

Validation du Xpose

F. Martins & J-J. Maoret

get-tq@genotoul.fr



Ces tests ont été effectués pour valider le Xpose dans des conditions de contaminations par les composants des tampons les plus utilisés (Tris, EDTA, Ethanol), ceux des protocoles d'extraction (Qiazol) et par l'ADN génomique. Les échantillons contaminés ont été passés également sur notre NanoDrop 2000 afin de les comparer.

Il existe 2 type de lames (slides) sur l'Xpose avec une large gamme de linéarité :

- slide-40 : de 0,03 à 40 unités de DO (ADN : 1,5-2000ng/μl, ARN : 1,2-1600ng/μl et protéines 0,03-40μg/μl)
- slide-200 : de 0,03 à 200 unités de DO (ADN : 1,5-10000ng/μl, ARN : 1,2-8000ng/μl et protéines 0,03-200μg/μl)

Xpose slide-40



1 micro-cuvette : 0.5 mm de trajet optique
gamme : 0.03 à 40 unités de DO (10mm)

Xpose slide-200



2 micro-cuvette : 0.1 + 0.7 mm de trajet optique
gamme : 0.03 à 200 unités de DO (10mm)



Le spectre UV-Visible obtenu sur le Xpose (courbe blanche) est la résultante des 4 profils spécifiques :

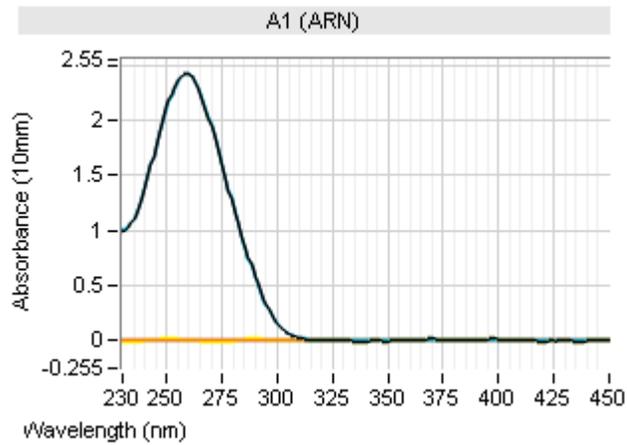
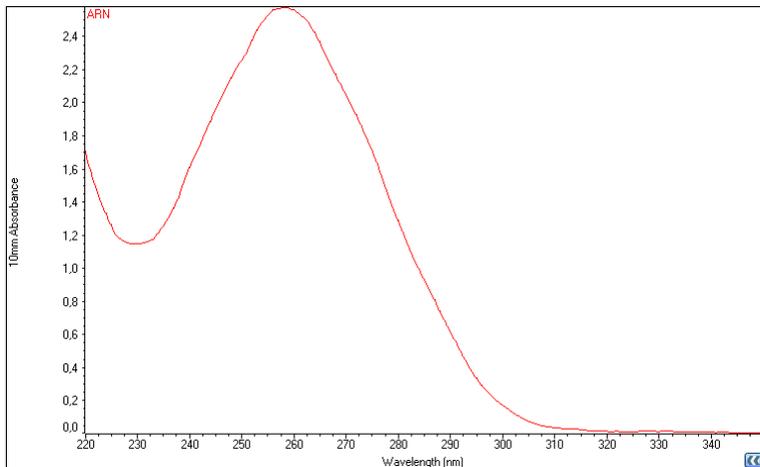
- En bleu, la molécule d'intérêt (ARN, ADN ou protéines).
- En orange, les impuretés : molécules qui absorbent à la même longueur d'onde que la molécule d'intérêt : autres nucléotides, thiocyanates, EDTA, phénol, citrate, azide.
- En gris, le bruit de fond qui peut correspondre à la turbidité de l'échantillon, à la présence de billes, des résidus d'hémoglobine.
- En jaune, les résidus qui correspondent à la partie du spectre non identifié et qui est noté en % du spectre blanc.



La courbe blanche est la somme de la bleue + orange + jaune.
Le bruit de fond en gris est soustrait de la mesure avant l'établissement des autres profils.

L'ARN utilisé pour ces tests est un ARN commercial BioRad extrait à partir de foies de souris. Sa concentration initiale était de 500ng/μl mais pour les besoins de la manip nous l'avons utilisé à 100ng/μl.

Ci-dessous le spectre de l'ARN au NanoDrop (à gauche, 220-350nm) et à l'Xpose (à droite, 230-450nm).



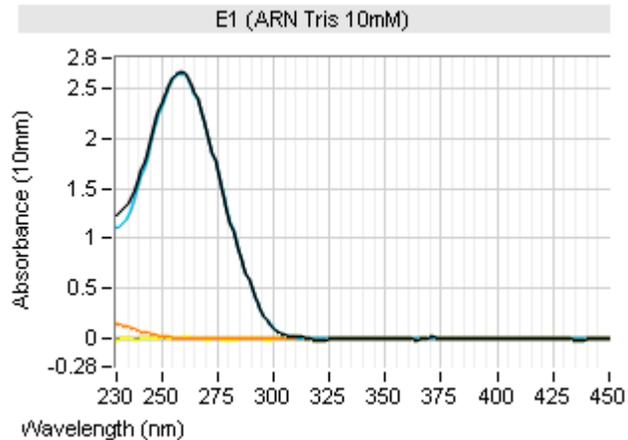
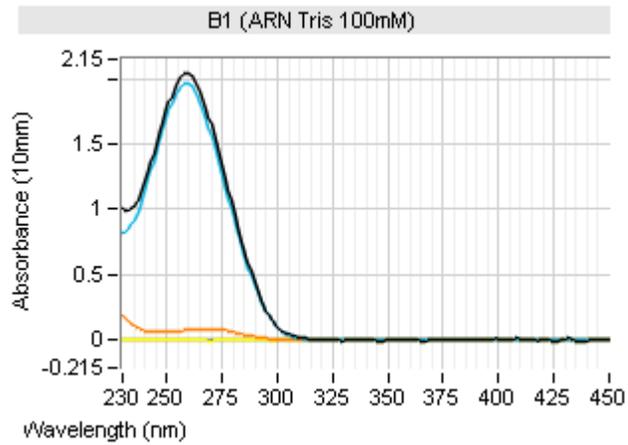
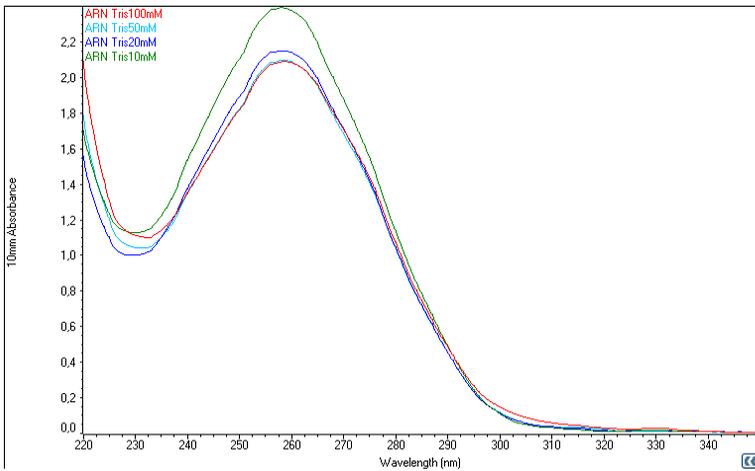
Sample name	RNA (ng/ul)	Nucleic acids (ng/ul)	Impurities (A260)	Background (A260)	Residue (%)	A260	A260/A280	A260/A230
ARN	102,3					2,558	1,99	2,24
ARN	96.6	96.6	0.00	0.00	0.8	2.42	1.99	2.45

Le tableau ci-dessus montre les résultats équivalent issus des 2 machines : le NanoDrop et le Xpose (surligné en jaune).

Nous avons tout d'abord regardé l'effet de plusieurs tampons les plus fréquemment utilisés sur le spectre d'absorbance des ARNs.

Effet de la contamination par le Tris

Nous avons établi une gamme de [C] de Tris de 10mM (concentration du Tris dans le TE) jusqu'à 100mM.

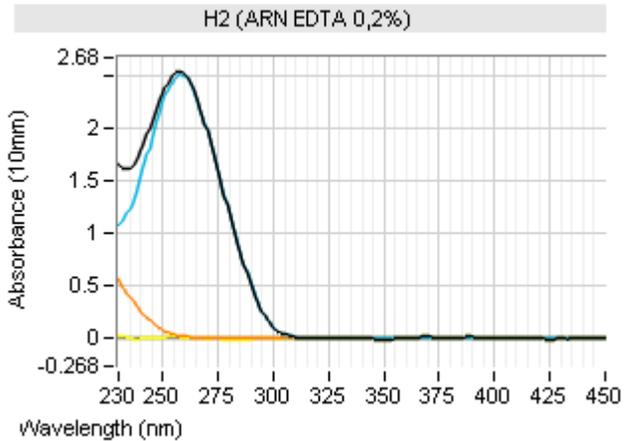
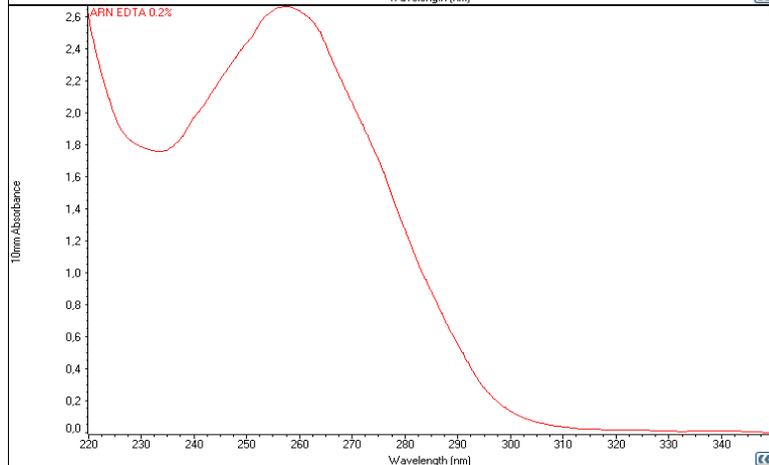
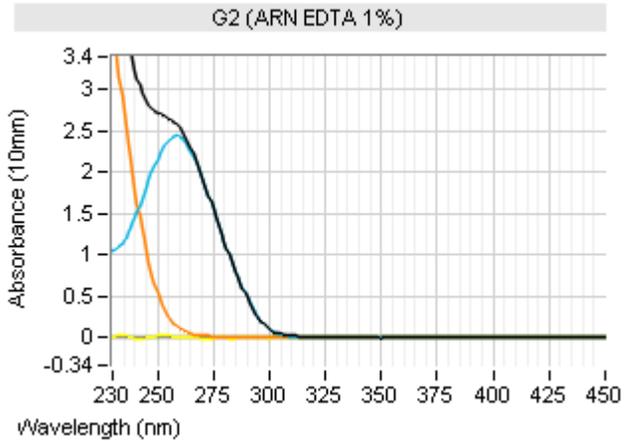
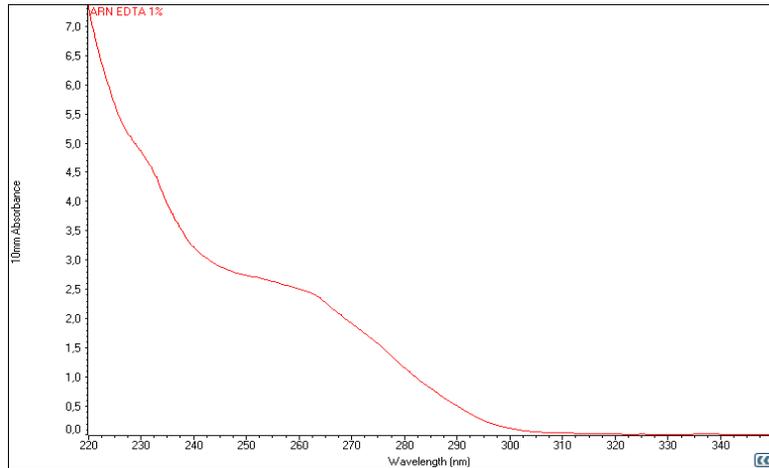


Sample name	RNA (ng/ul)	Nucleic acids (ng/ul)	Impurities (A260)	Background (A260)	Residue (%)	A260	A260/A280	A260/A230
ARN Tris100mM	83,3					2,083	1,95	1,88
ARN Tris100mM	78.3	80.3	0.08	0.00	0.5	2.04	2.03	2.04
ARN Tris50mM	83,5					2,088	2,01	2,01
ARN Tris50mM	84.1	86.7	0.07	0.00	0.5	2.18	2.08	2.13
ARN Tris20mM	85,7					2,142	2,05	2,15
ARN Tris20mM	85.6	85.6	0.00	0.00	0.7	2.15	2.14	2.21
ARN Tris10mM	95,1					2,378	2,1	2,12
ARN Tris10mM	105.6	105.6	0.01	0.00	0.8	2.66	2.17	2.15

Tout ceci montre que la contamination par le Tris même très importante n'influence pas le spectre d'absorbance de l'ARN significativement.

Effet de la contamination par l'EDTA

Nous nous sommes placé à une concentration de 0,2% qui correspond à 1mM (concentration d'EDTA dans le TE) ainsi qu'une 2^{ème} mesure à 1% soit 5mM.

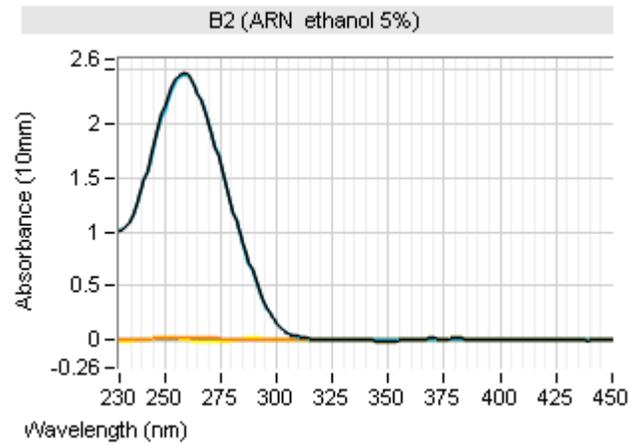
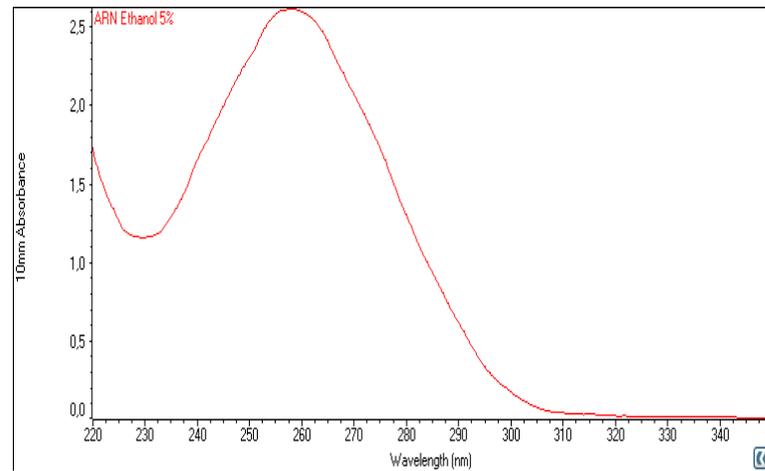


Sample name	RNA (ng/ul)	Nucleic acids (ng/ul)	Impurities (A260)	Background (A260)	Residue (%)	A260	A260/A280	A260/A230
ARN EDTA 1%	99,7					2,491	2,17	0,51
ARN EDTA 1%	97.3	97.3	0.11	0.00	0.7	2.54	2.19	0.52
ARN EDTA 0.2%	105,4					2,636	2,08	1,48
ARN EDTA 0,2%	100.3	100.3	0.02	0.00	0.6	2.52	2.11	1.52

L'EDTA a un effet inhibiteur sur les réactions MgCl₂ dépendante ce qui est le cas de la RT et la Q-PCR.

L'EDTA n'a pas d'effet sur la quantification de l'ARN mais sur le ratio A260/A230.

Effet de la contamination par l'Ethanol

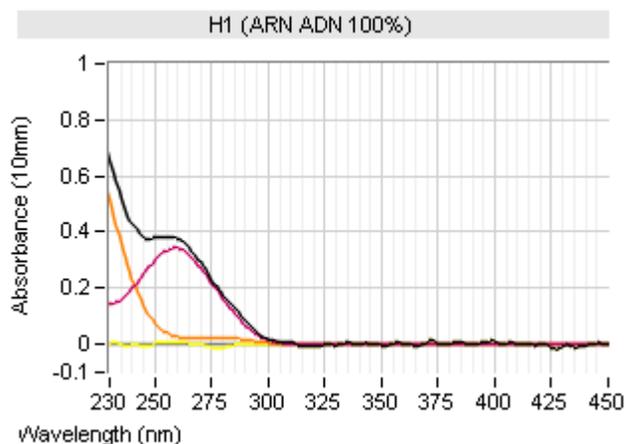
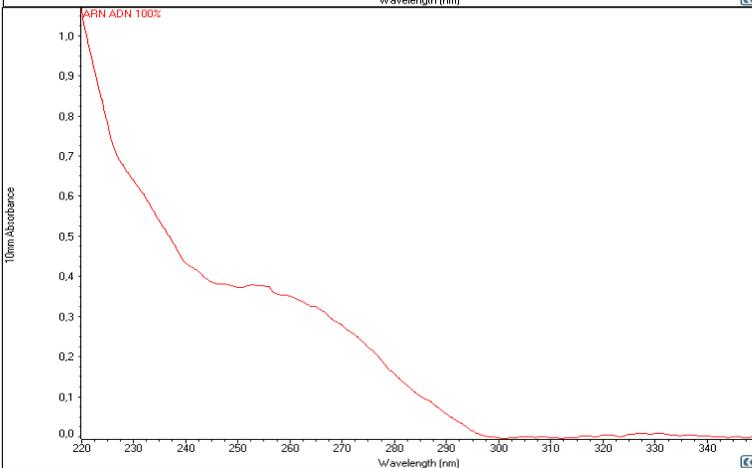
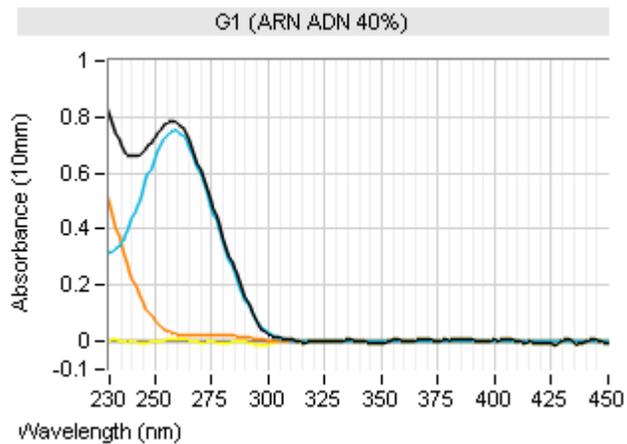
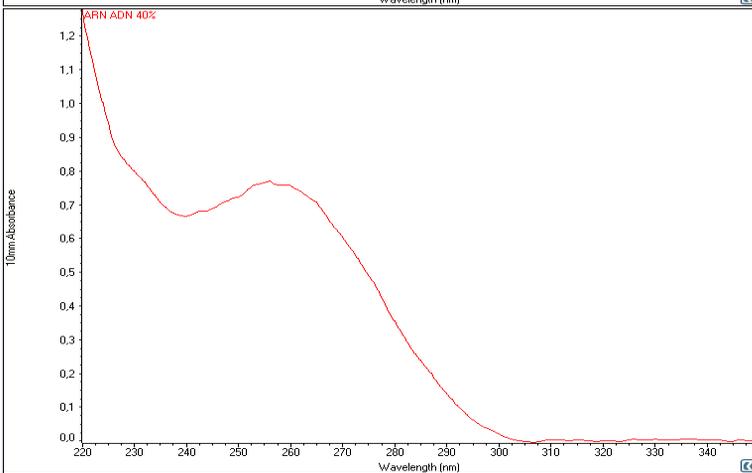
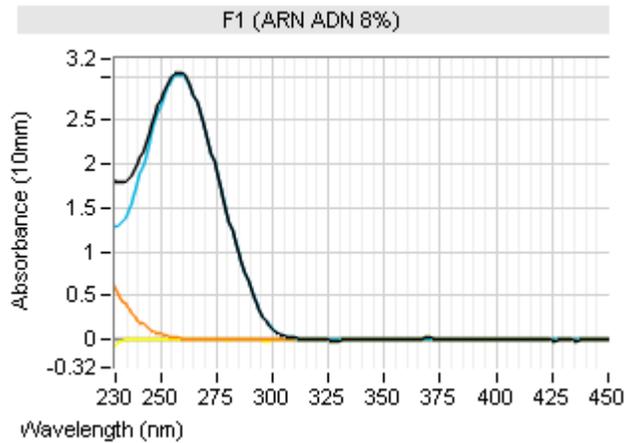
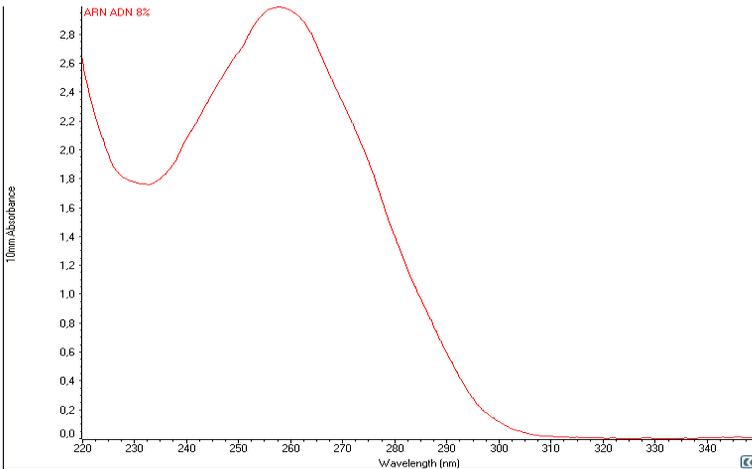


Sample name	RNA (ng/ul)	Nucleic acids (ng/ul)	Impurities (A260)	Background (A260)	Residue (%)	A260	A260/A280	A260/A230
ARN Ethanol 5%	103,8					2,596	2	2,26
ARN Ethanol 5%	97.9	98.5	0.02	0.00	0.9	2.46	1.97	2.45

Nous avons dilué notre ARN dans de l'éthanol à 5% et nous n'avons pas vu d'influence de celui-ci sur le spectre d'absorbance de l'ARN.

Effet de la contamination par de l'ADN génomique

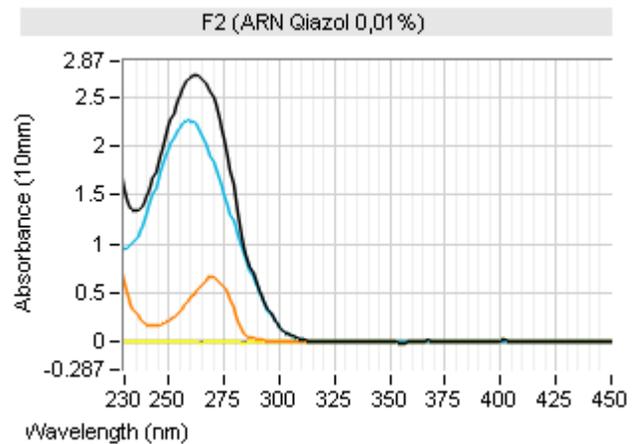
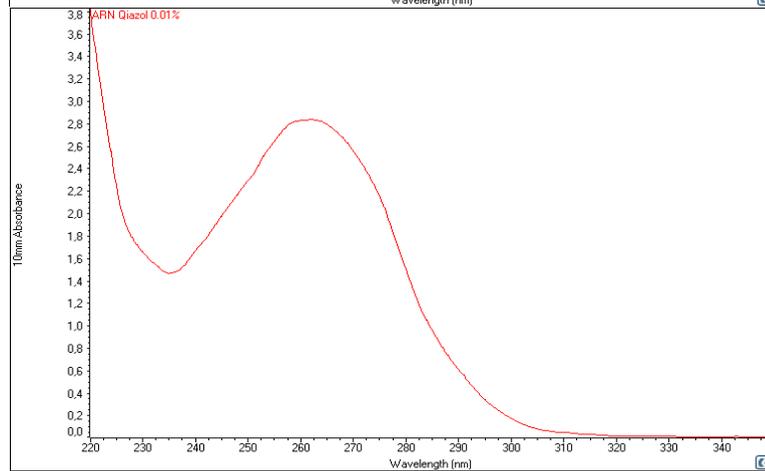
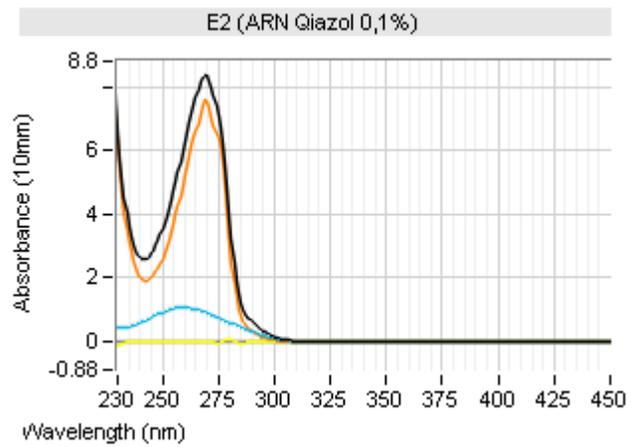
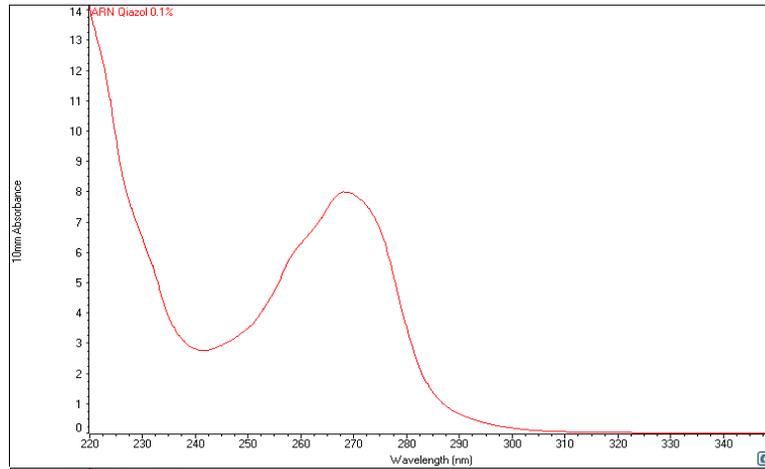
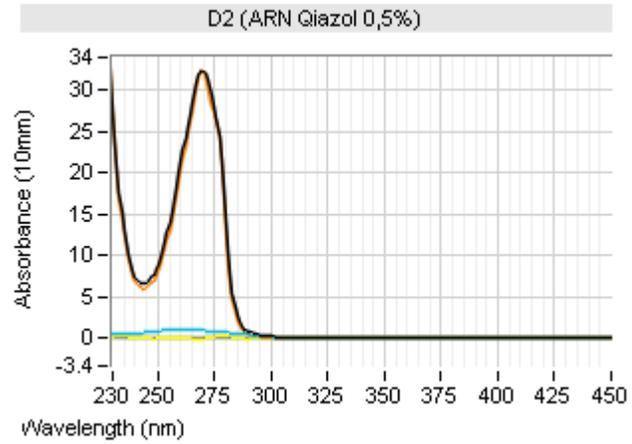
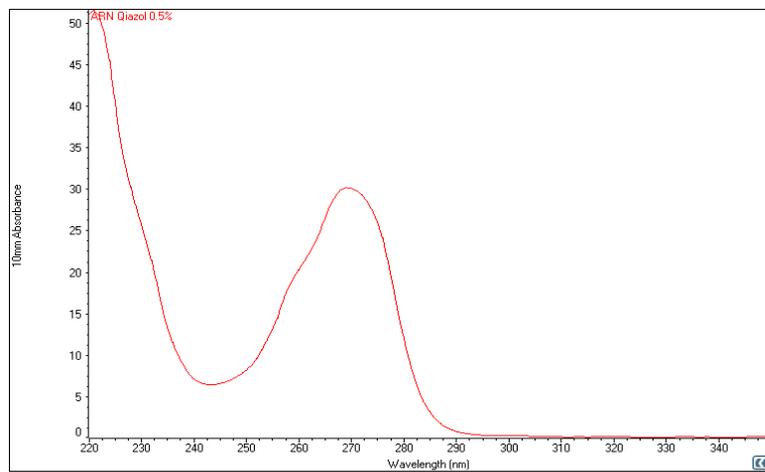
Pour ce test, nous avons utilisé une concentration fixe d'ADN génomique à 8ng/μl et avons fait varier la concentration d'ARN. 8% = 100ng/μl d'ARN; 40% = 20ng/μl d'ARN et 100% = 8ng/μl d'ARN.



Sample name	RNA (ng/ul)	Nucleic acids (ng/ul)	Impurities (A260)	Background (A260)	Residue (%)	A260	A260/A280	A260/A230
ARN ADN 8%	118,6					2,964	2,11	1,67
ARN ADN 8%	120.6	120.6	0.01	0.00	0.4	3.03	2.13	1.69
ARN ADN 40%	30,2					0,754	2,14	0,94
ARN ADN 40%	30.0	30.0	0.02	0.00	1.4	0.78	2.11	0.97
ARN ADN 100%	14					0,349	2,25	0,55
ARN ADN 100%	13.7	13.7	0.03	0.00	2.6	0.38	2.17	0.57

Dans le cas de contamination par l'ADN génomique, le Xpose n'arrive pas à faire la différence entre l'ADN et l'ARN et comme le NanoDrop nous donne une concentration globale en acides nucléiques.

Effet de la contamination par du Qiazol



Sample name	RNA (ng/ul)	Nucleic acids (ng/ul)	Impurities (A260)	Background (A260)	Residue (%)	A260	A260/A280	A260/A230
ARN Qiazol 0.5%	807,1					20,177	1,67	0,78
ARN Qiazol 0,5%	39.7	98.7	20.19	0.00	1.0	21.30	1.48	0.78
ARN Qiazol 0.1%	250					6,249	1,77	0,96
ARN Qiazol 0,1%	42.8	95.9	5.23	0.00	0.7	6.30	1.57	0.97
ARN Qiazol 0.01%	112,9					2,823	1,88	1,71
ARN Qiazol 0,01%	90.3	94.3	0.45	0.00	0.5	2.71	1.85	1.76

Ceci montre l'effet dramatique du Qiazol sur le spectre d'absorbance de l'ARN. Le Qiazol est composé d'isothiocyanate de Guanidine et de phénol. L'isothiocyanate de Guanidine a un très gros effet sur le ratio A260/A230, qui en dessous de 1 signifie que sa concentration peut inhiber les réactions enzymatiques.

Le Phénol a quand à lui un effet sur la quantification d'ARN. A noter qu'à 0.5 % de contamination, la concentration mesurée au NanoDrop est 8 fois supérieure à la valeur attendue de 100 ng/μl.

Ceci est du au pic d'absorption du phénol à 270 nm.

On peut noter également que le phénol influence du coup le ratio A260/A280.

Le Xpose arrive a sortir son épingle du jeu mais au contraire du NanoDrop qui ne voit rien, sous-estime la concentration réelle en ARN pour 0,1 et 0,5% de contamination.

Cas partuclier :



Dans certains cas, le Xpose n'arrive pas à discriminer les acides nucléiques d'intérêt des autres acides nucléiques :

- 1- quand l'échantillon a une DO à 260nm inférieure à 0,5
- 2- quand la quantité de résidu est supérieure à 2,5% du à un composant inconnu.

Dans ces 2 cas la quantité totale d'acides nucléiques est alors représentée en rose et la concentration est calculée en multipliant l'A260 par le factor de concentration de l'acide nucléique recherché, 40 pour l'ARN et 50 pour l'ADNdb.

L'ensemble de ces résultats montre clairement que le Xpose :

- donne les mêmes résultats que le NanoDrop pour le dosage des acides nucléiques propres/non contaminés
- permet dans le cas de contaminations par l'EDTA ou le Qiazol (Isothiocyanate de Guanidine + Phénol) de soustraire le spectre non spécifique et de mieux évaluer la quantité réelle en acides nucléiques par rapport au NanoDrop
- permet de doser de 1 à 16 échantillons en simultané, en 1 minute et sans risque de contamination croisée
- permet de préparer les slides jusqu'à 2 heures avant le passage sur la machine sans évaporation
- nous permet de répartir les échantillons rapidement sur les slides grâce à une pipette 8 canaux en micro-volumes (2µl)
- permet le dosage des échantillons dans une large gamme de linéarité (0.03-200 OD soit 1.5 à 10 000 ng/µl pour l'ADNdb)
- permet la quantification spécifique des ADN, ARN et protéines sans utilisation de kits
- permet d'exporter les résultats sur clé USB en plusieurs formats dont le HTML (tableau de résultats + courbes)

De plus le Xpose ne nécessite pas de maintenance, il est moins sensible aux dérèglements du trajet optique car ce sont les slides qui le détermine.

Contact : get-tq@genotoul.fr