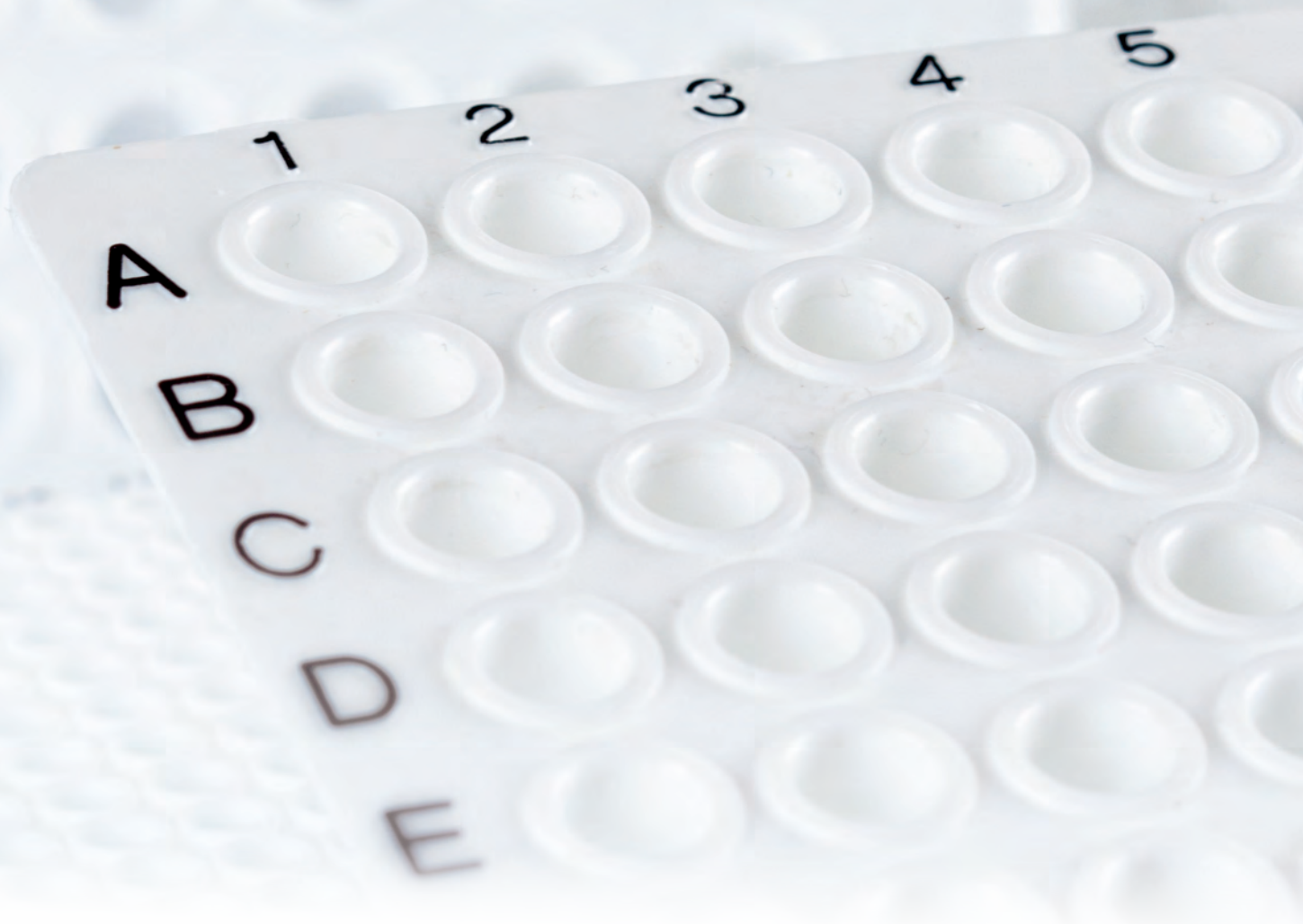


Le conseil du mois

Amélioration de la précision de la PCR en temps réel avec des tubes de PCR blancs

Amélioration de la reproductibilité - Optimisation de la sensibilité -
Prévention des réactions croisées



Les applications reposant sur la fluorescence, comme la PCR en temps réel (qPCR), profitent notamment des propriétés de réflexion fortement améliorées des consommables de PCR blancs, notamment en cas d'utilisation de petits volumes. Mais aujourd'hui encore, la réalisation de qPCR requiert souvent l'utilisation de consommables transparents. Découvrez ici comment améliorer vos qPCR en toute simplicité.

Dans quelle mesure l'utilisation de tubes de PCR blancs influence-t-elle la reproductibilité ?

La réflexion maximale de la fluorescence des tubes blancs permet d'une part de prévenir le passage de la lumière fluorescente à travers la paroi des puits et d'autre part de maintenir la quantité de lumière fluorescente atteignant le détecteur à un degré plus constant que les produits transparents. Vous obtenez ainsi une réduction de la diffraction dans le cadre de la détection de doubles ou de triplicatas ainsi que de la répétition d'expériences.



Comparaison de plaques PCR transparentes et blanches

Pourquoi peut-on obtenir une amélioration du rapport signal / arrière-plan ?

Un rapport signal / arrière-plan amélioré est obtenu dans le cadre de la détection dans des tubes de PCR blancs en raison du degré de fluorescence nettement supérieur des consommables de PCR blancs et de l'effet d'arrière-plan stable permis par le fluorophore utilisé.

Est-il possible de prévenir les réactivités croisées entre les différents puits ?

Dans le cadre de l'utilisation de puits transparents, la diffraction de la lumière de fluorescence est susceptible d'entraîner une détection de la fluorescence dans les puits voisins. La coloration intégrale et opaque des consommables de PCR blancs permet d'empêcher toute détection de signal de fluorescence provenant des puits voisins par les détecteurs de fluorescence du thermocycleur.

Dans quelle mesure la sensibilité de la PCR évolue-t-elle grâce à l'utilisation de tubes de PCR blancs ?

Nous tenons à répondre à cette question au moyen d'une expérience de qPCR comparative. Le résultat d'essai reproduit à la Fig. 1 indique tout d'abord que l'intensité de fluorescence mesurée dans les tubes blancs est nettement plus importante que dans les tubes transparents à quantité de modèles égale. Le seuil des barrettes de PCR transparentes et blanches de la Fig. 1 a été automatiquement calculé par le thermocycleur indépendamment l'une de l'autre. Afin de détecter les 1000 molécules-modèles dans les puits transparents, une valeur Cq moyenne (n = 8) de $24,87 \pm 0,08$ et une valeur Cq de $23,40 \pm 0,07$ ont été déterminées pour les tubes blancs. Cela signifie que la détection a lieu plus tôt dans les tubes blancs. Il s'agit notamment d'un avantage lorsque seules de faibles quantités d'échantillon sont disponibles. L'utilisation de consommables blancs permet encore d'obtenir une détection réussie lorsque les consommables transparents ne permettent plus aucune série de PCR pertinente.

Comparaison du niveau de fluorescence de puits blancs et transparents

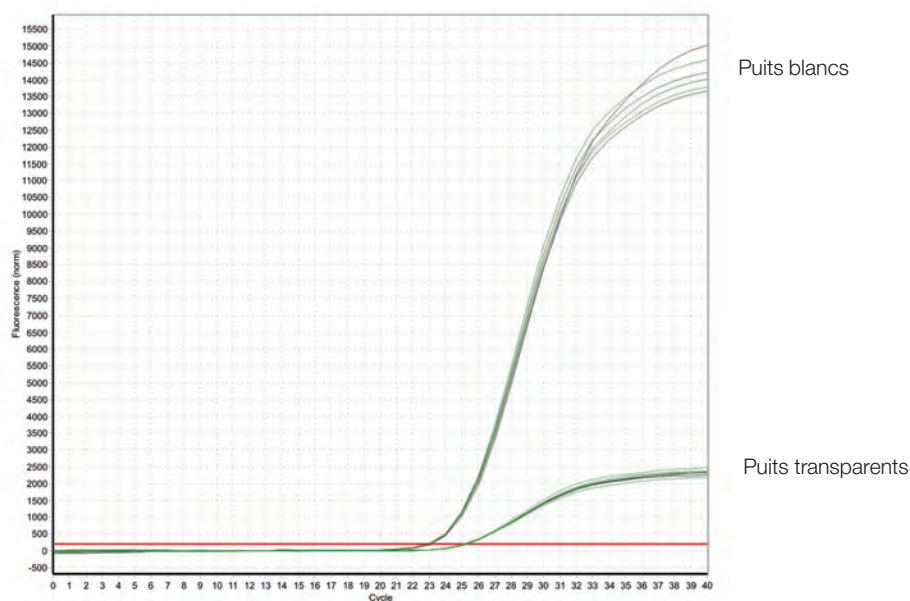


Fig. 1 Série de PCR comparative à l'aide de la barrette de PCR 72.985.002 (transparente) et 72.985.092 (blanche), chacune étant obturée au moyen de la barrette de bouchons à haute transparence 65.989.002. Un fragment de 100 bp de plasmide de type EmGFP (quantité de 1000 molécules-modèles) contenu dans un volume de 20 μ l a été amplifié avec un thermocycleur realplex 4S Eppendorf (n = 8).

Comment une réduction économique du volume des solutions est-elle possible ?

Les consommables de PCR blancs permettant d'obtenir un niveau de fluorescence bien plus élevé, le volume des solutions et donc les quantités des réactifs utilisés (enzyme, sonde, amorce, etc.) peuvent être significativement réduits. Il est ainsi possible de réaliser des économies en termes de réactifs.

Conclusion : l'utilisation de consommables de PCR blancs apporte des avantages significatifs que vous ne sauriez ignorer. Ne compromettez pas vos résultats uniquement pour permettre une vérification optique des puits sur le côté ou par le dessous !

