Owi EmeralDye Safe DNA Stain

Safety Test – Application Note

Références : 258512 - 258512E

POUR USAGE DE RECHERCHE UNIQUEMENT

CONDITIONNEMENT : 250 gels (1 ml)

CONSERVATION : Température ambiante ou +4°C dans l'obscurité

DURÉE DE CONSERVATION : 24 mois à compter de la date de réception lorsqu'il est correctement stocké

INTRODUCTION :

Le bromure d'éthidium (EtBr) est le colorant d'acide nucléique le plus couramment utilisé dans les laboratoires de biologie moléculaire. Il s'est avéré qu'il est fortement cancérigène et donc considéré comme dangereux pour le personnel de laboratoire et l'environnement.

Owi EmeralDye Safe DNA Stain est une coloration d'acide nucléique qui peut être utilisée comme une alternative plus sûre à la coloration traditionnelle au bromure d'éthidium pour détecter l'acide nucléique dans les gels d'agarose.

Il est aussi sensible que le bromure d'éthidium et peut être utilisé exactement de la même manière dans le gel d'agarose électrophorèse avec quelques possibilités supplémentaires.

L'innocuité d'Owi EmeralDye Safe DNA Stain a été contrôlée à l'aide de cinq tests :
I. Ames test
II. Test de cytotoxicité
III. Le test du micronoyau de moelle osseuse de souris
IV. Test d'aberration chromosomique
V. Test de pénétration des gants en latex et en nitrile

TEST AMES :

1.1 Système de test

Le test Ames a utilisé quatre souches de Salmonella, TA97, TA98, TA100 et TA102. Lorsque ces bactéries sont exposées à des agents mutagènes, dans certaines conditions, une mutation inverse de l'auxotrophie des acides aminés (histidine) à la prototrophie se produit, donnant des colonies de révertants. Afin de tester la toxicité mutagène des produits métabolisés, la fraction S9, un extrait de foie de rat, a été utilisée dans les essais. La fraction S9 contient un mélange

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

Dominique DUTSCHER SAS - 67170 BERNOLSHEIM - FRANCE
Tél. : +33 3 88 59 33 90 – www.dutscher.com
Service client – commande : info@dutscher.com
Support technique : demandes_techniques@dutscher.com

de plusieurs enzymes et est connue pour être capable de convertir certains produits chimiques en mutagènes.

Owi EmeralDye Safe DNA Stain a été dissous dans l'eau distillée stérile, et les concentrations étaient de 0,5, 1,0, 2,5 et 5 mg/mL, respectivement. Le volume d'essai était de 0,1 mL par plaque.

Des analyses préliminaires ont été effectuées. Les dosages étaient respectivement de 0, 250, 500, 1000 et 2000 µg/plaque. Les groupes de contrôle comprenaient des plaques de contrôle vierges, des plaques de contrôle de solvant (eau distillée stérile) et des plaques de contrôle positif. En l'absence de mélange S9, la référence de contrôle positif pour les souches TA97 et TA98 était la 9-fluorénone, pour TA100 était NaN3 et pour TA102 était la mitomycine C. En présence du mélange S9, la substance témoin positive de référence pour les souches TA97, TA98 et TA100 était le 2-AF (aminofluorène) et la 1,8-hydroxyanthraquinone pour le TA102.

1.2 Procédure du test

La substance d'essai (0,1 mL) et la suspension bactérienne de 0,1 mL avec 0,5 mL de mélange S9 (+S9) ou sans mélange S9 (-S9) ont été mélangées uniformément dans des tubes à essai avec 1,5 mL de gélose de recouvrement (liquide, 45 °C). Le mélange a été versé uniformément sur les plaques de gélose de sous-couche préparées. Après solidification, les plaques ont été incubées à 37°C pendant 48 h. À la fin de l'incubation, les colonies révertantes par boîte ont été comptées. Tout le placage a été fait en trois exemplaires. Si le nombre était plus de deux fois supérieur au nombre de colonies révertantes spontanées et montrait une relation dose-réponse, un résultat positif pour la mutagénicité pourrait être conclu.

1.3 Résultat du test

D'après les résultats de l'essai d'Ames (tableau 1), en présence et en l'absence de l'activateur métabolique S9, l'augmentation du nombre de colonies révertantes des souches TA97, TA98, TA100 et TA102 par rapport aux colonies révertantes spontanées était inférieure à 2 fois, et il n'y avait pas de relation dose-réponse. Des mutagènes de référence appropriés ont été utilisés comme témoins positifs et ils ont montré une nette augmentation des colonies révertantes induites (tableau 1).

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

Dominique DUTSCHER SAS - 67170 BERNOLSHEIM - FRANCE
Tél. : +33 3 88 59 33 90 – www.dutscher.com
Service client – commande : info@dutscher.com
Support technique : demandes_techniques@dutscher.com

Tableau 1. Résultats du test Owi EmeralDye Safe DNA Stain Ames (± SD)

Dose level (mg/plate)	TA97		TA98		TA100		TA102	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
Neg. control	135 ± 12	156 ± 5	30 ± 1	32 ± 1	136 ± 21	155 ± 11	247 ± 10	275 ± 14
Water	132 ± 16	155 ± 2	30 ± 2	32 ± 1	146 ± 10	158 ± 19	248 ± 7	275 ± 15
0.5	142 ± 9	141 ± 14	31 ± 1	32 ± 2	137 ± 17	154 ± 13	261 ± 9	266 ± 10
1	130 ± 5	151 ± 13	30 ± 1	31 ± 2	140 ± 14	168 ± 10	251 ± 8	258 ± 6
2.5	138 ± 13	151 ± 7	30 ± 1	31 ± 1	142 ± 12	167 ± 7	259 ± 13	254 ± 5
5	136 ± 10	159 ± 2	31 ± 2	32 ± 1	152 ± 10	172 ± 28	254 ± 15	282 ± 6
Pos. control	1475 ± 105[1]	1519 ± 161[2]	2244 ± 36[1]	2306 ± 234[2]	1283 ± 26[3]	1338 ± 166[2]	1464 ± 156[4]	1562 ± 285[5]

[1] 9-fluorénone, 0,2 µg/plaque
[2] 2-AF, 10 µg/plaque
[3] NaN3, 2,5 µg/plaque
[4] Mitomycine C, 4,0 µg/boîte
[5] 1,8-hydroxyanthraquinone, 50 µg/boîte

1.4 Conclusion

Selon les directives, un résultat négatif a été obtenu et un effet mutagène significatif d' Owi EmeralDye Safe DNA Stain n'a pas pu être détecté.

TEST DE TOXICITÉ ORALE AIGUË :

2.1 Système de test

L'essai de toxicité aiguë fournit des renseignements sur l'activité biologique de l'élément d'essai qui peuvent être utilisé dans l'identification des dangers et la gestion des risques dans le contexte de la production, de la manutention, et l'utilisation de produits chimiques. La DL50, définie comme la dose dérivée statistiquement qui, lorsqu'elle est administrée dans un essai de toxicité aiguë, devrait causer la mort chez 50 % des animaux traités au cours d'une période donnée, constitue la base de la classification toxicologique des produits chimiques.

Échantillon : Liquide original d'Owi EmeralDye Safe DNA Stain sans danger pour les colorants

Animaux : Les animaux utilisés dans le test étaient des souris Kunming saines, le poids corporel était de 18 g à 22 g. Avant les tests, tous les animaux jeûnaient, mais l'eau était à volonté. Tous les animaux ont été logés dans une salle d'animaux propre (CL). La température ambiante était de 18 °C à 22 °C et l'humidité atmosphérique relative de 45 à 65 %.

2.2 Procédure du test

Conception de la dose : Selon la méthode de Horn, les dosages pour les groupes de test ont été conçus pour être de 1000, 2150, 4640 et 10000 mg/kg. Les souris ont été divisées en 4 groupes (5 animaux/sexe/groupe) au hasard. Les animaux ont été administrés avec l'élément d'essai par gavage oral, calculer la quantité d'exposition en fonction de 0,2 ml / 10 g.

Mesures des résultats : Après l'exposition, les symptômes d'empoisonnement et les situations de décès, la période d'observation était de deux semaines. Si aucun décès n'est observé dans les deux semaines, on peut en conclure que la DL50 est supérieure à 10000 mg/kg.

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

Dominique DUTSCHER SAS - 67170 BERNOLSHEIM - FRANCE
Tél. : +33 3 88 59 33 90 – www.dutscher.com
Service client – commande : info@dutscher.com
Support technique : demandes_techniques@dutscher.com

2.3 Résultat du test

Tableau 2. Résultats d'un test de toxicité orale aiguë avec une teinture d'ADN sans danger pour les colorants Owi EmeralDye

Sex	Dose (mg/kg)	No. of Animals	No. of Dead Animals	Death Rate (%)
Female	1000	5	0	0
	2150	5	0	0
	4640	5	0	0
	10000	5	0	0
Male	1000	5	0	0
	2150	5	0	0
	4640	5	0	0
	10000	5	0	0

2.4 Conclusion

Après l'exposition, aucun symptôme d'empoisonnement ni aucun décès n'ont été détectés. Cela signifie que la DL50 est supérieure à 10000 mg / kg et que l'élément de test Owi EmeralDye Safe DNA Stain n'était pas toxique.

LE TEST DU MICRONOYAU DE LA MOELLE OSSEUSE DE SOURIS :

3.1 Système de test

Ce test a été réalisé pour évaluer les propriétés mutagènes d'Owi EmeralDye Safe DNA Stain sur l'incidence des micronoyaux des érythrocytes polychromatiques de la moelle osseuse de la souris. Le test du micronoyau est l'un des tests à court terme les plus largement utilisés en toxicologie génétique et est devenu l'un des tests les plus importants pour évaluer le potentiel génotoxique de nouveaux composés chimiques. Le test détecte les lésions chromosomiques induites par l'agent ou les lésions de l'appareil du fuseau mitotique.

Échantillon : Liquide original d'Owi EmeralDye Safe DNA Stain
Contrôle positif : Mitomycine C.
Animaux : Les animaux utilisés dans le test étaient des souris Kunming saines (poids corporel de 25 g à 30 g).

3.2 Procédure du test

Les souris des groupes de test ont reçu l'élément de test par voie orale deux fois en 30 heures. Les doses des groupes d'essai étaient respectivement de 1000, 2000 et 5000 mg/kg. Le témoin négatif a été administré avec de l'eau distillée et le groupe témoin positif a reçu de la mitomycine C (1,5 mg/kg). Dans chaque groupe, cinq souris mâles et cinq souris femelles ont été utilisées. Dans l'intervalle de 6h après la deuxième administration, les souris ont été sacrifiées. La moelle du sternum des souris a été prélevée, et la suspension de la moelle a été transformée en lames microscopiques. Les lames ont été colorées avec celles de Giemsa et examinées au microscope. 1000 érythrocytes polychromatiques (ECP) ont été observés pour chaque animal. Le nombre de cellules avec un micronoyau a été compté.

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

Dominique DUTSCHER SAS - 67170 BERNOLSHEIM - FRANCE
Tél. : +33 3 88 59 33 90 – www.dutscher.com
Service client – commande : info@dutscher.com
Support technique : demandes_techniques@dutscher.com

3.3 Résultat du test

Tableau 3. Données du test du micronoyau dans les érythrocytes polychromatiques de la moelle osseuse de la souris avec Owi EmeralDye Safe DNA Stain.

Sex	Group	Dose (mg/kg)	No. of Animals	PCEs	PCEs with micronuclei	The incidences of micronuclei	P
Female	EmeralDye Clearline	1000	5	5000	4	0.80 ± 0.45	>0.05
		2000	5	5000	4	0.80 ± 0.45	>0.05
		5000	5	5000	3	0.60 ± 0.55	>0.05
	Distilled Water	-	5	5000	4	0.80 ± 0.45	-
	Mitomycin C	1.5	5	5000	135	27.0 ± 1.22	<0.01
Male	EmeralDye Clearline	1000	5	5000	4	0.80 ± 0.45	>0.05
		2000	5	5000	4	0.80 ± 0.45	>0.05
		5000	5	5000	3	0.60 ± 0.55	>0.05
	Distilled Water	-	5	5000	3	0.60 ± 0.55	-
	Mitomycin C	1.5	5	5000	123	24.6 ± 3.05	<0.01

3.4 Conclusion

Les résultats ont montré qu'il n'y avait pas de différence significative (P>0,05) dans l'incidence des micronoyaux entre les groupes testés et le contrôle négatif, tandis qu'il y avait une différence significative (P<0,01) entre la mitomycine C et le contrôle négatif. Par conséquent, selon les directives, le test du micronoyau érythrocytaire chromophile de la moelle de souris avec l'Owi EmeralDye Safe DNA Stain était négatif.

LE TEST D'ABERRATION CHROMOSOMIQUE IN VITRO CHEZ LES MAMMIFÈRES :

4.1 Système d'essai

Le but de l'essai d'aberration chromosomique in vitro est d'identifier les agents qui causent des aberrations chromosomiques structurelles dans les cellules de mammifères en culture. Ce test a été effectué pour évaluer le potentiel d'Owi EmeralDye Safe DNA Stain à induire des aberrations chromosomiques in vitro.

Souches cellulaires : Lignée ovarienne du hamster chinois.

Système d'activation métabolique : mélange S9, qui est un homogénat de foie de rat induit à la fois par le phénobarbital sodique et la naphtaflavone et certains cofacteurs appropriés.

Composé d'essai : 5,0 mg/ml de solution mère de MEM, diluée séparément à une concentration différente par une solution de culture sans sérum (3 heures, présence et absence de mélange S9) et un milieu MEM complété par 10 % de sérum de veau fœtal (24 heures, absence de mélange S9).

4.2 Procédure d'essai

Solution de culture : milieu MEM complété par 10 % de sérum de veau fœtal et 100 UI/ml de pénicilline et de streptomycine.

Détermination de la concentration finale maximale : Il est démontré que les voies d'activation métabolique +S9 et -S9, et le temps d'acton sont de 3 heures grâce à deux expériences

IS

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

Dominique DUTSCHER SAS - 67170 BERNOLSHEIM - FRANCE
Tél. : +33 3 88 59 33 90 – www.dutscher.com
Service client – commande : info@dutscher.com
Support technique : demandes_techniques@dutscher.com

préliminaires. Nous avons également confirmé la concentration finale la plus élevée de l'activation métabolique -S9 répondant pendant 24 heures dans les deux conditions différentes. Les deux expériences préliminaires contiennent un groupe de test et un groupe témoin à blanc. Mesure de l'activité cellulaire avec la résazurine et détermination de la concentration finale en fonction du taux d'inhibition cellulaire.

Test d'aberration chromosomique : Deux types de conditions de test, l'un est l'activation métabolique +S9 et -S9, le temps d'action est de 3 heures, l'autre est -S9, le temps d'action 24 heures.

Prélèvement cellulaire : 4 heures avant le prélèvement, 1,0 µg/ml de colchicines ont été ajoutés, suivis d'un traitement hypotonique, d'une fixation, d'une mise en comprimés et d'une teinture avec Giemsa. 200 cellules de métaphase normale ont été sélectionnées dans le composé d'essai et l'ensemble de contrôle à blanc, et 100 cellules de métaphase normale ont été sélectionnées dans l'ensemble de contrôle positif. Pour l'analyse, le type et le nombre d'aberrations chromosomiques ont été enregistrés et le taux d'aberration chromosomique a été calculé.

Analyse statistique : une analyse χ2 a été effectuée pour comparer le taux d'aberration chromosomique de chaque composé d'essai et le taux d'aberration chromosomique de l'ensemble de témoins négatifs.

4.3 Résultat du test

Tableau 4. Les résultats du test in vitro d'aberration chromosomique sur cellule de mammifère (3 heures, -S9).

Group	Final concentration (µg/ml)	Total cell number	Cells with chromosome aberration	Aberration rate (%)
Negative control	-	200	3	1.5
Test compound	1250.0	200	2	1.0
	2500.0	200	4	2.0
	5000.0	200	1	0.5
Mitomycin C	1.0	100	11	11.0*

*P < 0,01

Tableau 5. Les résultats du test in vitro d'aberration chromosomique sur cellules de mammifères (3 heures, +S9).

Group	Final concentration (µg/ml)	Total cell number	Cells with chromosome aberration	Aberration rate (%)
Negative control	-	200	1	0.5
Test compound	1250.0	200	0	0
	2500.0	200	0	0
	5000.0	200	0	0
Cyclophosphamide	15.0	100	13	13.0*

*P < 0,01

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

Dominique DUTSCHER SAS - 67170 BERNOLSHEIM - FRANCE
Tél. : +33 3 88 59 33 90 – www.dutscher.com
Service client – commande : info@dutscher.com
Support technique : demandes_techniques@dutscher.com

Tableau 6. Les résultats du test in vitro d'aberration chromosomique sur cellule de mammifère (24 heures, -S9).

Group	Final concentration (µg/ml)	Total cell number	Cells with chromosome aberration	Aberration rate (%)
Negative control	-	200	5	2.5
Test compound	31.2	200	3	1.5
	62.5	200	2	1.0
	125.0	200	1	0
Cyclophosphamide	1.6	100	14	14.0*

*P < 0,01

4.4 Conclusion

Dans les conditions expérimentales, le système de détection in vitro de l'aberration chromosomique des cellules de mammifères, comparé au groupe témoin négatif, avec ou sans système d'activation métabolique, le composé testé n'a pas conduit à un taux d'aberration chromosomique plus élevé, de sorte que le résultat du test d'aberration chromosomique in vitro avec l' Owi EmeralDye Safe DNA Stain est négatif.

TEST DE PÉNÉTRATION DES GANTS EN LATEX ET NITRILE :

5.1 Système d'essai

Le but des tests de pénétration des gants est de tester la capacité de la teinture ADN sans danger pour les colorants Owi EmeralDye à se diffuser à travers les gants en latex (par exemple ECO Latex PF250) et les gants en nitrile (par exemple Orange Nitril 260) sur la base du test de pénétration des gants.

5.2 Procédure d'essai

10 µl de 1x solution de teinture d'ADN sans danger pour Owi EmeralDye ont été dissous dans un tampon TAE de 200 µl pour fabriquer les solutions de travail de coloration d'ADN sans danger pour Owi EmeralDye. 5 ml de tampon TAE ont été pipetés dans les doigts de gants en latex et en nitrile pour le dialyser contre les solutions de travail. La dialyse s'est terminée 10, 30, 60, 180 et 360 minutes après le début et à chaque fois, la solution de deux doigts des deux types de gants a été utilisée pour l'analyse. Après la dialyse, toutes les solutions des doigts ont été conservées dans des tubes à centrifuger de 15 ml. À titre de référence, le tampon TAE pur a également été conservé dans les doigts de gant pendant la nuit.

Les solutions dans les doigts des gants ont été analysées pour détecter la présence du colorant par fluorescence (Perkin Elmer LS55). À titre de référence, la fluorescence des solutions de travail du colorant a également été mesurée. Pour augmenter la sensibilité de la détection, toutes les mesures de fluorescence ont été effectuées en présence de 100 µg/ml d'ADNdb de spermatozoïdes de saumon.

Des longueurs d'onde maximales d'excitation et d'émission ont été choisies pour cette analyse (502 nm pour l'excitation et 526 nm pour l'émission). La bande passante des filtres d'excitation et d'émission était de 10 nm.

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

Dominique DUTSCHER SAS - 67170 BERNOLSHEIM - FRANCE
Tél. : +33 3 88 59 33 90 – www.dutscher.com
Service client – commande : info@dutscher.com
Support technique : demandes_techniques@dutscher.com