten Sie aufbereitetes Wasser des Typs I verwenden, da dieses die passende Qualität aufweist, um sicherzustellen, dass der elektrische Fluss im Gefäß nicht gestört wird und das Gel ordnungsgemäß laufen kann.

Checkliste Molekularbiologie

- ✓ Verwenden Sie mit Diethyl-dicarbonat (DEPC) behandeltes Reinstwasser des Typs I⁺ für die PCR & das Template.
- ✓ Verwenden Sie für die Elektrophorese aufbereitetes Wasser des Typs I.
- ✓ Verwenden Sie Pipettenspitzen mit Filter.
- ✓ Arbeiten Sie in speziellen Bereichen oder unter einer Werkbank.
- ✓ Verwenden Sie frisch aufbereitetes Wasser anstelle von abgefülltem / gelagertem Wasser.
- ✓ Wechseln Sie Verbrauchsmaterialien in den empfohlenen Intervallen.

Schlussfolgerung

Wie bereits erörtert, können Wasserverunreinigungen Ihre Arbeit beeinflussen, insbesondere wenn es um empfindliche Anwendungen geht. Bei der Auslegung und Durchführung Ihrer Experimente sollten Sie deshalb stets auf eine optimale Wasserreinheit achten. Sie sollten die regelmäßige Wartung ihres Wasseraufbereitungssystems

sicherstellen, die eingesetzten Reagenzien und deren Verwendung dokumentieren und den Reinheitsgrad des Wassers sowie den turnusmäßigen Wechsel der Verbrauchsmaterialien kontrollieren. Auf diese Weise können Sie sicher sein, dass Sie korrekte Daten generieren.

Wie Sie ein geeignetes Aufbereitungssystem auswählen

Sie möchten künftig anstelle von Flaschenwasser frisch erzeugtes Reinstwasser verwenden oder Ihre alte Wasseraufbereitungsanlage ersetzen? Unser kostenfreier [Leitfaden mit Checkliste](#) erläutert die Kriterien, die Sie bei der Auswahl einer optimalen Anlage für Ihre spezifischen Anforderungen beachten sollten.



Ein System, das zu Ihren Bedürfnissen passt



ELGA bietet unterschiedliche Systeme zur Laborwasser-Aufbereitung, die Ihnen zuverlässig den jeweils benötigten Reinheitsgrad liefern. Die Anlagen sind platzsparend, besonders wirtschaftlich im Betrieb und können aus verschiedenen Modulen flexibel auf Ihre aktuellen oder später auf künftige Bedürfnisse zugeschnitten werden. Mit unserem **Anlagen-Konfigurator** können Sie sich ganz einfach ein für Sie ideales System virtuell zusammenstellen. Ausprobieren unter:

<http://buildyourchorus.elgalabwater.com/de>

Kurzanleitung

Problem	Mögliche Ursachen im Wasser	Lösungen
Molekularbiologie: DNA-/RNA-/Protein-Extraktion für weitere Anwendungen		
Probleme bei der Elektrophorese (z.B. Trockenlaufen der Kammer, Gel läuft nicht ordnungsgemäß)	<ul style="list-style-type: none"> • Ionen 	<ul style="list-style-type: none"> • Verwenden Sie für die Laufpuffer Reinstwasser des Typs I.
Template nicht extrahiert	<ul style="list-style-type: none"> • Nukleasen und Proteasen bauen das Template ab 	<ul style="list-style-type: none"> • Verwenden Sie steriles, mit Diethylcarbonat (DEPC) behandeltes Reinstwasser des Typs I*. • Prüfen Sie den pH-Wert des Resuspensionspuffers. • Verwenden Sie Wasseraliquote. • Verwenden Sie Pipettenspitzen mit Filter. • Arbeiten Sie in speziellen Bereichen oder unter einer Werkbank.
Keine Vervielfältigung Gelschmier Falsche Produktgröße	<ul style="list-style-type: none"> • Proteasen bauen Polymerasen oder das Zielprotein ab • Nukleasen bauen DNA/RNA ab • MgCl₂ wirkt sich auf die Genauigkeit aus 	
Verunreinigung der „Nullprobe“ für die PCR-Reaktion	<ul style="list-style-type: none"> • Vorhandensein von Fremd-DNA 	

** Bitte beachten Sie: Diese Tabelle zeigt Fehler in Experimenten, die durch Verunreinigungen im Wasser entstehen können. Diese Probleme können jedoch nicht nur durch Wasser verursacht werden, sondern auch aus anderen Quellen resultieren.*

