

Recherche de contaminants

Analyse haute sensibilité des cônes RAININ

De nombreux facteurs peuvent nuire aux procédures de biologie moléculaire, mais les contaminants les plus importants sont l'ADN, la DNase et la RNase. Pour s'assurer que les réactions courantes telles que la PCR et la qPCR ne sont pas affectées par ces facteurs, RAININ effectue régulièrement plusieurs tests sur chaque lot de cônes produit.

Matériel et méthodes

Pour l'ensemble des tests suivants, un éluat de cône est préparé. 10 cônes de chaque lot sont mis en contact avec 1 000 µL d'eau utilisée en biologie moléculaire. Le volume maximal du cône est aspiré, puis dosé 2 fois pour s'assurer qu'en cas de contamination, cette dernière serait évacuée.

Détection d'ADN : l'acide désoxyribonucléique (ADN) fait partie de la plupart des applications de biologie moléculaire et tout ADN exogène peut modifier considérablement le résultat expérimental. La PCR quantitative (qPCR) a été appliquée selon la configuration suivante : un système ABI 7700 et le Master Mix Power SYBR Green (ABI) ont été utilisés pour des réactions de 25 µL contenant les contrôles négatifs, différentes concentrations d'ADN (humain ou bactérien) et un éluat de cône. La concentration d'amorce finale est de 250 nM par réaction. Les jeux d'amorces humaines et bactériennes des séquences conservées suivants ont été utilisés :

Amorces humaines :

Sens : 5'-AAGTGTCAAGGCCAGGAGTTTG

Antisens : 5'-TCCTTCAGCTGGGCTCTCTTAC

Amorces bactériennes :

Sens : 5'-CCAGCAGCCGCGTAAT

Antisens : 5'-TGCGCTTACGCCAGTAAT

Toutes les réactions ont été effectuées en trois exemplaires. Les valeurs Ct ont été analysées pour s'assurer que l'éluat de cône RAININ était inférieur à 1 pg.

Détection de DNase : La désoxyribonucléase (DNase) est un enzyme qui dégrade l'ADN. 10 µL de contrôle négatif, 10 µL d'échantillon exposé aux cônes et 10 µL d'un standard de 1×10^{-7} unités Kunitz de DNase I sont incubés avec une solution tampon et d'ADN pendant 1 heure à 37 °C. Les échantillons sont séparés par électrophorèse sur gel d'aragose 0,8 % et observés par transillumination aux UV après coloration au bromure d'éthidium. Les résultats sont confirmés par l'imagerie : l'ADN exposé à l'éluat du cône n'est pas altéré si on le compare aux contrôles négatifs et positifs.

Détection de RNase : La ribonucléase (RNase) est un enzyme robuste qui dégrade facilement l'ARN. Elle constitue l'un des contaminants potentiels les plus dangereux pour les procédures qRT-PCR. 10 µL de contrôle négatif, 10 µL d'échantillon exposé aux cônes et 10 µL d'un standard de 1×10^{-9} unités Kunitz de RNase A sont incubés avec une solution tampon et d'ARN pendant 1 heure à 37 °C. Les échantillons sont séparés par électrophorèse sur gel d'aragose 1,0 % et observés par transillumination aux UV après coloration au bromure d'éthidium. Les résultats sont confirmés par l'imagerie : l'ADN exposé à l'éluat du cône n'est pas altéré si on le compare aux contrôles négatifs et positifs.

Résultats

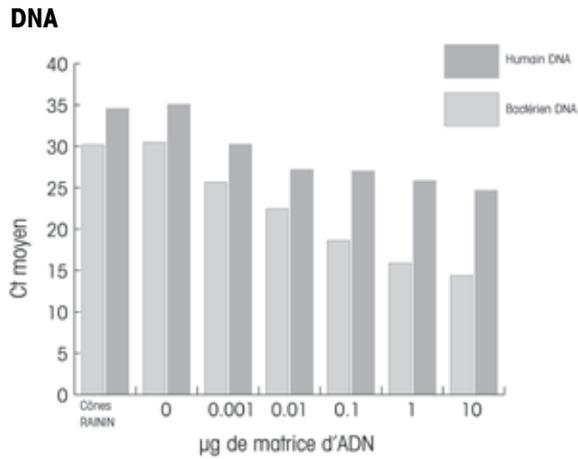


Figure 1. Données qPCR illustrant la courbe standard et les échantillons test. Courbe standard représentée de zéro à 10 µg. Les échantillons test RAININ montrent des niveaux d'ADN inférieurs à 1 µg, indiquant un nombre de copie de contamination de la matrice d'ADN humain inférieur à 1.

RNase

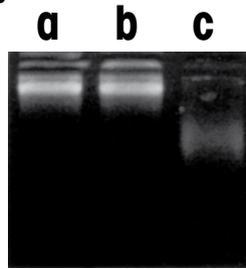


Figure 2.
a : Échantillons produit
b : ARN type non exposé agissant comme contrôle négatif
c : ARN type exposé à la RNase agissant comme contrôle positif

DNase

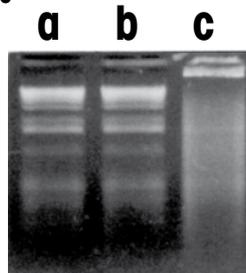


Figure 3.
a : Échantillons produit
b : ADN type non exposé agissant comme contrôle négatif
c : ADN type exposé à la DNase agissant comme contrôle positif

Conclusions

La qPCR est une technologie de détection et d'amplification puissante qui peut être utilisée pour l'analyse d'extrême sensibilité d'échantillons génomiques. Dans cette série d'expériences, RAININ a démontré l'efficacité de l'utilisation de la qPCR comme outil de détection quantitatif pour prouver que les cônes

fabriqués et emballés dans son usine sont ultra-propres. Les résultats montrent que RAININ peut certifier les cônes BioClean à un nombre de copie de la matrice d'ADN humain inférieur à 1. De plus, les essais sur gel les plus sensibles révèlent que les cônes RAININ sont exempts de contamination par la RNase et la DNase.



Certificat de qualité ISO 9001
Certificat d'environnement ISO 14001

www.mt.com/rainin

Pour plus d'informations



Sous réserve de modifications techniques
© 03/2009 Mettler-Toledo AG
Global MarCom Greifensee